



**KÖK KANSERİ HASTALIĞI [*Rhizobium radiobacter*
(*Agrobacterium tumefaciens*)] İLE MÜCADELEDE
BİYOAJAN BAKTERİLERİN KULLANIM
İMKÂNLARININ ARAŞTIRILMASI**

Nasibe TEKİNER

**Doktora Tezi
Bitki Koruma Anabilim Dalı
Fitopatoloji Bilim Dalı
Prof. Dr. Recep KOTAN
2020
Her hakkı saklıdır**

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

KÖK KANSERİ HASTALIĞI
[*Rhizobium radiobacter* (*Agrobacterium tumefaciens*)]
İLE MÜCADELEDE BİYOAJAN BAKTERİLERİN KULLANIM
İMKÂNLARININ ARAŞTIRILMASI

Nasibe TEKİNER

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI
Fitopatoloji Bilim Dalı

ERZURUM
2020

Her Hakkı Saklıdır



TEZ ONAY FORMU

**KÖK KANSERİ HASTALIĞI [*Rhizobium radiobacter* (*Agrobacterium tumefaciens*)] İLE
MÜCADELEDE BİYOAJAN BAKTERİLERİN KULLANIM İMKÂNLARININ
ARAŞTIRILMASI**

Prof. Dr. Recep KOTAN danışmanlığında, Nasibe TEKİNER tarafından hazırlanan bu çalışma, 15/01/2020 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Bitki Koruma Anabilim Dalı Fitopatoloji Bilim Dalı'nda Doktora tezi olarak **oybirliği / oy çokluğu (.../...)** ile kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Hatice ÖĞÜTÇÜ

İmza :

Üye : Prof. Dr. Recep KOTAN

İmza :

Üye : Prof. Dr. Arzu GÖRMEZ

İmza :

Üye : Doç. Dr. Emine ORHAN

İmza :

Üye : Doç Dr. Elif TOZLU

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu'nun 07.02/2020 tarih ve ..06.../..54..... nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mehmet KARAKAN
Enstitü Müdürü

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

ÖZET

Doktora Tezi

KÖK KANSERİ HASTALIĞI [*Rhizobium radiobacter* (*Agrobacterium tumefaciens*)] İLE MÜCADELEDE BİYOAJAN BAKTERİLERİN KULLANIM İMKÂNLARININ ARAŞTIRILMASI

Nasibe TEKİNER

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Bitki Koruma Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Recep KOTAN

Bu çalışmada; ülkemizde çeşitli konukçulardan izole edilen toplam beş kök kanseri etmeni *Rhizobium radiobacter* izolatının havuç dilimi ve kabak meyveleri, domates ve ayçiçeği fideleri, kalonşe yaprakları ve GF 677 şeftali, M9 ve MM106 elma fidan anaçlarında virülanslık testleri yapılmıştır. Bu izolatlar tütünde aşırı duyarlılık testine tabi tutulmuş, biyokimyasal ve fizyolojik özellikleri açısından karakterize edilmiştir. En yüksek virülanslığa sahip patojen izolata karşı; Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü Mikroorganizma Kültür Koleksiyonundan temin edilen toplam 2012 potansiyel bakteri izolatı biyoajan etkinliği için petride test edilmiştir. Petri denemelerinde antibiyozis veya hiperparazitik etki gösteren en etkili ilk beş biyoajan izolat sıvı besi ortamında patojene karşı test edilmiştir. İki farklı ortamda da etkili olan bu potansiyel biyoajan izolatların bazı fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri ortaya konulmuştur. Pektolitik aktivite göstermeyen biyoajan bakteri izolatları havuç ve kabak meyvesinde test edilmiştir. Sera denemesinde kullanılmak üzere seçilen izolatların metabolit üretme ve enzim aktiviteleri araştırılmıştır. Sera denemeleri kök ve gövde uygulaması olmak üzere GF 677 şeftali anacında yürütülmüştür. Deneme tamamlanınca uygulamaların bitkideki antioksidan enzim içerikleri üzerine etkileri araştırılmıştır. Patojen ve sera çalışmalarında kullanılan biyoajanların moleküler tanıları yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre; virülanslık testlerinde *R. radiobacter* 1B izolatı en virulent izolat olarak tespit edilmiştir. Petri testlerinde toplam 2012 adet potansiyel biyoajan içinden etkili olan 106 adet biyoajan bakteri izolat arasında sekiz izolat pektolitik aktivite göstermemiş ve bu izolatlar havuç ile kabak meyvesinde test edilmiştir. Sıvı besiyerinde patojene karşı test edilen potansiyel biyoajan bakterilerden antibiyozis etkiye sahip izolatların patojenin gelişimini baskıladığı ve hiperparazitik etki olarak değerlendirilen katı besiyeri üzerini tamamen kaplayan biyoajan izolatların ise patojen ile birlikte yaşamaya devam ettiği görülmüştür. Sera denemesinde kullanılmak üzere FDG 48, RK 570A, RK 1977, RK 1978 ve RK 1986 biyoajan izolatları seçilmiştir. Bu izolatların metabolit test sonuçlarında; hiçbir izolatın salisilik asit ve siderefor üretmediği, en yüksek HCN ve IAA üreten izolatların sırası ile RK 570A ve RK 1978 izolatları olduğu belirlenmiştir. RK 570 izolatı hariç tüm izolatların amilaz enzimi ürettiği, RK 1977 izolatı hariç tüm izolatların ise proteaz enzim aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir. En yüksek kitinaz, fitaz ve selüloz enzim aktivitesine sahip olan izolatların sırası ile RK 1977, RK 570A ve RK 1986 izolatları olduğu tespit edilmiştir. Sera denemesi sonuçlarında kökteki ur sayısı ve gövdedeki ur çapına göre yapılan değerlendirmede en etkili biyoajan izolatın RK 1978 olduğu tespit edilmiştir. Biyoajan uygulamalarının çoğunda bitkilerin kök ve gövdesinde katalaz, peroksidaz, süperoksit dismutaz ve askorbat peroksidaz enzim aktivitelerinde artışların olduğu gözlenmiştir. Moleküler tanı sonuçlarına göre; biyoajanalardan FDG 48 izolatı *Bacillus amyloliquefaciens*; RK 570A izolatı *Bacillus cereus*; RK 1977 izolatı *Aneurinibacillus migulanus*; RK 1978 izolatı *Bacillus subtilis*; RK 1986 izolatı *Bacillus mojavensis* ve patojen 1B izolatı ise *Agrobacterium tumefaciens* olarak tanımlanmıştır.

2020, 167 sayfa

Anahtar kelimeler: *Agrobacterium tumefaciens*, *Bacillus* spp., biyolojik mücadele, GF 677, kök kanseri, *Rhizobium radiobacter*

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

INVESTIGATION OF POSSIBILITY OF BIOLOGICAL CONTROL WITH CROWN GALL [*Rhizobium radiobacter* (*Agrobacterium tumefaciens*)] USING BIOAGENT BACTERIA

Nasibe TEKİNER

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

Supervisor: Prof. Dr. Recep KOTAN

In this study, the virulence of *Rhizobium radiobacter* isolates five crown gall agents isolated from various hosts in our country were tested on carrot slices, squash fruits, tomato and sunflower seedlings, kalonchoe leaves and GF 677 peach, M9 and MM106 apple seedlings. These isolates were subjected to hypersensitivity response test in tobacco and characterized from the point of their biochemical and physiological properties. Total 2012 potential bacterial isolates obtained from Atatürk University, Faculty of Agriculture. Plant Protection Department, Microorganism Culture Collection tested for bioagent activity in petri plates against the highest virulence pathogen isolate. After, the most effective five bioagent isolates had antibiosis or hyperparasitic effect in petri plate were tested against the pathogen in liquid medium assay. Some physiological and biochemical properties of these potential bioagent isolates effective in two different mediums were revealed. Bioagent bacterial isolates have no pectolitic activity were tested in carrot slices and squash fruit. The metabolite production and enzymatic activity of the isolates selected for greenhouse tests were investigated. The greenhouse tests were done on roots and stems of GF 677 peach seedlings. After greenhouse tests completed, antioxidant enzymes contents in the plants were investigated. Pathogen and the bioagents strains used greenhouse tests were identified as molecular. According to results, *R. radiobacter* 1B pathogen strain were determined as the most virulent strain in virulence tests. The eight strains effective among 106 bioagent bacterial strains in petri plate assays had no pectolitic activity and these strains were tested on carrot slices and squash fruits. The strains had antibiosis activity among bioagent bacterial strains tested against pathogen in liquid medium strangled pathogen growing and the strains had hyperparasitic effect completely covered petri plate surface and it determined that these strains lived with pathogen. FDG 48, RK 570A, RK 1977, RK 1978 and RK 1986 bioagent bacterial strains were selected for greenhouse tests. In strains' metabolite tests results, it was determined that any strains didn't produced salicylic acid and siderophore, RK 570A and RK 1978 produced Hydrogen cyanide and indoleacetic acid in highly level, respectively, all strains produced amylase enzyme except from RK 570 and all strains had protease enzyme activity except from RK 1977. The most chitinase, phytase and cellulase enzyme activities were obtained from RK 1977, RK 570A and RK 1986, respectively. It was determined that the most effective bioagent strain was RK 1978 in evaluations according to galls number of on roots and galls diameters on stems. In most of bioagents applications, the catalase, peroxidase, superoxidedismutase and ascorbate peroxidase enzyme activities increased in plant roots and stems. According to molecular identification results, FDG 48 were identified as *Bacillus amyloliquefaciens*; RK 570A as *Bacillus cereus*; RK 1977 as *Aneurinibacillus migulanus*; RK 1978 as *Bacillus subtilis*; RK 1986 as *Bacillus mojavensis* and pathogen 1B as *Rhizobium radiobacter*.

2020, 167 pages

Keywords: *Agrobacterium tumefaciens*, *Bacillus* spp., biological control, crown gall, GF 677, *Rhizobium radiobacter*

TEŞEKKÜR

Çalışmalarımın her aşamasında yardımlarını esirgemeyen, yapıcı ve yönlendirici fikirleri ile bana daima yol gösteren tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Recep KOTAN'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Doktora Tez İzleme Komitesi üyelerinden Sayın Doç. Dr. Emine ORHAN'a ve Doç. Dr. Elif TOZLU'ya çalışmalarımın tüm aşamalarında yönlendirici ve olumlu katkılarından dolayı teşekkür ederim. Doktora Tez Jüri üyelerinden Sayın Prof. Dr. Hatice ÖĞÜTÇÜ'ye ve Sayın Prof. Dr. Arzu GÖRMEZ'e yapıcı ve yönlendirici fikirleriyle katkıda bulundukları için teşekkürlerimi sunarım.

Doktora çalışmam sırasında patojen izolatlarını bizimle paylaşan Sayın Dr. Raziye ÇETİNKAYA YILDIZ'a en içten teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmamın yürütülmesinde fidan temininde yardımcı olan Elma Tarım ve Tarım Aletleri Gıda Nakliyat Turizm Sanayi ve Ticaret Limited Şirketine (Isparta); laboratuvar cihaz kullanımında yardımcı olan Süpersol Biyoteknoloji Ananım Şirketine (İzmir) ve kimyasal temini noktasında yardımcı olan Kotan Biotechnology Arge Danışmanlık Üretim Sanayi ve Ticaret Limited Şirketine (Erzurum) teşekkür ederim. PCR çalışmalarımı yapmamda yardımcı olan Sayın Prof. Dr. Arzu GÖRMEZ'e ve Arş. Gör. Damla RÜZGAR'a, antioksidan enzim çalışmalarımı yapmamda yardımcı olan Arş. Gör. Dr. Raziye KUL'a teşekkür ederim. Sera çalışmalarımı yaparken sera kullanımında yardımcı olan Atatürk Üniversitesi Bitkisel Üretim Merkezi Müdürlüğüne teşekkür ederim. Tüm yaşamım boyunca olduğu gibi akademik yaşamımda da maddi-manevi yanımda olan, büyük bir sabır ve destek gösteren, beni her zaman yüreklendiren canım aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ocak 2020

Nasibe TEKİNER

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISATMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	21
2.1. <i>Rhizobium radiobacter</i> (<i>Agrobacterium tumefaciens</i>) ile İlgili Yapılan Epidemiyolojik Çalışmalar	21
2.2. <i>Rhizobium radiobacter</i> (<i>Agrobacterium tumefaciens</i>)’in Sınıflandırmadaki Yeri	25
2.3. <i>Rhizobium radiobacter</i> (<i>Agrobacterium tumefaciens</i>)’in Konukçu Dizisi.....	27
2.4. <i>Rhizobium radiobacter</i> (<i>Agrobacterium tumefaciens</i>)’in Simptomatolojisi	29
2.5. <i>Rhizobium radiobacter</i> (<i>Agrobacterium tumefaciens</i>)’in Enfeksiyon Aşamaları	31
2.6. Hastalığın Bitki Gelişimine Etkisi	35
2.7. Patojenite Testleri	36
2.8. <i>Rhizobium radiobacter</i> (<i>Agrobacterium tumefaciens</i>)’in Tanı ve Karakterizasyonu	39
2.9. <i>Rhizobium radiobacter</i> (<i>Agrobacterium tumefaciens</i>)’in mücadelesine yönelik çalışmalar	43
3. MATERYAL VE YÖNTEM	56
3.1. Materyal.....	56
3.1.1. Bakterinin geleneksel yöntemlerle tanısında kullanılan malzemeler.....	58
3.1.2. Besiyerleri	58
3.1.3. Kullanılan test bitkileri	60
3.2. Yöntem.....	61

3.2.1. Potansiyel patojen bakteri izolatlarının virölanslık testleri ve aşırı duyarlılık reaksiyonu	61
3.2.2. Potansiyel patojen bakteri izolatlarının klasik yöntemlerle tanısı	65
3.2.3. Potansiyel biyoajan bakterilerin katı besiyerinde patojene karşı test edilmesi	68
3.2.4. Katı besiyerinde antibiyozis ve hiperparazitik etkiye sahip ilk on potansiyel biyoajan bakterinin sıvı besiyerinde patojene karşı test edilmesi	69
3.2.5. Potansiyel biyoajan bakterilerin biyokimyasal ve kültürel tanı testleri	69
3.2.6. <i>In vitro</i> şartlarda etkili olan biyoajan bakterilerin havuç dilimlerinde ve kabak meyvesinde test edilmesi	74
3.2.7. Sera denemesinde kullanılacak biyoajan bakterilerin metabolit testi	74
3.2.8. Sera denemesinde kullanılacak biyoajan bakterilerin enzim aktivitelerinin ölçülmesi	76
3.2.9. GF 677 anacında sera denemesi	77
3.2.10. Bitki savunma metabolizma enzimlerinin değerlendirilmesi	78
3.2.11. Sera denemesinde kullanılacak bakterilerin moleküler tanıları	80
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	82
4.1. Potansiyel Patojen Bakteri İzolatlarının Virölanslık Testleri ve Aşırı Duyarlılık Reaksiyon Test Sonuçları	82
4.2. Potansiyel Patojen Bakteri İzolatlarının Klasik Yöntemlerle Tanı Sonuçları	85
4.3. Potansiyel Biyoajan Bakterilerin Katı Besiyerinde Patojene Karşı Test Edilmesinin Sonuçları	89
4.4. Katı Besiyerinde Antibiyozis ve Hiperparazitik Etkiye Sahip İlk Beş Potansiyel Biyoajan Bakterinin Sıvı Besiyerinde Patojene Karşı Test Edilmesi Sonuçları	97
4.5. Potansiyel Biyoajan Bakterilerin Biyokimyasal ve Kültürel Tanı Testlerinin Sonuçları	101
4.6. <i>In Vitro</i> Şartlarda Etkili Olan Biyoajan Bakterilerin Havuç Dilimlerinde ve Kabak Meyvesinde Test Edilmesinin Sonuçları	102
4.7. Sera Denemesinde Kullanılan Biyoajan Bakterilerin Metabolit Test Sonuçları	105
4.8. Sera Denemesinde Kullanılan Biyoajan Bakterilerin Enzim Aktivitelerinin Sonuçları	106

4.9. GF 677 Anacında Sera Denemesinin Sonuçları	107
4.10. Bitki Savunma Metabolizma Enzimlerinin Değerlendirilmesi	109
4.11. Sera Denemesinde Kullanılan Bakterilerin Moleküler Tanı Sonuçları.....	112
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	113
KAYNAKLAR	137
ÖZGEÇMİŞ	168



SİMGELER ve KISATMALAR DİZİNİ

bp	Baz çifti
ddH ₂ O	Bidestile su
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik asit
dH ₂ O	Distile su
g	Gram
pH	Hidrojen iyonu konsantasyonu
kb	Kilo baz
Kob	Koloni oluşturan bakteri sayısı
l	Litre
MIS	Mikrobiyal identifikasyon sistem
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
mg	Miligram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
ppm	Milyonda bir kısım
OD	Optical density (yoğunluk)
sa	Saat
s	Saniye
°C	Santigrat derece
rpm	Santrifuj dönüş hızı
NaHClO	Sodyum hipoklorit
sdH ₂ O	Steril distile su
spp.	Türler
UV	Ultraviyole
%	Yüzde

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Dünya’da yaş meyve üretimi yapılan bölgeler	1
Şekil 1.2. Kök kanseri etmeninin dünyadaki yayılışı	9
Şekil 1.3. Ti plazmitin genetik haritası	13
Şekil 2.1. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> ’in duyarlı konukçu bitki hücresinde enfeksiyon süreci	34
Şekil 3.1. Havuç dilimlerinde virülanslık test skalası.....	62
Şekil 3.2. Patojen izolatların test bitkilerine inokulasyonu.....	63
Şekil 3.3. Anaç fidanlarında virülanslık test skalası.....	64
Şekil 3.4. Patojen-biyoajan arasındaki etki.....	69
Şekil 3.5. Nişasta hidroliz testi	71
Şekil 3.6. Azot fiksasyon testi	71
Şekil 3.7. Fosfat çözücü bakterilerin tespit skalası	72
Şekil 3.8. Hemolitik aktivite testi	73
Şekil 3.9. Pektolitik aktivite.....	73
Şekil 3.10. Sera denemesinden genel bir görünüm.....	78
Şekil 4.1. 1B patojen izolatının havuç dilimleri, kabak meyvesi ve GF 677 anacında oluşturduğu urlar	84
Şekil 4.2. Potansiyel patojen bakteri izolatlarının tütün bitkisinde oluşturduğu aşırı duyarlılık reaksiyon test sonucu	84
Şekil 4.3. Potansiyel patojen izolatların farklı biyokimyasal ve fizyolojik testlere verdiği reaksiyonlar	88
Şekil 4.4. Patojen+biyoajanların sıvı besiyerinde test edilmesine ait grafikler	99
Şekil 4.5. Katı besiyerinde en etkili olan ilk beş antibiyozis ve hiperparazitik etkiye sahip biyoajanın patojene karşı sıvı besiyerinde test edilmesine ait 10. gün petri resimleri.....	100
Şekil 4.6. Havuç dilimi ve kabak meyvesinde en etkili olan RK 1986 izolatına ait görsel	104
Şekil 4.7. Biyoajan bakterilere ait enzim test sonuçları.....	106
Şekil 4.8. Patojen ve en etkili olan uygulamalarda oluşan urlardan görünüm.....	109

ÇİZELGELER DİZİNİ

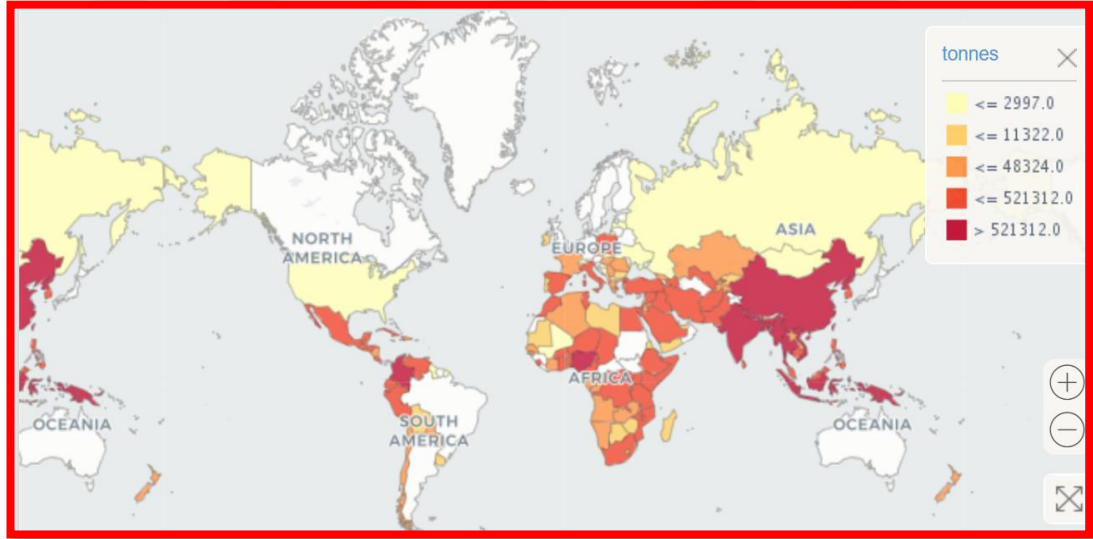
Çizelge 1.1. Dünya’da taze meyve üreticisi ilk on ülkenin son beş yıla ait üretim değerleri (ton)	2
Çizelge 1.2. Ülkemizde son 10 yıla ait sert çekirdekli meyve veren ağaç sayısı ve üretim (ton) değerleri	4
Çizelge 1.3. Ülkemizde son 10 yıla ait yumuşak çekirdekli meyve veren ağaç sayısı ve üretim (ton) değerleri	5
Çizelge 1.4. Ülkemizde yumuşak ve sert çekirdekli meyvelerde görülen fungal, bakteriyel ve viral hastalıklar ve hastalık etmenleri	7
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan potansiyel patojen izolatlar ve izole edildiği bitkiler.....	56
Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan potansiyel biyoajan bakteri izolatlarının ait olduğu cinsler ve izolat sayıları	57
Çizelge 3.3. Çalışmalarda kullanılan besiyerleri ve bileşimleri	58
Çizelge 3.4. <i>Agrobacterium</i> türlerinin ayırımında kullanılan biyokimyasal ve fizyolojik testler	66
Çizelge 3.5. Kullanılan PZR karışımı	81
Çizelge 3.6. PZR döngüsü	81
Çizelge 4.1. Potansiyel patojen izolatlarının virülanslık test sonuçları	83
Çizelge 4.2. Potansiyel patojen bakteri izolatlarının biyokimyasal ve fizyolojik test sonuçları.....	85
Çizelge 4.3. Çalışmada kullanılan potansiyel biyoajan bakteri cinslerine ait NA besiyerinde patojene karşı etkililik test sonuçları	90
Çizelge 4.4. <i>In vitro</i> şartlarda patojene karşı antibiyozis ve hiperparazitik etki gösteren biyoajan bakteri izolatlarının NA besiyerinde ortalama inhibisyon zon çapları (mm), ortalama yayılma alanları (mm) ile biyokimyasal ve fizyolojik test sonuçları.....	93
Çizelge 4.5. Katı besiyerinde antagonistik ve hiperparazitik etki gösteren ilk beş bakterinin sıvı besiyerinde patojene karşı test edilmesinin sonuçları (kob/ml)	98

Çizelge 4.6. Patojen ve biyoajan uygulamalarının havuç dilimlerinde ve kabak meyvesinde ur oluşturma yüzdesi.....	103
Çizelge 4.7. Biyoajan bakterilerin metabolit test sonuçları	105
Çizelge 4.8. Biyoajan bakterilerin enzim aktivite test sonuçları	106
Çizelge 4.9. GF 677 fidan anacında patojen+biyoajan kök ve gövde uygulama sonuçları.....	108
Çizelge 4.10. Patojen+biyoajan kök ve gövde uygulamalarına ait bitki savunma metabolizma enzimlerinin test sonuçları	111
Çizelge 4.11. Sera çalışmasında kullanılan bakteriyel izolatların tanı sonuçları.....	112

1. GİRİŞ

Meyveler, insanların günlük beslenmesinde gerekli olan karbonhidrat, yağ, protein, vitamin, mineral ve su gibi besin öğelerini ihtiva etmeleri, vücuda alınan besinlerden daha iyi yararlanmayı sağlamaları, antimikrobiyal ve antioksidan etkilerinden dolayı sağlık üzerine olumlu etkilere sahiptirler (Yamankaradeniz 1981; Howell *et al.* 2001).

Dünya’da taze meyve üretimi yapılan alan 5,634,61 hektar alanda (ha) 33,630,68 ton (bin ton cinsinden) üretim gerçekleştirilmiştir (FAO 2017). Taze meyve üretim faaliyetinin yapıldığı ülkeler üretim miktarlarına göre; sarı renkle belirtilen ülkeler 0-2,997 ton, açık turuncu 2,998-11,322 ton, turuncu renk 11,323-48,324 ton, kırmızı renk 48,325-521,312 ton, koyu kırmızı 521,313 ve üzeri ile belirtilmiştir. Ülkemiz ise bu renklerden turuncu renk ile belirtilmektedir (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. Dünya’da yaş meyve üretimi yapılan bölgeler (FAO 2017)

Taze meyve üretiminde Dünya’da söz sahibi olan ilk 10 ülke sırasıyla; Çin, Hindistan, Brezilya, ABD, Türkiye, Meksika, İran, İspanya, Endonezya ve İtalya’dır. Ülkemiz bu ülkeler arasında beşinci sırada yer almaktadır. Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü

(FAO), (2017) verilerine göre, dünyada 65,2 milyon hektar alanda 865,8 milyon ton taze meyve üretimi yapılmıştır.

Çizelge 1.1. Dünya’da taze meyve üreticisi ilk on ülkenin son beş yıla ait üretim değerleri (ton) (FAO 2017)

Ülkeler	2012	2013	2014	2015	2016
Çin	233,372,703	245,837,653	251,573,690	262,071,865	272,084,320
Hindistan	76,878,206	84,005,088	89,921,108	88,840,605	90,891,160
Brezilya	41,441,659	40,852,604	40,530,705	40,123,520	39,685,921
ABD	29,980,381	30,435,717	28,600,046	27,251,813	27,114,383
Türkiye	20,571,039	20,908,293	19,895,134	20,295,787	21,743,289
Meksika	17,567,723	19,102,971	19,326,770	20,209,697	21,430,774
İran	18,971,939	20,690,706	19,076,252	18,760,017	19,415,179
İspanya	16,458,754	19,638,805	19,372,248	19,571,236	19,048,180
Endonezya	18,978,104	18,006,377	18,510,202	20,687,650	18,524,178
İtalya	16,095,092	17,533,826	16,658,101	18,353,269	18,003,485

Çizelge 1.1’e göre 2016 yılında Çin 272 milyon tonluk üretimi ile dünyada en fazla taze meyve üreten ülke konumundadır. Çin dünya yaş meyve üretiminden %31 oranında pay almaktadır. Bu ülkeyi sırasıyla Hindistan (90,8 milyon ton) ve Brezilya (39,6 milyon ton) izlemektedir. Ülkemiz ise, ~22 milyon tonluk yaş meyve üretimi ile dünya sıralamasında beşinci sırada yer almakta ve dünya yaş meyve üretiminin %3’ünü karşılamaktadır. Dünyada yaş meyve üretiminde önemli olan diğer ülkeler 21,4 milyon ton üretim ile Meksika altıncı, 19,4 milyon ton üretim ile İran yedinci, 19 milyon ton üretim ile İspanya sekizinci, 18,5 milyon ton ile Endonezya dokuzuncu ve 18 milyon ton üretim ile İtalya onuncu sırada yer almaktadır (FAO 2017).|

Ülkemiz; üretime uygun, verimli ve geniş tarım arazilerine sahip olması, 7 bölgede farklı ekolojik koşulların bulunmasından dolayı meyve ve sebzelerinin iyi koşullarda ve kaliteli olarak yetişebildiği nadir ülkelerden birisidir. Ayrıca dünyada üretimi yapılan pek çok meyvenin de anavatanı olması sebebiyle meyve yetiştiriciliğinde önemli bir yere sahiptir (Ağaoğlu vd 1997). Dünyada yetiştiriciliği yapılan yaklaşık 140 adet meyve türünün 80'den fazlası ülkemizde yetiştirilmektedir ve hemen hemen her mevsimde her bölgede meyve üretimi gerçekleştirilmektedir. Bu sebeple ülkemiz yaş meyve üretiminde söz sahibi ülkeler arasında yer almaktadır. Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) verilerine göre 2018 yılında; Ülkemizde yaklaşık 3,3 milyon hektar alanda, 22,1 milyon ton yaş meyve üretimi yapılmıştır (TÜİK 2018). Ülkemiz yaş meyveler içerisinde yer alan yumuşak ve sert çekirdekli meyveler üzüksü meyvelerden sonra en çok üretilen meyve gruplarıdır. Yumuşak ve sert çekirdekli meyveler denilince sırasıyla; elma (*Malus communis* Desf.), armut (*Pyrus communis* L.), ayva (*Cydonia oblonga* Mill.), muşmula (*Mespilus germanica* L.), yenidünya (*Eriobotrya japonica* Lindl.); şeftali (*Prunus persica* L.), erik (*P. domestica* L.), kiraz (*P. avium* L.), vişne (*P. cerasus* L.), kayısı (*P. armeniaca* L.) akla gelmektedir. Bu meyve gruplarının son on yıla ait meyve veren ağaç sayısı ve üretim değerleri Çizelge 1.2 ve Çizelge 1.3'de verilmiştir. Buna göre en çok üretimi yapılan yumuşak çekirdekli meyve elma (3,6 milyon ton) olurken onu armut (519,451), ayva (176,479), yenidünya (15,984) ve muşmula (4,695) takip etmiştir. Sert çekirdekli meyvelerde ise şeftali olmuştur (789,457 bin ton) ve onu kayısı (750,000), kiraz (639,564), erik (296,878) ve vişne (184,167) takip etmektedir. Son 10 yılda meyve veren ağaç sayılarında ve buna bağlı olarak üretim değerlerinde genel olarak artış gözlemlenmiştir. Bazı yıllarda üretim değerleri artış gösterirken bazı yıllarda bir önceki seneye göre azalış gösterdiği görülmektedir. (Çizelge 1.2 ve Çizelge 1.3) (TÜİK 2018).

Çizelge 1.2. Ülkemizde son 10 yıla ait sert çekirdekli meyve veren ağaç sayısı ve üretim (ton) değerleri (TÜİK 2018)

Ürünler	Şeftali		Erik		Kayısı		Kiraz		Vişne	
Yıllar	Mvas	Üretim	Mvas	Üretim	Mvas	Üretim	Mvas	Üretim	Mvas	Üretim
2009	13,928	547,219	7,743	245,782	13,490	660,894	13,284	417,694	6,034	192,705
2010	14,364	539,403	7,816	240,806	13,770	450,000	14,740	417,905	5,977	194,989
2011	13,447	545,902	7,863	268,696	13,859	650,000	15,836	438,550	5,959	182,234
2012	14,181	611,165	8,187	300,046	14,133	760,000	16,916	470,887	5,781	186,443
2013	14,546	637,543	8,429	305,393	14,453	780,000	17,922	494,325	5,782	179,752
2014	15,149	608,513	8,658	265,490	15,005	270,000	19,087	445,556	5,932	182,577
2015	16,338	642,727	8,889	279,761	15,403	680,000	20,616	535,600	6,041	183,500
2016	16,647	674,136	8,959	297,589	15,586	730,000	21,314	599,650	5,971	192,500
2017	17,064	771,459	8,388	291,934	15,949	985,000	21,587	627,132	5,617	181,874
2018	17,170	789,457	8,301	296,878	16,837	750,000	20,880	639,564	5,835	184,167

*Mvas: Meyve veren ağaç sayısı

Çizelge 1.3. Ülkemizde son 10 yıla ait yumuşak çekirdekli meyve veren ağaç sayısı ve üretim (ton) değerleri (TÜİK 2018)

Ürünler	Elma		Armut		Ayva		Yenidünya		Muşmula	
Yıllar	Mvas	Üretim	Mvas	Üretim	Mvas	Üretim	Mvas	Üretim	Mvas	Üretim
2009	39,951	2,782,365	9,919	384,244	2,944	96,282	273	12,986	275	4,205
2010	41,423	2,600,000	10,028	380,003	3,074	121,085	264	12,112	265	4,362
2011	42,720	2,680,075	9,784	386,382	3,152	127,767	265	12,093	263	4,323
2012	45,254	2,888,985	10,220	442,646	3,212	136,577	265	12,105	266	4,606
2013	47,077	3,128,450	10,330	461,826	3,226	139,311	284	12,902	261	4,651
2014	48,665	2,480,444	10,827	462,336	3,104	107,243	280	12,900	247	4,134
2015	52,272	2,569,759	10,873	463,623	3,321	112,900	272	12,717	243	4,205
2016	55,585	2,925,828	11,193	472,250	3,378	126,400	279	13,950	235	4,252
2017	55,771	3,032,164	11,265	503,004	3,384	174,038	262	15,184	236	4,352
2018	61,288	3,625,960	11,485	519,451	3,384	176,479	263	15,984	248	4,695

*Mvas: Meyve veren ağaç sayısı

Dünya nüfusunun 2050 yılında yaklaşık 10 milyarı bulabileceği düşünülmektedir. Buna bağlı olarak tarımsal üretime talebin ~%50 civarında artması beklenmektedir (FAO 2017). Meydana gelebilecek gıda açığını kapatabilmek için ise besin maddelerinin üretimini birim alandan alınacak ürün miktarını arttırmak ve gıda kayıplarını önlemek için çeşitli uygulamalar yapılmalıdır. Bu uygulamalar; uygun sulama, gübreleme, toprak bakımı, dayanıklı tohumluk/fide/fidan kullanımı, çevre şartları dikkate alınarak yapılacak ekim ve uygun depolama koşullarıdır. Fakat dünyada ve özellikle ülkemizde önemli geniş bir yetiştiricilik alanına sahip olan yumuşak ve sert çekirdekli meyveler, tohum aşamasından hasat sonrası aşamaya kadar geçen süre boyunca bitki koruma açısından en uygun şartlar sağlansa dahi verim ve kalite kayıplarına sebep olabilecek birçok abiyotik/biyotik faktör bulunmaktadır. Bitkilerin bu biyotik ve abiyotik faktörler ile karşı karşıya kaldığı zaman hayatsal faaliyetlerinde meydana gelebilecek geri dönüşümlü veya dönüşümsüz bozulmaya hastalanma denilmektedir. Hastalığın bitkide meydana getirdiği zarar düzeyi konukçu duyarlılığı, patojenin virülensliği ve çevre koşullarına bağlı olarak değişir. Dünyadaki bitkisel üretimin ~%36'sının hastalık, zararlı ve yabancı otlardan kaynaklı kaybedildiği bilinmektedir (Agrios 1997). Meyve üretiminde kayıpların %12,6 hastalıklar; %7,8 böcekler; %3 yabancı otlar kaynaklı bir kaybın olduğunu bildirmiştir (Agrios 1997). Yine aynı araştırmacı, bu kayıpları %60-75 fungal ve bakteriyel, %10-15 viral, %10 ise diğer patojenler ve çevre faktörleri olmak üzere gruplandırmıştır. Bu faktörler dışında epidemi oluşumuna: kültürel uygulamalar, konukçu bitkinin fazlalığı, yaşı, ekim sıklığı, genetik özellikleri, çevre şartları, dormansi periyodu gibi faktörlerde neden olmaktadır (Goldberg 2000). Bu faktörlerin etkisiyle bitkinin kök/kök boğazı, gövde, ana/yan dallar, sürgün, yaprak, tomurcuk ve meyvede hastalıklar meydana gelebilmektedir ve sonuçta bitkide verim kayıplarına neden olmaktadır. Yumuşak ve sert çekirdekli meyvelerde biyotik faktörlerden kaynaklı hasat öncesi ve sonrasında kayıplara neden olan birçok etmen bulunmaktadır. Bu etmenler ve meydana getirdiği hastalıkların isimleri Çizelge 1.4'te verilmiştir (Anonim 2008).

Çizelge 1.4'te verilen hastalık etmenlerinden bazıları fidan aşamasından hasat sonrası aşamaya kadar olan süre boyunca zarar verebilirken bazıları sadece fidan aşamasında zarar verebilir. Ayrıca Çizelge 1.4'te verilen hastalıklar tek bir yumuşak veya sert

çekirdekli meyve çeşidini kapsamayıp aynı anda hem sert hem de yumuşak çekirdekli meyvelerde hastalık oluşturabilmektedir.

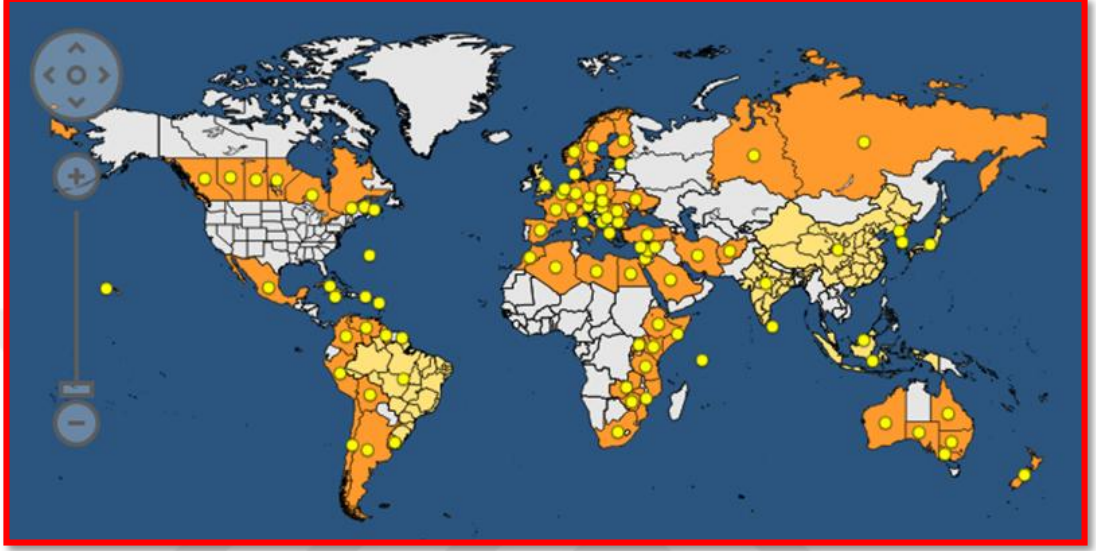
Çizelge 1.4. Ülkemizde yumuşak ve sert çekirdekli meyvelerde görülen fungal, bakteriyel ve viral hastalıklar ile hastalık etmenleri (Anonim 2008)

Fungal Hastalıklar	
Hastalık ismi	Hastalık Etmeni
Armillaria kök çürüklüğü	<i>Armillaria mellea</i> (Vahl)
Rosellinia kök çürüklüğü	<i>Rosellinia necatrix</i> (Prill)
Elma kara lekesi	<i>Venturia inaequalis</i> (Cke Wint.)
Armut lara lekesi	<i>Venturia pirina</i> (Aderh.)
Elma memeli pası	<i>Gymnosporangium confusum</i> (Plowr.)
Ayva ve armutta kahverengi leke	<i>Diplocarpon mespili</i> (Sor.)
Elma küllemesi	<i>Podosphaera leucotricha</i> (Ell. et al.)
Meyve monilyası	<i>Monilinia fructigena</i> (Honey)
Elma meyve çürüklüğü	<i>Alternaria alternata</i> (Fr. Keissler)
Eriklerde cep hastalığı	<i>Taphrina pruni</i> (Fuck. Tul.)
Kiraz ve vişnede yaprak lekesi	<i>Blumeriella jaapii</i> (Rehm.)
Meyve monilyası (mumya)	<i>Sclerotinia fructigena</i>
Yaprakdelen (çil)	<i>Wilsonomyces carpophilus</i> (Lév.)
Şeftali karalekesi	<i>Cladosporium carpophilum</i> (Thuem)
Şeftali küllemesi	<i>Sphaerotheca pannosa</i> var. <i>persicae</i>
Şeftali yaprak kıvrıcılığı	<i>Taphrina deformans</i> (Berk)
Bakteriyel Hastalıklar	
Hastalık ismi	Hastalık Etmeni
Kök kanseri	<i>Rhizobium radiobacter</i> (<i>Agrobacterium tumefaciens</i>)
Ateş yanıklığı	<i>Erwinia amylovora</i> (Burrill)
Acı benek	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>papulans</i>
Tomurcuk yanıklığı	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> (Van Hall)
Kabuk kavlaması	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> (Van Hall)
Saçak kök	<i>Agrobacterium rhizogenes</i> (Riker)
Bakteriyel dal yanıklığı	<i>Erwinia stewartii</i> (Smith)
Sert çekird. meyvelerde bakteriyel kanser	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> (Van Hall)
Sert çekirdekli meyvelerde zamklanma	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>morsprunorum</i> (Wormald)
Viral Hastalıklar	
Hastalık ismi	Hastalık Etmeni
Elma yaprak klorotik leke virüsü	Apple chlorotic leaf spot virüs (ACLSV)
Elma mozaik virüsü	Apple mosaic ilarvirus (ApMV)
Elma gövde çukurlaşma virüsü	Apple stem grooving virüs (ASGV)
Şarka virüsü	Plum pox potyvirus (PPV)
Kiraz yaprak kıvrılma virüsü	Cherry leafroll nepovirus (CLRV)
Erik cücelik virüsü	Prune dwarf ilarvirus (PDV)

Bu hastalıklar içerisinde, yumuşak ve sert çekirdekli meyvelerde ekonomik kayba neden olan en önemli hastalığı *Rhizobium radiobacter* (*Agrobacterium tumefaciens*)'in neden olduğu kök kanseri hastalığıdır. Kök kanseri ağaçların, üzüm bağlarının ve odunsu bitkilerin köklerinde ve gövde tabanında sıklıkla gözlenebilen anormal ur benzeri büyümelere verilen isimdir. *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*), *Agrobacterium* cinsi içerisinde yer alan önemli bir bitki patojenidir.

Hastalık ile ilk kayıt; Fridiano Cavara adlı araştırmacı tarafından 1897 yılında İtalya'nın Napoli Kraliyet Botanik Bahçeleri'nde bulunan asma gövdesinde oluşmuş ur yapısı ve buna sebep olan etmenin bir bakteri (*Bacillus ampelopsorae*) olduğunu ayrıntılı olarak anlatmıştır (Cavara 1897a, 1897b). Bunu takiben Hedgcock (1904, 1910) asmalarda gal oluşumuna neden olan bir bakteri izole ettiğini bildirmiştir; ancak Ancak bu iki literatür kaynak yeterince değer görmemiştir. Literatürde en fazla referans Smith and Townsend (1907)'in bakteriyi izole edip *Bacterium tumefaciens* olarak adlandırdıkları çalışma olmuştur. Smith (1911)'de hastalık üzerinde yoğun bir şekilde çalışarak *B. tumefaciens*'in çok sayıda otsu bitkide de kök kanseri oluşumunu indükleyebileceğini göstermiştir. İlerleyen süreçte bakterinin ismi *Pseudomonas tumefaciens* olarak (Duggar 1909), sonra *Phytomonas tumefaciens* (Bergey *et al.* 1923), bunu takiben *Polymonas tumefaciens* (Lieske 1928), ve en son *Agrobacterium tumefaciens* (Conn 1942) olarak değiştirilmiştir. *P. tumefaciens*'in yaşam döngüsünün değişen aşamaları Stapp and Bortels (1931) tarafından tarif edilmiştir. Smith (1911) bu hastalık üzerine yoğun olarak çalışmış ve *B. tumefaciens*, çok sayıda otsu bitkide kök boğazı kanseri oluşumuna neden olabileceğini ortaya koymuştur. Dünya'da etmenin meydana getirdiği urlara farklı ülkelerde farklı isimler verilmiştir (Fabre and Dunal 1853; Fletcher 1890; Kado 2014); fakat en son fidan üreticileri, çiftçiler ve uzmanlar kök boğazı kısmında ur oluşumuna sebep olan hastalığın meydana geldiği bölgeden dolayı hastalığa kök ve kök boğazı kanseri (Crown Gall) ismi verilmiştir (Kado 2014). Patojen, Dünya'da yaygın olarak görülen, bitki patojeni bakteriler içerisinde en geniş konukçu dizisine sahip, fidan yetiştiriciliğinde üretimi sınırlayan, ekonomik kayıplara sebep olan önemli bir hastalıktır (Lippincot *et al.* 1981; Penyalver *et al.* 2000). Hastalığın yaklaşık 77 ülkede yayılım gösterdiği belirlenmiş ve görüldüğü ülkeler Şekil 1.2'deki Dünya haritasında

işaretlenmiştir. Hastalık etmeni, *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*), dünyada moleküler bitki patolojisinde ilk on bakteri içerisinde yer almaktadır (EPPO 2019).



Şekil 1.2. Kök kanseri etmeninin dünyadaki yayılışı (EPPO 2019)

Hastalığın varlığı ülkemizde ilk kez İzmir’de şeftali, erik ve ayvalarda, sonra Edirne’de vişne, elma ve amut ağaçlarında görülmüştür. Bunları takiben yapılan çalışmalar sonucu hastalığın ülkemizin çoğu bölgesinde mevcut olduğu belirlenmiştir (Karaca 1977). Yumuşak ve sert çekirdekli meyveler (Bozkurt ve Soylu 2011; Aysan *et al.* 2003) dışında süs bitkilerinden krizantem ve gülde de varlığı tespit edilmiştir (Öden 1991). Bunun sonucunda daha önce karantinaya tabi olan etmen yaygın olarak bulunduğu gerekçesiyle zirai karantina listesinden çıkarılmıştır (Anonim 2009).

Kök kanseri hastalığı ekonomik anlamda dikotiledon bitkilerden yaklaşık 140 cins 100’den farklı bitki familyasındaki bitkilerin kök kanserine duyarlı olduğu ve büyük kayıplara sebep olduğu [meyve ağaçları (badem, elma, kayısı, kiraz, şeftali, armut, erik, ceviz vb.), yaban mersini (ahududu, yabanmersini vb.), üzüm ve çok çeşitli süs bitkileri (krizantemler, güller, kavaklar, vb.)] bildirilmiştir (El-Fiki and Giles 1981; Braun 1982; Cooksey and Moore 1982; Kerr and Tate 1984; Lopez *et al.* 1987; 1989; Moore and Canfield 1996; Martı *et al.* 1999; Collins 2001; Gupta *et al.* 2010). Ayrıca *R.*

radiobacter (*A. tumefaciens*)'in tüm bitki türlerinin mekanik inokülasyonu ile kolayca ur oluşumunu indüklediği bilinmektedir (Kado 2010). Monokotil bitkiler içerisinde sadece Liliales takımının bazı üyeleri bu hastalığa karşı hassas olup bu takım haricindeki bitki türleri ve baklagil bitki türlerinin konukçusu değildir (Campillo *et al.* 2012).

Hastalık bitkilerin kök ve kök boğazında neoplastik belirtiler içerisinde yer alan ur oluşumu ile karakterize edilir. Uurlar, ana kök boyunca toprak seviyesinde veya altında oluştuğu için kök boğazı uru olarak isimlendirilmiştir. Konukçu bitkide bakterinin bulunduğu yerdeki parankima hücrelerinin kontrolsüz büyümesi, bölünmesi ve aşırı çoğalması sonucu başlayan hastalığın ilk belirtisi küçük uurlardır. Toprak üstünde oluşan uurların yüzeyi pürüzsüz ya da çok az çatlaksı görünümde olabilir. Hastalık önce gövde ve köklerin özellikle toprak yüzeyine yakın bölgelerinde küçük ve hızlı aşırı büyümeler şeklinde kendini gösterir. İlk başta açık krem, beyaz ya da ten rengi yumuşak uurlarken ilerleyen zamanlarda dış dokuların yüzeyindeki hücrelerin çürümesiyle kahverengimsiyaha döner. Daha sonra bitkinin kök ya da gövdesini sarararak dışa doğru yayılır. Bu uurlardan bazıları zamanla çürüyerek aktivitesini yitirirken, bazıları takip eden sezonda herhangi bir yüzeyinden tekrar taze gelişimler gösterebilir. Bitkilerde ur oluşumu dışında; bodurlaşma, küçük ve klorotik yaprak çıkarma gibi belirtilere de neden olabilir. Bu belirtilerin sonunda bitkilerin tamamen kurummasına ve ölümüne sebep olmaktadır. Fidancılık sektöründe ve meyve bahçelerinde yoğun bulaşıklık ile karşı karşıya kalındığında üretime son dahi verilebilmektedir (De Cleene and De Ley 1976; Saygılı vd 2008). Kök boğazı uru zararı ile ilgili literatürde çok farklılıklar bulunmaktadır. İzolatların virülenslik derecelerindeki farklılıklardan kaynaklanmaktadır (Htay and Kerr 1974; Moore 1976; Schroth *et al.* 1988).

R. radiobacter (*A. tumefaciens*), gram negatif, yaklaşık 1,5-3 µm uzunluğunda 0,4-0,8 µm çapında çubuk şekilli, genellikle tek tek veya kısa zincirler halinde bulunan, hareketli, 2-4 adet peritrik kamçıya sahip, toprak kökenli, spor oluşturmeyen, optimum 25-28°C sıcaklıkta gelişen, 37°C'de virülanslığını kaybeden bir bakteridir (Romanenko

and Perepnikhatka 1984). Oksijenli solunum yapan etmen denitrifikasyon yoluyla oksijensiz solunum yapma yeteneğine de sahiptir (Baek *et al.* 2008).

Etmen Nutrient agar (NA) üzerinde karakteristik olarak küçük, dairesel, oval, dikdörtgen, parlak, mat opak veya yarı saydam dışbükey, yumuşak kenarlı beyaz koloniler oluşturur (Jindal *et al.* 1990). Katalaz pozitif ve genellikle oksidaz ve üreaz pozitif özelliktedir. Karbon kaynağı olarak birçok karbonhidatı, organik asit tuzlarını ve aminoasitleri kullanabilir ancak selüloz, nişasta ve agarı kullanamazlar. D-glikoz, D-galaktoz ve diğer karbonhidrat içeren mineral tuz içeren besiyerinde asit üretirler. Litmus milk besiyerini alkaliye dönüştürebilirler. Etmen belirli ortamlarda kapsül oluşturan, karbonhidrat içeren ortamda genelde ekstraselüler polisakkarit üretebilen, jelatini sulandırmayan, nitrata nitrite indirgeyebilen, laktoz'dan 3-ketolaktoz üretebilen, nükleer maddenin yeniden birleştirilmesi ve ayrılmasının gerçekleştiği eşeyli aşamada yıldız şeklindeki düzenlemeleri oluşturabilen bir bakteridir (Agrios 1997). Aşırı duyarlılık reaksiyonunda (HR) sonuç vermeyen ve infiltrasyon yapılan bölgede tipik sarı renkte klorozise sebep olan bir bakteri türüdür (Kado and Crosa 1994).

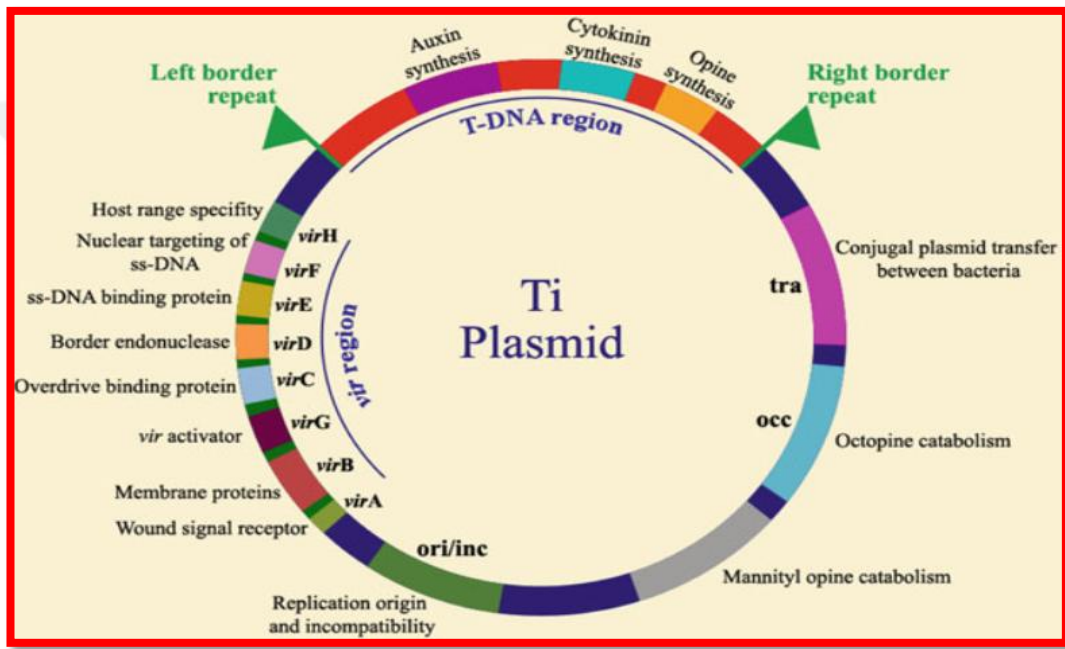
R. radiobacter (*A. tumefaciens*); *Proteobacteria* şubesinde, *Alphaproteobacteria* sınıfında, *Rhizobiaceae* familyasında yer almaktadır fakat sınıflandırma çalışmaları devam etmektedir. Young *et al.* (2001) *A. tumefaciens*'in *Rhizobium* cinsi içerisinde yer alması gerektiğini bildirmişlerdir ancak Lindstrom and Young (2011)'de *Agrobacterium* biovar 1'in birkaç genomik tür veya genomovardan oluşan bir kompleks olmasından dolayı *Agrobacterium* cinsi içerisinde yer alması gerektiğini belirtmişlerdir. Patojen yaygın olarak kullanıldığı ismi *A. tumefaciens* olarak anılmaktadır.

R. radiobacter (*A. tumefaciens*), toprakta saprofit olarak uzun yıllar yaşayabilen, yağmur, sulama suyu ve toprak işleme aletleriyle bulaşabilen bir etmendir (Nester 2015). Etmenin bitkide ur oluşumuna neden olabilmesi için yaralanması gereklidir. Yara bölgesinden dokuyu tamir etmek için salgılanan çeşitli kimyasal sinyaller (fenolik bileşikler) ile patojen bakterinin yara bölgesine çekilmesini sağlar (Heath *et al.* 1995). *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*)'i diğer bakterilerden ayırt edici özelliği tüm virulent

türlerinde bulunan, ekstrakromozomal yapı olarak bilinen ve duyarlı bitki hücrelerine onkogenik DNA segmentini aktarabilen, ur oluşumunu indükleyebilen Ti (Tumor Inducing Plasmid) halkasal plazmitine sahip bir bitki patojeni olmasıdır.

Ti-plazmiti, 195 protein kodlayan 196 gene sahip, ~20 kbp (206,479 nükleotid) uzunluğundadır. Bitki genomuna uyum sağlayan bir ya da daha fazla T-DNA (Transfer DNA) bölgesi, bir Vir bölgesi, bir replikasyon merkezi, konjugatif transfer bölgesi ve opin katabolizması için gerekli olan genlerin olduğu bölgeleri içerir (Şekil 1.3). T-DNA bölgesi, Ti plazmit üzerinde bulunan hareketli, sağ ve sol sınır dizileri ile ayrılmıştır. T-DNA bölgesi 10-30 kb boyutundadır dolayısıyla Ti plazmidinin % 10'undan daha az kısmını oluşturur. Bazı Ti plazmitleri bir T-DNA bölgesi içerirken, bazıları birden fazla T-DNA bölgesi içerebilir. T-DNA sağ ve sol sınır bölgesi 25 bp uzunluğunda ve yüksek homoloji gösteren sekanslardan oluşur. Bu sınır bölgeler arasında kalan bölge arasındaki herhangi bir DNA parçası bitki genomuna transfer edilecek bölgeyi kapsar (Yadav *et al.* 1982; Michel *et al.* 1990; Zupan and Zambryski 1995). Ayrıca T-DNA bölgesi, oksin ve sitokinin hormonlarının sentezinden sorumlu gen bölgelerini ve opin olarak bilinen bitki metabolitlerinin sentezinden sorumlu gen bölgelerini içerir. Oksin ve sitokinin hormonları, bitki hücresinde büyüme ve gelişmeyi düzenledikleri gibi fazla salgılandıklarında da bitkide kontrolsüz hücre çoğalmasına yani ur oluşumuna sebep olurlar. Opinler doğada nadir olarak görülürler ve düşük moleküler ağırlıklı çeşitli aminoasit ve şeker-fosfat türevleridir. Kimyasal olarak, opinler iki yapısal sınıfa giren çeşitli bir gruptur. Agrocinoines, şeker fosfodiesterleridir. Diğer opinler ikincil amin türevleridir. Nopalin ve oktopin, yaygın olarak bulunurken, lizopin, süksinamopin, lösinopin, cucumopin, heliopin, krisopin, mikimopin, manopin olmak üzere çeşitli opinler de tanımlanmıştır. Opinler urlar içinde sentezlenir ve hücre dışına salgılanırlar. Bunlar bakteriler için majör bir karbon / azot kaynağı olarak kullanılabilir (Firmin and Fenwick 1978; Moore *et al.* 1997). Ti plazmitleri opin tipine göre sınıflandırılırlar. Nopalin ırkları yaklaşık 20kb büyüklüğünde bir T-DNA bölgesine sahipken, oktopin ırkları 2 T-DNA bölgesi, TL (14kb) ve TR (7kb) içerirler. Sadece TL bölgesi ur oluşturur, TR bölgesi opin biyosentezi için gerekli genleri taşır. Ti plazmid, opin sentezi için genleri bitki hücrelerinin yanı sıra karşılık gelen katabolizma genleri ile taşır. Ti

plazmit üzerinde bulunan opin katabolizması genleri, bakteriye opin alınımı ve parçalanmasında görev alırlar. Bu genler T-DNA bölgesinde bulunmaz, dolayısıyla bitki genomuna aktarılmaz. Ti plazmit üzerinde bulunan vir genlerinin ürünleri T-DNA bölgesinin bitki genomuna transferi ve bağlanması için gereklidir. En az 8 vir gen operonu bulunmaktadır. Ori bölgesi ise, plazmitin *Agrobacterium* içinde çoğalması (replikasyonu) için gereklidir (Christie and Gordon 2014).



Şekil 1.3. Ti plazmitin genetik haritası (Özyiğit 2012)

A. tumefaciens'in bitkiyi enfekte etme mekanizması diğer bitki bakteri patojenlerinden çok farklıdır. Braun (1958)'de *Agrobacterium* ile enfekte olmuş hücrelerin alışılmadık beslenme özelliklerine sahip olduğunu ve bakterinin enfeksiyonu başlatmak için gerekli olduğunu, ancak urun büyü devam etmesi için gerekli olmadığını göstermiştir. Etmen topraktan veya enfekteli bitkilerden yağmur sıçratması, sulama suyu, tarım makineleri, toprak işleme aletleri, rüzgar, böcekler ve üretim materyalleri ile yayılır (Lehoczky 1968). Patojenin bir bitkiyi enfekte edebilmesi için mutlaka bitkinin yaralanması veya lentisellerden giriş yapması gerekmektedir (Penyalver *et al.* 2000). Bitkide urlar etmenin ürettiği enzim ve toksinler sayesinde değil bitkinin genetik yapısının bozulması sonucu oluşur. Kerr (1991) tarafından özetlendiği gibi, kök kanseri hastalığının

oluşumunun aşamaları: (a) yaralı dokudan salgılanan bazı fenolik bileşiklere karşı bakterilerin kemotaksisi; (b) bakterilerin bitki hücrelerine bağlanması ve sabitlenmesi; (c) vir genlerinin bitki fenolik bileşikleri tarafından uyarılması; (d) T-DNA'nın işlenmesi; (e) T-DNA'nın bitki genomuna entegrasyonu; (f) T-DNA'da kodlanmış bitki hormonlarının sentezi; (g) hızlı bitki hücre bölünmesi sonucu ur oluşturma; (h) opinlerin sentezidir. Böylece bitki dokularından içeri giren *A. tumefaciens* bakterileri bitkinin genetik yapısını değiştirerek oksin ve sitokinin grubu hormonlarının sentezini aktifleştirerek kontrolsüz hücre çoğalmasına ve kök bölgesinde urların meydana gelmesine neden olur. Urlar 21°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda birkaç hafta ile birkaç ayda görülebilir. Küçük ve az miktarda gelişmeye başlayan urların sayısı ve büyüklüğü zamanla artar. Ur gelişimi 14°C'nin altında yavaşlar ve 10°C'nin altında tamamen durur. 33-35°C'nin üzerinde enfeksiyon engellenir. Patojen bakteri urlardan toprağa veya suya geçerler ve yaralı yeni bitki dokusunu enfekte ederler. Ayrıca birçok bitkinin bulaşık kökleri sayesinde bir bölgeden diğerine süratle bulaşabilmektedirler (Gloyer 1934).

Bakterinin farklı olan zarar şeklinden dolayı da mücadelesi neredeyse imkansızdır (Lipp-Nissinen 1993). Hastalığın mücadelesinde hastalıksız üretim materyali kullanmak (Peluso *et al.* 2003), tolerant anaç seçimi (Goodman *et al.* 1993), bitkiyi yaralamaktan kaçınmak (Vrain and Copeman 1987), budama aletlerinin dezenfeksiyonuna dikkat etmek (Cazalles *et al.* 1991), ağır ve nemli topraklara ekim yapmamak (Gloyer 1934), sulama suyunun mümkünse kuyu suyu olması (Küsek ve Aysan 2013), ekim öncesi toprak fumigasyonu (Ross *et al.* 1970), toprak solarizasyonu (Gupta and Kamal 2006) ve ürün rotasyonu (*R. radiobacter* (*A. tumefaciens*)'in popülasyonunu azaltmak için), gibi kültürel önlemler alınabilir. Kimyasal mücadele olarak, krezot bazlı bileşikler, bakır bazlı çözeltiler ve sodyum hipoklorit gibi güçlü oksidantlar geçici olarak etkilidir. Siegler and Bowman (1940)'a göre %2,5 sodyum hipokloritle şeftali tohumlarını daldırma usulüyle uyguladığında etkili sonuç alınmasına rağmen, Schroth *et al.* (1971)'in yaptıkları çalışmada %1'lik sodyum hipokloritle daldırma işleminde etkili bir sonuç elde edilememiştir. Hastalığa karşı laboratuvar koşullarında antibiotik uygulamasının hastalığı engellediği bildirilmiştir fakat antibiotik kullanımının

yasaklaması ve istenmeyen etki gösterebilmesinden dolayı iyi bir mücadele yöntemi değildir (New and Kerr 1972). Ayrıca kimyasal eradikant uygulama yöntemleri yoğun iş gücü, düşük etki, yüksek maliyet ve yüksek fitotoksisite gösterirler. Sonuç olarak hastalıkla mücadele de kültürel önlemlerin yetersiz kalması, kimyasal mücadelenin sınırlı ve dezavantajlı bir yöntem olması alternatif mücadele yöntemi olan biyolojik mücadeleyi önemli hale getirmiştir (Kotan vd 2009).

Biyolojik mücadele; çevre ve insan sağlığına yan etkisi olmayan, ekonomik olarak düşük maliyetli, geniş spektrumlu ve tüm çevre şartlarında kullanılabilecek biyolojik organizmalar ya da onların ürettikleri metabolitler belirlenerek zirai üretim alanlarında (tarla, sera ve depo koşullarında) bitki hastalıklarının ortadan kaldırılması veya popülasyonlarının baskı altına alınmasını amaçlayan tarımsal savaşım yöntemidir (Chet *et al.* 1993).

Biyolojik mücadelenin etkililiğini sağlayan dört temel mekanizma vardır. Bu mekanizmalar biyolojik mücadele ajanı ile patojen ve ortamdaki diğer mikroorganizmalar arasındaki ilişkiye dayanır. Antibiyozis, besin elementleri ve habitat yönünden rekabet, hiperparazitizm, konukçu bitkinin sistemik dayanıklılık mekanizmasının teşviki olmak üzere sınıflandırılır (Kotan vd 2009; Handelsman and Stabb 1996).

Antibiyozis, bir organizmanın başka bir organizmayı antibiyotik olarak isimlendirilen, ürettiği metabolitlerle gelişimini engellemesi veya organizmayı öldürmesidir (Bora ve Özaktan 1998). Biyolojik mücadelede ilk tanımlanan antibiyotik, *Pseudomonas fluorescens* 2-79 ve *P. aureofaciens* 30-84 izolatlarının ürettiği phenazine olmuştur (Andrade *et al.* 1994). Bir organizma tek bir antibiyotik üretebileceği gibi birden fazla da üretebilir. Bazı araştırmacıların bu kullanılan biyokontrol organizmaların aşırı kullanılmasıyla ürettikleri antimikrobiyal kimyasallara karşı patojenler dayanıklı alt tür veya strain geliştirebilecekleri yönünde görüşler mevcuttur (Davies 1994). Fakat bazı araştırmacılar bu dayanıklılığın kimyasallara karşı oluşan dayanıklılıktan daha yavaş gelişeceğini belirtmişlerdir (Nikaido 1994).

Organizmalar doğada besin elementleri ve habitat yönünden sürekli rekabet içerisindeyler. İki ya da daha fazla mikroorganizma aynı şeye ihtiyaç duyabilir. Bunu yalnızca birinin kullanması ve diğerinin bundan faydalanamaması ve gelişiminin baskılanması olayına rekabet denilmektedir. Etkili bir biyolojik mücadele ajanı yüksek rekabet yeteneğine sahip olmalıdır (Paulitz 1991). Patojen ve biyolojik mücadele ajanı arasında iki büyük element arasında büyük rekabet vardır. Bunlar karbon (C) ve demir (Fe)'dir (Handelsman and Stabb 1996). Biyolojik mücadele ajanı olabilecek organizmalar rizosfere kolonize olurlar ve bitkinin salgılamış olduğu selüloz, hemiselüloz, pektin ve benzeri (vb.) kompleks karbonhidratları parçalarlar (Foster *et al.* 1983). Kompleks karbonhidratları parçalayan biyolojik mücadele ajanı bakteriler mikrobiyal rekabette üstün gelerek patojenin C kaynağı kullanımını sınırlar. Böylece daha hızlı popülasyonunu artırıp hızlı kolonize olurlar. Biyolojik mücadele ajanı ile patojen arasındaki rekabette önem arz eden bir diğer element Fe'dir. Mikroorganizmalar Fe ihtiyaçlarını karşılamak için siderefor proteinini kullanırlar. Siderefor, Fe^{+3} iyonuna bağlanır ve oluşan siderefor-demir kompleksi bakteri hücresine taşınır. Böylece patojenin Fe^{+3} iyonundan faydalanmasını engellenir ve patojen baskı altına alınabilir. Fe yönünden zayıf topraklarda siderefor üreten mikroorganizma, patojenin Fe alımını engelleyerek patojeni baskı altına almaktadır (Leong 1986).

Hiperparazitizm, canlı mikroorganizmaya karşı başka canlı organizmanın kullanıldığı bir mücadele şeklidir. Parazitizmin esası hücre duvarını eriten ya da parçalayan enzimlerin üretilmesine dayanır. Hiperparazitizmde konukçu ve parazit arasında yakın bir ilişki kurulması gerektiğinden bu yöntem doğada çok yavaş gerçekleşir. Bu nedenle hiperparazitizm antagonistlerinin başarısını arttıran bir etken olarak kalmaktadır. Hiperparazitik etki amaçlı kullanılan biyolojik mücadele ajanları, ürettikleri hidrolitik enzimler ve/veya direk enfeksiyonları ile patojenlerin hücrelerini parçalayarak onların popülasyonlarını baskırlar (Fridlender *et al.* 1993). Proteaz, sellüloz, β -1,3 glukanaaz ve kitinaaz gibi hidrolitik enzimleri üreten birçok bakteri ve fungus hiperparazit olarak tarımsal savaşta kullanılmaktadır. *Serratia marcescens*'in *F. oxysporium* ve *Sclerotinia rolf*'ye, *Bacillus megaterium*'un ise *Puccinia graminis* gibi fungal patojenlere karşı etkili hiperparazitik biyoajan oldukları belirtilmektedir (Whipps 1992).

Sistemik dayanıklılık biyolojik mücadele ajanı olabilecek mikroorganizmalar kullanılarak konukçu bitkilerin sistemik dayanıklılık mekanizmalarının aktif hale getirilmesine denir. Kendi içinde; çapraz koruma, sistemik indüklenmiş dayanıklılık (Systemic Induced Resistance, ISR) ve sistemik kazanılmış dayanıklılık (Systemic Acquired resistance, SAR) olmak üzere 3 grupta ele alınmaktadır (Saygılı vd 2008).

Çapraz koruma, biyolojik mücadele ajanı olan organizmalar tarafından konukçu içinde antibiyozis, rekabet, hiperparazitizm gibi mekanizmalardan birisi ya da bunların birkaçının aynı anda kullanılmasını temel alır ve patojenin gelişimi baskılanır (Bora ve Özaktan 1998).

İndüklenmiş uyarılmış dayanıklılık, patojen olmayan bir mikroorganizmanın bir biyolojik mücadele ajanı gibi ya da zayıf virülent bir patojenin gerçek bir patojen gibi davranarak konukçu bitkinin savunma mekanizmasını aktif hale getirip daha sonradan gelecek herhangi bir saldırıya karşı bitkiyi duyarlı hale getirmesine denir (Bora ve Özaktan 1998). Bu olay salisilik asitin hücreler arası boşlukta birikimine bağlıdır. Patojenite ile ilgili Pathogen Related (PR) proteinlerini kodlayan genlerin aktivasyonu ile karakterize edilir (Cook and Baker 1983).

Sistemik kazanılmış dayanıklılık, bir patojenin primer ve sekonder enfeksiyonlarına karşı, bitkilerde ya var olan dayanıklılığın teşvik edilmesi ya da bitkide doğal olarak mevcut olmayan ancak biyolojik mücadele ajanı organizmalar veya kimyasalların uyarısı ile sonradan fizyolojik olarak kazanılan, bitkinin patojen enfeksiyonuna karşı gösterdiği bir reaksiyona denir (Shulaev *et al.* 1995). Bakteriler tarafından indüklenen SAR, toprak, tohum ve yaprak orjinli bitki hastalıklarına karşı kullanılan etkili bir yöntemdir. Konukçu bitkiyi uzun süre koruması, sistemik oluşu, aşı ile nakledilebilmesi, patojenlerin yeni izolat oluşumuna karşı daha sabit olması ve indüklenmiş (uyarılmış) dayanıklılık gösteren bitkilerden ekstrakt edilen bitki aktivatörlerinin tohum ilaçlaması olarak kullanılabilmesi SAR'ın avantajlarındandır.

Bitkiler patojen mikroorganizmalara karşı etkili savunma mekanizmaları geliştirmiştir (Hammond-Kosack and Jones 1996; Nimchuk *et al.* 2003). Bitki hastalıklarını önlemede kullanılan biyolojik mücadele ajanlarında sistemik dayanıklılığı teşvik ederler (Falahian *et al.* 2007; Surekha *et al.* 2013). Bitkilerde oluşan bu stres koşulları altında yüksek seviyede üretilen reaktif oksijen türleri (ROT)'nden hücreyi korumak amacıyla enzimatik olan (katalaz, süperoksit dismutaz, guaiakol peroksidaz, askorbat peroksidaz) birçok antioksidanlar içerirler (Gechev *et al.* 2006; Gill and Tuteja 2010). Bu antioksidanlar ya ROT'ları süpürerek ya da oluşumlarını engelleyerek etkili olurlar. Stres koşulları altında antioksidan enzimlerle ROT arasındaki ilişkiye ait birçok araştırma rapor edilmiş ve bitkinin yaşamını devam ettirebilmesi artan ROT bileşiklerini süpürebilme kapasitesi ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (Türkan *et al.* 2005; Yıldıztuğay *et al.* 2014). Süperoksit dismutaz (SOD) oksidatif strese karşı ilk savunma hattı olarak adlandırılan reaksiyonu katalizler (Guemouri *et al.* 1991). SOD, süperoksit radikalini (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve moleküler oksijene çevirebilen bir metaloenzimdir (Minibaeva and Gordon 2003; Roach 2009). Aktif bölgesindeki metal kofaktörlere göre (Fe-SOD, Mn-SOD, Cu-ZnSOD) adlandırılması yapılan SOD'un bitki hücrelerinde; plastit, mitokondri, peroksizom, kloroplast, sitoplazma ve ekstrasellüler alanlarda bulunmaktadır (Gharari *et al.* 2014). Birçok çevresel ve biyotik streslerde hücrel SOD miktarının üretiminde artış olduğu belirlenmiştir (Hernandez *et al.* 1995; Minibaeva and Gordon 2003). Antioksidan enzimlerden bir diğeri katalaz (CAT)'dır. Bu enzim yüksek konsantrasyondaki H_2O_2 'nin 2 elektronunu kullanarak su ve oksijene indirgenmesini katalizleyen demir porfirin içeren tetramerik ve yüksek molekül ağırlığına sahip bir enzimdir (Mcclung 1997; Frugoli *et al.* 1998; Chaudiere and Iliou 1999). Pek çok bitki hücresinde enzimin büyük bir kısmı, H_2O_2 'nin yüksek olduğu peroksizomlarda bulunur. Bitki hücrelerinde glioksizom ve mitokondri içerisinde de bulunurken kloroplastlarda bulunmaz (Ali and Alqurainy 2006). CAT'ın bitki dokusunda H_2O_2 'nin uzaklaştırılmasında önemli bir göreve sahiptir (Steel and Greer 2005). Antioksidan enzimlerden bir diğeri guaiakol peroksidaz (POD) enzimidir. POD, H_2O_2 'yi kullanarak fenoller ve hidrokinonlar gibi çok sayıda aromatik bileşenlerin dehidrojenasyonunu katalizleyen ve HEM prostetik grubuna sahip bir proteindir (Banci 1997; Kim *et al.* 2000). Düşük sıcaklık, tuzluluk, patojenler, UV gibi çeşitli stres faktörlerinden yüksek seviyede etkilenen POD aktivitesi, bu enzimin stres enzimi olduğunu kanıtlamıştır (Lee

and Lin 1996; Kim *et al.* 2000; Saroop *et al.* 2002). Bitkisel POD; yapraklar, yaralanan gövdeler, kotiledon yapraklar ile çiçek saplarında bulunmuş ve bu doku hücrelerinin nükleus, mitokondri, ribozom, hücre membranları ve apoplastında bulunabildiği tespit edilmiştir (Hamed *et al.* 1998; Kim *et al.* 2000; Taşgın *et al.* 2006). Askorbat peroksidaz (APX) enzimi indirgeyici olarak iki molekül askorbatı kullanarak H_2O_2 'ye detoksifiye eden enzimdir (Noctor and Foyer 1998). Hücre içerisinde kloroplast stromasında, tilakoit zarında, sitozolde, glioksizom zarında ve mitokondride bulunurlar (Bunkelmann and Trelease 1996; Caverzan *et al.* 2012). Askorbat peroksidazlar en yaygın çalışılan guaiakol peroksidazlara büyük oranda benzerlik göstermesine rağmen, H^+ vericisi olarak askorbata olan yüksek ilgileri nedeniyle onlardan ayrılırlar. (Nakano and Asada 1987; Ranieri *et al.* 2001). Liang *et al.* (2019)'de yaptıkları çalışmada *A. tumefaciens* ile enfekte edilmiş Gisela-6 kiraz anacının savunma mekanizmasında rol oynayan enzim miktarlarına bakılmış ve SOD, POD, APX enzim miktarlarında artış olduğunu tespit etmişlerdir.

Biyolojik mücadele ile ilgili ilk çalışmalar 1961 yıllarında başlamış (Ross 1961) ve günümüze kadar yapılan başarılı çalışmalar sayesinde, birçok ülkede kültür bitkilerindeki hastalıklara karşı etkili olan fungal ve bakteriyel biyoajanlar ya da bunların ürettikleri metabolitler ticari olarak üretilmiş ve biyopestisit olarak kullanılır duruma getirilmiştir (Anonymous 2000).

R. radiobacter (*A. tumefaciens*)'in neden olduğu kök kanseri hastalığına karşı ur oluşturmeyen *A. radiobacter* K-84 suşu ve antibiyotik Agrocine 84'ü üreten genetik olarak elde edilmiş K 1026 (Kerr 1980; Jones and Kerr 1989) kök kanseri hastalığının biyolojik kontrolünde dünyada yaygın olarak kullanılmakta (Thomson 1986; Moore 1988; Ryder and Jones 1990; Tawfik 1990; Wang *et al.* 1991; Vicedo *et al.* 1993) ve farklı ticari isimlerde biyolojik ürün olarak üretimi yapılmaktadır. Fakat bu türler nopalın/agrocinopin A tipi patojenik *Agrobacterium*'ların neden olduğu urları etkili bir şekilde kontrol ederken birçok *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*) suşu ve *A. vitis* olarak adlandırılan biyotip 3 suşlarına karşı duyarsızdır (Utkhede and Smith 1990; Ophel and

Kerr 1990). Ekonomik açıdan önemli bazı bitkilerde kök kanserinin başarısız biyolojik kontrolü, alternatif antagonistik bakteri ihtiyacını vurgulamaktadır (Khmel *et al.* 1998).

Son yıllarda, yapılan çalışmalarda *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*)'in biyolojik mücadelesine yönelik yeni biyolojik mücadele ajanı bulunması amacıyla çalışmalar mevcuttur (Khmel *et al.* 1998; Otten *et al.* 2008; Kawaguchi 2009; Tolba and Soliman 2013). Ülkemizde biyolojik mücadele yöntemleri hakkında fazla araştırma yapılmış olmasına rağmen, bu hastalığın biyolojik mücadelesi üzerine bir adet araştırma makalesi varken biyolojik mücadele ajanı kullanılarak bitkilerde sistemik teşvik edilmiş dayanıklılık çalışmaları bulunmamaktadır. Bu tez çalışması ile dünyada ve ülkemizde yumuşak ve sert çekirdekli meyve türlerinin yoğun üretildiği ekolojilerde ciddi sorun oluşturan ve ürün kayıplarına sebep olan kök kanseri hastalığı etmeni *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*) ile mücadelede alternatif yöntemler arasında geçen biyolojik mücadele yöntemi ile hastalığı kontrol edebilecek yeni biyolojik mücadele ajanlarının bulunması ve etkili olan biyolojik mücadele ajanlarının hangi mekanizmayı kullandıklarının tespiti amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

R. radiobacter (*A. tumefaciens*), kök ve kök boğazında kansere neden olan bir bakteridir. Bakterinin Ti plazmitine sahip olması ve ekonomik öneme sahip bitkilerde büyük kayıplara neden olmasından dolayı bu konuda birçok çalışma yapılmıştır. Etmen ile ilgili epidemiyolojik çalışmalar, taksonomideki yeri, konukçu dizisi, bitkide oluşturduğu semptomlar, patojenite testleri ve mücadelesi hakkında yapılan önceki çalışmalara aşağıda yer verilmiştir.

2.1. *Rhizobium radiobacter* (*Agrobacterium tumefaciens*) ile İlgili Yapılan Epidemiyolojik Çalışmalar

R. radiobacter (*A. tumefaciens*)'in neden olduğu kök kanseri hastalığı, dünyanın her yerinde fidancılık sektöründe para ve iş gücü bakımından önemli kayıplara sebep olan bakteriyel bir etmendir (Lippincot *et al.* 1981; Lopez *et al.* 1982; Lopez *et al.* 1987; Moore 1988). Etmen sadece ekonomik öneme sahip olduğu için değil, aynı zamanda hayvanlarda görülen kansere benzer yönlerinden dolayı en yoğun araştırılan bitki hastalığıdır (De Cleene and De Ley 1976).

Smith and Townsend (1907) *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*)'in kök kanserine neden olduğunu belirlediğinden bu yana Dünya çapında tüm sert ve yumuşak çekirdekli meyveler, fındık ağaçları ve süs bitkileri yetiştiricileri tarafından sayısız, yüksek miktarlarda ekonomik kayıpların meydana geldiği pek çok vaka bilinmektedir. Hastalığın dünyada çoğu ülkede varlığı saptanmıştır (Alconero 1980; Sharma *et al.* 2004; Gupta *et al.* 2010).

Hastalığın dünyada görülme sıklığı farklı lokasyonlarda %4-97,5 arasında değişmekte olup, sert çekirdekli meyve fidanlıklarında ortalama %30 kayıplara yol açtığı belirlenmiştir (Gupta *et al.* 2010).

Urlu dokulardan *Agrobacterium* ilk olarak İtalya'nın Napoli kentinde Kraliyet Botanik Bahçelerindeki asma gövdelerinden izole edilmiştir (Cavara 1897) ve etmenin bitkiye genetik materyalini nasıl aktardığına dair birçok çalışma yapılmasına neden olmuştur. Ayrıca hastalık etmeni, Yunanistan (Psallidas *et al.* 1968), Hindistan (Durgapal *et al.* 1971), Avustralya (Htay and Kerr 1974), Büyük Britanya (United Kingdom) (Crosse *et al.* 1976), Kaliforniya (Schroth and Moller 1976), Oregon (Moore 1976), Kanada (Dhanvantari *et al.* 1976), Güney Afrika (Matthee *et al.* 1977), İtalya (Bazzi and Mazzucchi 1978), Fransa (Lopez 1978), USA (Kennedy and Alcorn 1980), İspanya (Lopez *et al.* 1987), İsviçre (Grimm 1987), Pakistan'ın kuzey bölgeleri (Wicks *et al.* 1993), Macaristan (Sule 1994), Japonya (Sawada *et al.* 1995), İsrail (Haas *et al.* 1995), Arnavutluk (Isufi and Myrta 1996), ABD (Moore *et al.* 1997), Almanya (Rezmer *et al.* 1999), Hollanda (Cubero *et al.* 2002), Ürdün (Hamed 2004), Hindistan (Sharma *et al.* 2004), Tunus (Rhouna *et al.* 2005), Arjantin (Alippi *et al.* 2006) ve Bangladeş (Islam *et al.* 2010) gibi ülkelerde de tespit edilmiştir.

Lehoczky (1968)'de kanserli dokuların çoğunlukla bitkinin ana kökünde ya da kök boğazında oluştuğunu ancak bazı bitkilerde (örneğin; asma, ahududu gibi) bitkinin toprak üstü aksamında da gelişebildiğini bildirmiştir.

Durgapal (1971)'de etmeni ilk izole eden ve *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*)'in kiraz, şeftali, armut ve erik bitkileri üzerindeki patojenitesini yaparak pozitif sonuç elde ettiğini rapor etmiştir.

Alconero (1978)'de Güney Caroline'da şeftali ağaçlarında (*P. persica* (L.) Batsch) hastalığın yüksek oranda bulunduğunu belirlemiştir.

Lopez *et al.* (1982a) asmada etmeni tanımlamışlardır. Hastalığın asma dışında kiraz, kayısı ve ceviz gibi meyve ağaçlarında da görülebileceğini ve hastalığın görülme sıklığının bazı durumlarda %90'na yakın kayıplara neden olabileceğini ifade etmişlerdir.

Lopez *et al.* (1982b)'de *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*)'in gül fidanlıklarında en fazla zarara uğratan etmen olduğunu belirlemişlerdir. *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*)'in ayrıca söğüt ve kavakta da zarar yaptığını tespit etmişlerdir (Lopez *et al.* 1987).

İspanya'da bir grup araştırmacı *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*)'in neden olduğu kök ve kök boğazı bölgesindeki ırların ekimi yapılan birçok tür (kayısı, badem, kiraz, erik, şeftali, şeftali-badem hibrit (GF 677), armut, ceviz, ahududu, asma, gül, kavak) üzerinde varlığını belirlemişler ve hastalığın görülme sıklığının mevsimlere, araziye bağlı olarak değiştiğini bildirmişlerdir (Lopez *et al.* 1987).

Lopez *et al.* (1987)'de anaçlar üzerinde yaptıkları çalışmada hastalığa maruz kalan anaçlardan; şeftali-badem melezi (GF 677), ardından şeftali fidanı, erik (*Myrobolan*), badem, armut, ayva ve elmanın klon anaçlarının hassas olduğunu belirlemişlerdir.

Hindistan'da hastalık ilk olarak 1940'lı yılların başlarında Uttaranchal, Pencap ve Keşmir'deki Kumaon Tepeleri'ndeki yumuşak çekirdekli meyvelerde Singh (Jindal *et al.* 1990) tarafından gözlemlenmiştir. Jindal and Sharma (1988), Himachal Pradesh'te bademleri enfekte eden *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*)'in olduğunu gözlemlemiştir. Sharma *et al.* (2004), Hindistan'ın sıcak bölgelerinde kök kanseri hastalığının meydana geldiğini ve Mandi bölgesindeki Palsehar'da kirazlarda hastalığın görülme sıklığının %100 olduğunu kaydetmişlerdir.

Garrett (1987b) kök kanseri hastalığından dolayı fidanlık materyallerinin hastalıktan etkilenip satılamayacak hale geldiğini ve fidanlık stoklarında yaklaşık %10-30 oranında kayıplar meydana geldiğini rapor etmiştir.

Bouzar *et al.* (1991)'de Cezayir'in en önemli meyve fidanı üretim bölgesinde inceledikleri fidanlıkların %99'unda kök kanseri hastalığını gözlemlemiştir. İncelenen 11 ağaç türü arasında hastalığın görülme sıklığının en yüksek olduğu şeftali (%5,39), badem (%3,43), kiraz (%1,50), elma (%1,47) ve zeytin (%1,30) iken, ayva ve incir ağaçlarının hiçbirinde kök kanseri hastalığının belirtilerini gözlemlememişlerdir.

Avrupa, ABD, Çin, Avustralya ve diğer ülkelerde üzüm yetiştiricileri, asmadaki kök kanseri hastalığından kaynaklı kayıpların %75-80'e ulaştığını bildirmişlerdir (Kerr and Panagopoulos 1977; You *et al.* 1986; Moore 1988; Schroth *et al.* 1988; Amberg 1991; Cazelles *et al.* 1991; Goodman *et al.* 1993).

Gupta *et al.* (2005b)'de şeftali ve kirazları enfekte eden *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*)'in biovar-1'in oluşumunu bildirmiş, biovar 1 ve 2 arasında bir ara ürün gibi özelliklere sahip bir *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*) izolatını acı bademde tanımlamışlardır.

Kim *et al.* (2005) Trabzon hurmasında kök kanserinin oluşumu ve epidemiyolojisini incelemişler ve Trabzon hurmasının şeftali ve hünnap ağaçlarına kıyasla daha hassas olduğunu belirlemişlerdir. Enfekte olmuş ağaçlarda ciddi şekilde verim azalışı olduğunu ve fidanlıklardan toplanan hurma fidanlarında bulaşıklık oranının %34 düzeyinde olduğunu rapor etmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar bulaşıklığın primer inokulum kaynağı olarak bulaşık fidanlar olduğunu kaydetmişlerdir.

Etmen ülkemizde hemen hemen her bölgede varlığı rapor edilmiştir (Öktem 1972).

İyriboz (1938)'de Ege Bölgesi, Ankara ve İstanbul'da hastalığın görüldüğünü bildirmiştir.

Kuntay (1942)'de patojenin bağlarda kök boğazı ve aşı yerlerinde, meyve ağaçlarının köklerinde urlar meydana getirdiğini tespit etmiştir.

Bremer (1948)'de hastalığın bağlarda görüldüğünü, Elliot (1951) etmenin konukçu dizisinin geniş olduğunu, Göksel (1953)'de hastalığın görülme sıklığının yüksek olduğunu bildirmişlerdir.

Bremer (1954)'te meyve ağaçlarının çoğunda kök kanserinin tespit edildiğini, Karaca (1956)'da kök kanserinin Anadolu'nun birçok şehrinde varlığını kaydetmişlerdir.

Öden (1991)'de İstanbul ve İzmir'de süs bitkilerinde yaptığı incelemelerde *Chrysanthemum* spp. ve *Rosa* spp.'de kök kanserinin bulunduğunu bildirmiştir.

Aysan ve Şahin (2003)'de gülde, Aysan *et al.* (2003)'de Ninfa çeşidi (*P. armeniaca*) kayısılarda kök kanserinin varlığını tespit etmişlerdir.

Bozkurt ve Soylu (2011), elma bahçelerinde kök kanserinin varlığının belirlenmesi ile ilgili bir çalışma yapmışlardır.

2.2. *Rhizobium radiobacter* (*Agrobacterium tumefaciens*)'in Sınıflandırmadaki Yeri

Kök ve kök boğazı kanseri ilk olarak 1853'te çeşitli bitki türlerini etkileyen neoplastik bir hastalık olarak tanımlanmıştır (Fabre and Dunal 1853). 1897'de, Fridiano Cavara, *Bacillus ampelopsoraes*'u asma bitkisinde kök kanserinin etmeni olarak tanımlamıştır. Bu çalışma, kök kanseri hastalığının bir bakteriden kaynaklı olduğunu belgeleyen ilk çalışmadır (Cavara 1897). On yıl sonra, Smith and Townsend (1907), *Bellis perennis* (İngiliz papatyası) bitkisinde kök kanseri hastalığının etmeni olan *Bacterium tumefaciens*'i daha sonra Duggar (1909) *Pseudomonas* cinsine ait *Pseudomonas tumefaciens* ve Buchanan *et al.* (1966)'da *Phytomonas* cinsine ait *Phytomonas tumefaciens* olarak ve en son Conn (1942) tarafından Rhizobiaceae familyasının bir üyesi olan *Agrobacterium* cinsine ait *A. tumefaciens* olarak literatüre dahil edilmiştir (Bergey 1923).

White (1972)'de *Agrobacterium* izolatları arasındaki farkları morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal yöntemlerle bakterinin diğer cinslerle olan benzerlik ve farklılıklarına dikkat edilerek yeniden sınıflandırılması gerektiğini bildirmiştir.

Hoykaas *et al.* (1977)'de, *Agrobacterium* ve *Rhizobium* cinsleri arasında *in vitro* koşullarda plazmid değişiminin (Ti ve Ri plazmid) gerçekleşebileceğini kanıtlamışlar ve bu durumdan kaynaklı cinsler arasındaki benzerlikler ortaya konulmuştur. Sonuç olarak *A. tumefaciens*'in *Rhizobium* cinsi ile olan taksonomik ilişkinin varlığını kanıtlamışlardır.

Willems and Collins (1993)'de yaptıkları çalışma ile *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium* ve *Agrobacterium* cinsleri ile yapılan filogenetik çalışmalarda 16S rDNA gen analizlerine gore *Rhizobium* ve *Agrobacterium* cinsleri içerisinde heterojen ve çeşitli alt gruplar olduğunu ortaya koymuşlardır. Moleküler analizlere gore *Rhizobium* ve *Agrobacterium* cinslerinde hem cins hem tür düzeyinde taksonomik değişiklikler yapılması gerektiğini savunmuşlardır.

Young *et al.* (2001)'de ise *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Allorhizobium* ve *Sinorhizobium* cinslerinin Rhizobiaceae familyası içinde yer aldığını belirterek, 16S rDNA dizi analizlerinin karşılaştırılması sonucu *Allorhizobium undicola*, *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*), *A. rhizogenes*, *A. rubi*, *Agrobacterium vitis*'in *Rhizobium* türleri ile aynı familyadan gelen bir grubun olduğunu tespit etmişlerdir. *Agrobacterium* cinsi bitki patojeni türleri kapsayan yapay bir gruptur. Aynı araştırmacılar gore doğal olarak aynı soydan gelen *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Allorhizobium*'un tek bir *Rhizobium* cinsi içinde toplanması gerektiğini ve güncellenen sınıflandırmada önceden bildirilen türlerin, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. vitis* ve *R. radiobacter* olarak adlandırılmasını önermişlerdir.

Costechareyre *et al.* (2010)'de *Agrobacterium* ve *Rhizobium* cinsleri içerisinde yer alan türlerin belirgin benzerlikleri gösterdiği ve filogenetik olarak güçlü bir şekilde ilişkili göründüğü için birlikte Rhizobiaceae familyasının altında gruplanmasını önermişlerdir ancak bazı *A. tumefaciens* izolatlarının bilimsel sınıflandırmadaki yeri tam anlamıyla netleşmemiş olup, DNA'da yer alan korunmuş gen bölgeleriyle ilgili testlerin devam etmesinden dolayı *A. tumefaciens* izolatlarının ismi değişmezken, *Agrobacterium* cinsine ait diğer türlerden olan *A. vitis*, *R. vitis*'e ve *A. rhizogenes* ise *R. rhizogenes* olarak değişmiştir (Slater *et al.* 2009).

2.3. *Rhizobium radiobacter* (*Agrobacterium tumefaciens*)’in Konukçu Dizisi

Agrobacterium türleri, konukçu çeşitliliği açısından diğer bitki bakteri patojenlerinin aksine oldukça geniş bir konukçu dizisine sahiptir (Agrios 1997). Hem yapay inokülasyon ile çok sayıda dikotiledon bitkide, hem de bir dizi açık tohumlu bitkide ve bazı monokotil bitkilerde kök kanseri oluşumuna neden olabilir.

R. radiobacter (*A. tumefaciens*), en yaygın bakteriyel bitki patojenlerinden biri olarak tanımlanmıştır (De Cleen and DeLey 1976; Kennedy and Alcorn 1980).

Hastalık şeftali (Alconero 1980; Tawfik 1990), kiraz (Garrett 1987a), erik (Pierronnet and Eyquard 1993), ahududu (Mattos 1986; Sule 1978), elma ve armut ağaçları (Lemoine and Michelesi 1993; Utkhede and Smith 1993) dahil olmak üzere 6 bitkide ve ve 9 süs bitkisine (Miller 1975; Keck 1988) ait fidanlık ve arazilerde kayıplara neden olur.

Patojen bakterinin bitki dokusunda sistemik olarak yayıldığı, asmalarda (Lehoczky 1968, Tarbah and Goodman 1987) ve süs bitkisi olan krizantemde (Miller 1975; Jones and Raju 1988) ksilem borularında bulunabildiği gösterilmiştir.

Don ve aşılama yaralanmalarından etkilenen asma bitkisi, özellikle bu dönemlerde *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*) enfeksiyonuna karşı aşırı hassas olduğu bildirilmiştir (Khmel *et al.* 1998).

Kado (2010)’da *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*)’in doğada, çoğunlukla odunsu bitkiler üzerinde bulunduğunu ve *Prunus* cinsine ait sert çekirdekli meyveler, Rosaceae (gül) familyasının diğer üyeleri, Vitaceae (üzüm) familyasının üyeleri, Juglandaceae (ceviz) familyasının üyeleri ve çeşitli fındık ağaçlarının yetiştiriciliğinde özellikle ekonomik anlamda bir endişe kaynağı olduğunu bildirmiştir.

De Cleene and De Ley (1976)'da kök kanserinin konukçu dizisine ilişkin en erken kapsamlı derlemeyi yapmışlar ve hastalığa ağırlıklı olarak açık tohumlular ve çift çenekli bitkiler olmak üzere 93 aileye ait 643 duyarlı bitkinin olduğunu (test edilen türlerin yaklaşık %60 olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca De Cleene (1985)'de test edilen monokotiledon bitkiler arasında sadece %3'ünün (27 familyaya ait 257 tür) *A. tumefaciens* B6 izolatına duyarlı olduğunu belirlemiştir.

Kök kanserinin ekonomik açıdan ~40 önemli bitki üzerinde meydana geldiği tespit edilmiştir (De Cleene 1979; Burr *et al.* 1998; Escobar and Dandekar 2003).

Garrett (1987a)'de 20. yy boyunca bu etmen bazı durumlarda (kiraz ağaçları gibi) zararlı bir etki göstermemesine rağmen fidanlık ve araziler için önemli bir hastalık haline geldiğini tespit etmiştir.

Agrobacterium'un konukçu dizisi bakteri ve bitki savunma mekanizması faktörleri tarafından belirlenir. İlki, bakteri virülans genlerini ve T-DNA onkogenlerini içerir, ikincil bitki genleri transformasyon ve ur oluşumu için gereklidir. Bu genetik faktörlerin yanı sıra bitkinin doku tipi ve fizyolojik durumu da verimli transformasyonu ve kanser oluşumunu etkileyebilir. Örneğin monokotiledonlar, *Agrobacterium*'un konukçusu değil diye bilinsede birkaç monokotiledonun meristematik hücreleri laboratuvar koşullarında kanserli dokuya başarılı bir şekilde dönüştürülmüştür (Smith and Hood 1995). Farklı *Agrobacterium* izolatlarıyla yapılan ileri çalışmalarda daha önce düşünülenenden çok daha fazla sayıda monokotiledon bitkide hastalık oluşturdıkları belirlenmiştir (Conner and Dommissie 1992).

Agrobacterium'un konukçu dizisi geleneksel olarak kanser oluşumu ile belirlenmiştir ancak bazı monokotil bitkilerde T-DNA aktarımı gerçekleşse bile kanser oluşmadığı gözlemlenmiştir (Johnson and Das 1998).

Yakabe *et al.* (2012)'de yaptıkları bir çalışmada, *Juglans hindsii* x *Juglans regia* bitki köklerinin *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*)'den kaynaklı hastalığa çok hassas olduğunu tespit etmişlerdir.

2.4. *Rhizobium radiobacter* (*Agrobacterium tumefaciens*)'in Simptomatolojisi

Agrobacterium cinsi genellikle meyve ağaçlarını, topraktan ve *Agrobacterium* ile bulaşık meyve bahçelerinin yeraltı suyu ile enfekte ettiği bildirilmiştir (Moore and Cooksey 1981).

R. radiobacter (*A. tumefaciens*), kök kanseri etmeni, farklı şekil ve büyüklükte ur oluşumları ile karakterize edilir. Etmenin oluşturduğu ur belirtisi, ağaçlarda en çok kök boğazında görülürken, köklerde ve nadiren toprak üstü aksamda da görülebilmektedir. İnce köklere göre kalın köklerde daha çok görülür. Bitkilerde kök boğazına kök tacı da denildiği için hastalığın bir diğer ismi taç gali'dir.

Hedgcock (1910)'da hastalığın ilk önce gövde ve köklerde özellikle toprak yüzeyine yakın kısımlarda küçük aşırı büyümeler veya lezyonlarla tanımlanmıştır.

Cook (1923)'de urların oluşumunun bir yaradan kaynaklandığında, ilk başta kallus tabakasından ayırt edilemediğini, ancak ur gelişiminin kallus tabakasının gelişiminden daha hızlı olması ile ayırtedilebileceğini tespit etmiş ve ilk başta urların az çok küresel, beyaz ve yumuşak olduğunu gözlemlemiştir.

Riker (1923)'de bitki köküne paralel aynı veya paralel olmayan farklı kökte veya gövdede sürekli ya da dallanarak farklı urların oluşabileceğini bildirmiştir.

Riker and Keitt (1926)'da urların boyutunun 30 cm çapa kadar ulaşabileceğini ve gövde, dal, yaprak sapı ve yaprak üzerinde de oluşabileceğini kaydetmiştir.

Braun and Mandle (1948)'de, Riker'in (1926)'da yaptığı gözleme göre *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*)'in 30°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda bakteri ve bitki gelişebilmesine rağmen ur gelişiminin indüklenemeyeceğini ve urlu dokuların oluşmayacağını tespit etmişlerdir.

Braun and Laskaris (1942)'de bitkileri virülant bakteri ile aşılama sonra çeşitli zamanlarda yüksek sıcaklığa maruz bırakmışlar ve T-DNA'nın taze yara bölgesinde bitki hücrelerine iletilmesi için ~36 s ve bakterinin ur oluşturabilmesi için sıcaklığın gerekli olduğunu savunmuşlardır.

Ark and Bingham (1958)'de ur gelişimi çeşitli fidanlık bitkilerinin kökleri ve sürgünlerinde yayılım gösterdiğini, enfekteli bitkiler üzerinde etmenin gelişimine devam etmesi muhtemel olduğundan bitkilerin satılamayacak duruma gelebileceğini kaydetmişlerdir.

Burr *et al.* (1995)'de kök kanseri ile ciddi şekilde enfekte olmuş bitki ve asmaların en son aşamada öldüğünü bildirmiştir.

Agrios (1997)'de kök boğazında veya ana kökte bulunan urların bitkinin zayıf gelişmesine ve bitkide verim kayıplarına neden olduğunu bildirmiştir. Urlar büyüdükçe, yüzeylerinin az çok kıvrımlı hale geldiğini daha sonra dış yüzeydeki hücrelerin ölümü ve çürümesiyle dokuların koyu kahverengi siyaha döndüğünü bildirmiştir. Ur gelişiminin sınırsız olduğunu, bitkinin tüm gövdesini ya da kökünü sarabildiğini ve konukçu bitkinin dış yüzeyinden dışarıya doğru büyüyerek gelişimini devam ettirdiğini saptamıştır. Bununla birlikte, urların genellikle çaplarının ¼ ile 4 inç arasında, küresel olmayan, düzensiz, sert pürüzlü yüzeye sahip, genellikle gövde üzerinde sıklıkla aşılma bölgelerinde, ayrıca kök üzerinde veya toprak yüzeyine yakın bölgelerde bulunduğu meyve ağaçları birliğinin literatür derlemelerinde yer almaktadır (Jindal *et al.* 1990). Bazı konukçu bitkilerde primer urlardan uzak noktalarda sekonder urların geliştiği, sekonder urların bakteri içermediği ve bakteri olmadan da urların gelişimine devam ettiğini Johnson and Das (1998)'de bildirmişlerdir.

Singh and Dhiman (2004)'de birçok şeftali çeşitinin hastalığın görülme sıklığının yüksek olduğu arazilere dikilmesi sonucu çeşitli problemler ile karşılaştıklarını kaydetmişlerdir.

Gupta *et al.* (2005a)'de şeftali ve vişnede kök boğazı kanseri yüzünden klorofil içeriğinde maksimum azalma (%40,20), daha sonra yaprak alanı (%28,97) ve bitki biyokütlesi (%11,99)'nde azalma gözlemlendiğini saptamışlardır.

2.5. *Rhizobium radiobacter* (*Agrobacterium tumefaciens*)'in Enfeksiyon Aşamaları

Bitkilerde kök ve kök boğazı kanseri oluşumunun mekanizmasını göstermeye yönelik çok sayıda çalışmadan sonra, Zaenen *et al.* (1974) inceledikleri *Agrobacterium*'un tüm tümörogenik suşlarında büyük bir plazmidin (Ti plazmid) olduğunu bildirmişlerdir.

R. radiobacter (*A. tumefaciens*), kendi yapısında bulunan Ti plazmidinde ki T-DNA bölgesini bitki genomuna aktararak entegre olmasını sağlayarak çok çeşitli konukçu bitkilerde kök kanserine neden olur (Chilton *et al.* 1977).

Lippincott and Lippincott (1969), ur gelişiminin başlatılması için *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*)'in özellikle yara bölgesine bağlanmasının gerekli olduğunu belirlemişlerdir.

Klee *et al.* (1984)'de bitki hormonları üzerine yaptıkları araştırmalar sonucunda oksin ve sitokininin ur oluşumuna neden olan T-DNA'nın bir ürünü olduğunu saptamışlardır.

Bitki hastalıklarının enfekteli araziye hassas bir konukçu bitkinin ekildiği zaman başladığı bilinmektedir. Enfekteli toprak dışında diğer inokulum kaynakları sulama suyu, bulaşık üretim materyali, alet ekipmanlarının dezenfekte edilmemesi ve bulaşık bitki artıklarıdır (Agrios 1997).

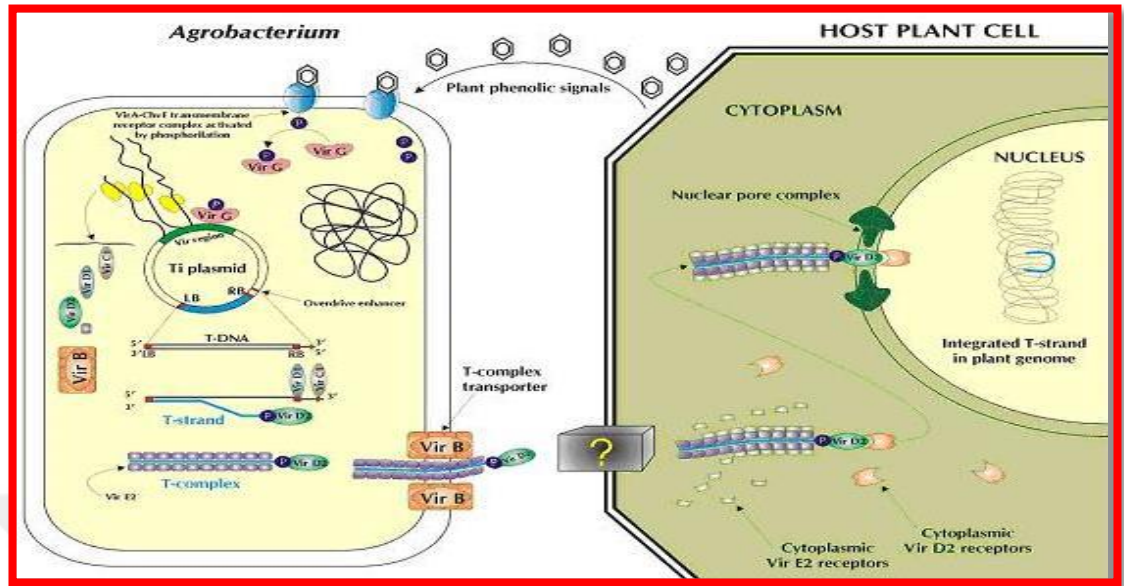
Hastalıkların oluşmasından önce, çoğu patojen epifitik bir büyüme evresinden geçer. Daha sonra patojen bitki yüzeyine yapışır ve bir giriş yeri (yaralar, doğal açıklıklar gibi) bulana kadar bu ortamda çoğalır (Montesinos *et al.* 2002). Etmen yaralardan giriş yaptıktan sonra urların görünmeye başlaması yaklaşık iki hafta sürer. Urlu dokuların dış yüzeyinde epidermal bir tabaka bulunmaz ve bundan dolayı ur dokularının dış yüzeyinde zamanla çatlamalar başlar ve en sonunda dokular dağılır. Dağılan doku parçaları toprağa geri düşer ve konukçu bitkisini tekrar bulunca enfeksiyon döngüsünü yeniden başlatır.

Flagellaları yardımıyla toprakta bulunan *Agrobacterium* spp. yaralanmış bitkinin kök çevresindeki rizosferde biriken aminoasitler, şekerler ve organik asitler içeren bitki özlerinin salınması, bakteriyi pozitif kemotaksis yoluyla yaraya doğru çeker. Bunlara ek olarak, yaralanmış bitkiler ayrıca çok çeşitli fenolik bileşiklerden olan koniferil alkol ve asetosringon (AS) üretir (Lee and Gelvin 2008). Etmen yara bölgesine ulaştığı zaman selüloz iplikçikler sentezleyerek kendisini bitki doku yüzeyine bağlanır (Tzfira and Citovsky 2007). *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*), ekstra kromozomal bir DNA parçası olan Ti plazmiti içerir. Ti-plazmiti iki bileşenden oluşur; genetik transformasyon için gerekli olan virülanslık genleri ve T-DNA (Transfer DNA) bölgeleridir (Tzfira *et al.* 2004). Yaralı bitki dokularından salınan fenolik bileşikler bakteriyel vir genlerinin indüklenmesine ve yapışmasına yol açar (Krispin *et al.* 2007).

Agrobacterium spp'nin bitki hücrelerine eklenmesinden ve çoklu vir genlerinin ekspresyonundan sonra, T-DNA ile birlikte birkaç efektör protein, tip IV salgılama sistemi ile bitki hücresine taşınır (Thompson *et al.* 1988; Ward *et al.* 1988, 2002; Kuldau *et al.* 1990; Shirasu *et al.* 1990; Beijersbergen *et al.* 1994). Bitki faktörleri, T-DNA'nın bitki genomuna entegrasyonuna yardımcı olur (Gelvin 2000; Mysore *et al.* 2000; Tzfira *et al.* 2004; Magori and Citovsky 2012).

Gelvin (2003)'de T-DNA'nın üretimi ve konukçu hücre içine taşınması için proteinlerden oluşan gerekli moleküler mekanizmanın vir genleri tarafından kodlanan proteinlerden oluştuğunu bildirmiştir. Bakteriyel proteinlerin bitki hücresine transferine

rağmen, çoğu *Agrobacterium* izolatu, hücrelerin hızlı ve lokalize ölümleriyle ilişkili olan aşırı duyarlılık reaksiyonu (HR) oluşturmaz (Staskawicz *et al.* 1995). T-DNA'nın transferi aynı zamanda Ti plazmidinde bulunan vir genleri tarafından kontrol edilir. Bitki tarafından salgılanan fenolik bileşikler vir genlerinin indüklenmesine ve yapışmasına yol açar. Farklı vir genleri vardır. Asetosiringon, virG (transkripsiyon faktörü)'yi aktive eden virA (membrana bağlanma reseptörü olan)'yı aktive eder. Aktif virG daha sonra virA, virB, virC, virD, virE ve virG operonlarının promotörlerinde bulunan aktivatör elemanları ile etkileşime girebilir. Bunlardan virA'nın otokinaz aktivitesi, virG'nin fosforilasyonuna neden olur. Dolayısıyla vir gen ekspresyonunu dolaylı olarak aktive edilmiştir (Schrammeijer *et al.* 2003). Gen ifade seviyelerinin yükselmesiyle sonucu konukçu bitki genomuna entegre edilmiş olan T-DNA'sının ifadesiyle sona erer (Karami *et al.* 2009). VirA ve virG tarafından indüklenen virD1 ve virD2, daha sonra T-DNA'yı kendi sınırlarında kesen bölgeye özgü nükleazlar gibi davranırlar. T-DNA, 5' ucunda virD2'ye bağlanır ve tip IV salgılama mekanizması aracılığıyla bitki hücresi sitoplazmasına aktarılmış olur (Kohli *et al.* 2003). VirB geni, *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*) ve konukçuya bağlanmayı sağlayan köprü olarak görev yapan pilus benzeri bir yapı üreten proteinleri kodlamak için gereklidir. T-DNA'nın konukçu hücre genomuna integrasyonu virC tarafından gerçekleştirilir (Gheysen *et al.* 1991). Konukçu bitkinin DNA'sının değiştirileceği bölge belirlendiğinde, virC, bu özel DNA zincirini keser ve rekombinasyon yoluyla integrasyon sürecini başlatır (Gheysen *et al.* 1991). T-DNA'nın integrasyonu, bitki genomu boyunca herhangi bir bölgede rastgele olabilir (Şekil 2.1) (Ishizaki 2008).



Şekil 2.1. *Agrobacterium tumefaciens*'in duyarlı konukçu bitki hücresinde enfeksiyon süreci (Escobar and Dandekar 2003)

R. radiobacter (*A. tumefaciens*), ayrıca bitki hormonlarının biyosentezi (oksinler ve sitokininler) ve diğer çoğu mikroorganizmanın kullanamadığı ve *Agrobacterium* türleri için seçici bir avantaj sağlayan karbon ve azot kaynağı olan opinlerin biyosentezi için genler taşır (Andrea and Heribert 2010). Bunlar tipik olarak oktopin veya nopalindir. Birkaç *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*) izolatu, kültür ortamında bir tek karbon ve azot kaynağı olarak mannopin, nopalın ve hem mannopin hem de nopalini kullanmaktadır.

Johnson and Das (1998) opinler normalde bitkilerde sentezlenmediğini bildirmiştir. Bu gözlemler, bakteriyel plazmit DNA'nın konukçu hücreye aktarıldığı ve eksprese edildiği fikrini desteklemektedir.

T-DNA genlerinin ekspresyonu ile oksin sentezi için [*tms1* (*iaaM*) ve *tms2* (*iaaH*)] ve sitokinin sentezi [*tmr* (*ipt*)] sonucu kontrolsüz bitki hücre bölünmesine ve büyümesine neden olarak ur oluşumu gerçekleşir (Zhu *et al.* 2000). Uurlar, suyun ve besinlerin taşınması gibi bitkinin fizyolojik fonksiyonlarını inhibe eder. Özellikle daha büyük alanı kaplayan uurlar oluştuğunda; bitkinin gelişiminde azalma ve ciddi şekilde bitkinin bodur kalmasına neden olabilir. Bitki hücresindeki hormon dengesinin değişmesiyle hücrelerin bölünmesi bitki tarafından kontrol edilememekte ve uurlar oluşmaktadır. Ur oluşumuna

neden olan genler tarafından üretilen oksinin sitokinine oranı, ürün morfolojisini belirler.

Suzuki *et al.* (2001)'de yaptıkları bir çalışma ile *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*)'in hastalık oluşturma mekanizmasında hormonların etkili olduğunu bununda genler ile kontrol edildiğini bildirmiştir. Bitki hücresine aktarılan ve bitki kromozomuna dahil olan T-DNA'da bulunan ipt, aux ve 6a genlerinin hücrede bol miktarda sitokin ve oksin hormonlarının sentezlenmesine neden olduğu, bakterinin beslenmesi için gerekli opin adı verilen bileşiklerin oluşmasını sağladığı, böylece bitki hücrelerinde kontrolsüz hücre büyümesi ve bölünmesinin uyarılarak ur oluşumunun meydana geldiğini ortaya koymuşlardır.

2.6. Hastalığın Bitki Gelişimine Etkisi

Kök kanseri ekonomik olarak sert ve yumuşak çekirdekli meyvelerin çok önemli bir hastalığıdır. Hastalık ile ilgili geniş bir literatür bulunmasına rağmen, hastalıklı bitkinin büyümesi üzerine etkisiyle ilgili çok az literatür bulunmaktadır. Ancak hastalığın anaçların performansını önemli ölçüde bozduğunu gösteren kesin bir kanıt yoktur. Birkaç araştırmacı kök boğazı kanseri hastalığının duyarlı ılıman meyve ağaçlarının büyümesi üzerine etkisini çalışmayı denemişlerdir. Popova (1972)'de zengin besin içerikli toprağa ekilen urlu elma ağaçlarının normal olarak büyüdüğünü ve normal sağlıklı elma bitkilerinden önemli ölçüde fark oluşturmadığını bildirmiştir. Popova (1973)'de ayrıca kök kanseri hastalıklı erik ağaçlarının özellikle kumlu topraklarda zayıf büyüme ve zayıf kökleşmeye yol açtığını belirlemiştir. Scheer *et al.* (1978)'de kök boğazı kanserinin elma anacı olan M9 üzerindeki etkisini araştırmışlar ve enfekte olmuş anaçlarda sürgün büyümesinin sağlıklı olanlara göre daha az olduğu sonucuna varmışlardır.

Garrett *et al.* (1984)'de kök boğazı kanserinin 8 yıllık bir çalışma boyunca, Napolyon kiraz ağaçlarının gövdesi üzerinde sadece zayıf bir etki gösterdiğini ancak Roundel kiraz çeşidinde ise hastalığın bir zarara neden olmadığını tespit etmişlerdir.

Garrett (1987a) 1000'nin üzerinde kiraz anacı ile 7 yıl boyunca çalışmış ve sağlıklı ve kök kanseri ile enfekteli ağaçlar arasında sabit ve net bir fark olmadığını gözlemlemiştir. Aynı meyve bahçesinde 6 yaşındaki sağlıklı ağaçların ortalama gövde çevresi kök boğazı kanseri ile enfekteli ağaçlarınkinden daha büyük olduğunu gözlemlemiştir.

Jindal *et al.* (1990)'da kök boğazı kanseri ile enfekteli ılıman iklim meyve ağaçlarının hastalığın ileri aşamalarında öleceğini bildirmiştir.

Kumashiro and Yamamoto (1992)'de ise *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*) ile ağır enfekteli toprağa beş elma anacının dikiminin başarısız olduğunu bildirmişlerdir.

Singh and Dhiman (2004)'de kök boğazı kanseri ve kök ur nematodunun görülme sıklığının yüksek olması aynı araziye şeftali anacı dikiminin sorun oluşturacağını ve hastalığın yüksek oranda bulunması ile korelasyon gösterdiğini belirlemişlerdir.

Roh-Jeong *et al.* (2005)'de asmalarda kök kanserinin etkisini incelerken ur boyutlarının dayanıklı ve hassas çeşitlerde farklı olabileceğini ortaya koymuşlardır. Uurların daha duyarlı çeşit olan Neo-Muscat için çok büyük, dayanıklı çeşit olan *Vitis acerifolia* 0154 için daha küçük olduğunu belirlemişlerdir.

Gupta *et al.* (2005b) kök kanseri hastalığının kiraz anacı-Colt'un büyüme parametreleri üzerindeki etkisini bildirmişler ve tüm büyüme parametrelerinin yani sürgün uzunluğu, kök uzunluğu, gövde çevresi ve klorofil içeriğinin hastalıklı bitkilerde sağlıklı bitkilere kıyasla büyük ölçüde etkilendiği belirlenmiştir.

2.7. Patojenite Testleri

Levine (1919)'da kalonşeyi (*Kalonche daigremontiana*) farklı konukçulardan izole edilmiş bakterilerin patojenitesini test etmek amacıyla ilk kez kullanmış ve patojenite

test sonucu ur oluşturmada yaprak ve gövde dokularının duyarlılıklarında farklılıklar tespit etmiştir. Havuç (*Daucus carota*), domates (*Lycopersicum esculentum*) ve kozmoz ieğide (*Cosmos bipinnatus*) bu çalışmada kullanılmış olup en etkili ve iyi sonucu veren test bitkisinin havuç dilim testi olduğunu belirlemiştir.

Smith (1939), Cupressaceae (Servigiller) familyası üyelerinin yapay inokülasyon ile kök kanserine karşı duyarlı olduğunu ancak sert ve odunsu bitkilerde hastalığın belirtilerini görmenin uzun zaman alabileceğini bildirmiştir.

Schroth *et al.* (1958)'de patojenite testinde kullanılabilecek en iyi test bitkisini bulabilmek için çeşitli çalışmalar yapmış ve steril petrilere nemlendirilmiş filtre kağıdı konulmuş havuç dilimi testinin çok iyi sonuç verdiğini saptamışlardır. Havuç bitkisi üzerinde belirtilerin görülebilmesi için geçmesi gereken yaklaşık srenin 15-21 gün olduğunu tespit etmişlerdir.

Manigault and Kurkdjian (1967)'de patojenite testi için domates, tütün ve farklı indikatör birçok otsu bitki kullandıklarını bildirmişlerdir. Ayrıca Moore (1976) patojenite testi için turp bitkisini kullanmış ve ur oluşumunu gözlemlemiştir.

Burr *et al.* (1995)'de çok sayıda dikotiledon bitkinin yapay inokülasyon yapılan bölgelerinde *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*)'den kaynaklı ur oluşumlarının meydana geldiğini gözlemlemiştir. Domates (*L. esculentum* Mill.) fideleri (~4 haftalık) en önemli ve en çok tercih edilen patojenite test bitkisi olarak farklı araştırıcılar tarafından kullanılmıştır (Kerr 1969a; New and Kerr 1972; Cooksey and Moore 1980; Jindal and Sharma 1988; Kamal 2004). Bununla birlikte, domates dışında ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.), kalonşe (*K. diagamantiana*), datura (*Datura* spp.) ve havuç (*D. carota* L.) dilimleri yapay inokülasyon ile patojenite testinde yaygın olarak kullanılan bitkiler olduğu rapor edilmiştir.

Anand and Heberlein (1977)'de nemlendirilmiş filtre kağıdı serilmiş petri kaplarına patates dilimlerini yerleştirmişler ve belirtiler gözlenmeye başlandıktan sonra patateslerin yaklaşık %50'sinde ur oluşumunu gözlemlemişlerdir.

Anderson and Moore (1979)'de yaptıkları bir çalışmada, 18 farklı bitkiden elde ettikleri patojen izolatları 11 farklı test bitkisinde patojenite testine tabi tutmuşlar ve izolatlardan ur oluşturma oranı en yüksek *Nicotiana tabaccum* ve *Datura spp.* olduğu görülmüş, en düşük ur oluşumunun ise şeker pancarı ve elmada olduğunu tespit etmişlerdir.

Spiers (1979)'da yaptığı bir çalışmada *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*) izolatını havuç dilimi, şeker pancarı, bakla ve domates bitkilerinde test etmiş ve 30 gün sonunda bazı izolatların büyük urlar oluşturduğunu, bazı izolatların 2 ay sonunda çok küçük urlar bazılarının ise hiç ur oluşturmadığını tespit etmiştir. Bakla bitkisinin diğer test bitkilerine göre daha iyi belirti verdiği, havuç dilimlerinde 15 gün sonunda çok küçük urlar gözlemlendiği ve şeker pancarı dilimlerinde ise doğal kallus dokusu oluşturduğu için başarılı bulunmadığını bildirmiştir.

Tolba and Soliman (2014)'de yaptıkları bir çalışmada seçtikleri izolatların ur oluşumunu gül (*Rosa gallica*), kalonşe (*K. daigremontiana*), datura (*D. stramonium*), tütün (*N. tabacum* cv. *White Burley*), domates (*L. esculentum*) ve havuç dilimlerinde (*D. carota* L.) test etmişler. Gül sürgünlerinde inokülasyondan 1 ay sonra urlar yara bölgelerinde açık kahverengi bir renge sahip şişlikler ile ortaya çıkmış ve zamanla, urların yavaş yavaş büyüyerek düzensiz, kıvrımlı, pürüzlü, sert bir şekilde görüldüğünü bildirmişlerdir. Diğer bakteri inoküle edilmiş bitkilerde, yara bölgelerinde 15 gün sonra urlar ortaya çıkmış ve daha sonra büyüklüklerinin arttığını bildirmişlerdir. Havuç dilimleri üzerinde ise belirtilerin 21 gün sonra açık kahverengi urları gözlemlemişlerdir.

Kamal (2004), *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*)'in hipovirülant izolatının domates bitkilerinin köklerinde minik urlar oluşturduğunu gözlemlemiştir.

2.8. *Rhizobium radiobacter* (*Agrobacterium tumefaciens*)'in Tanı ve Karakterizasyonu

Smith and Townsend (1907)'de *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*)'in kök ve kök boğazı kanserinin etmeni olduğunu bildirmesinin ardından birçok araştırmacı etmeni farklı ortamlarda izole etmeye çalışmış, morfolojik ve biyokimyasal özellikleri üzerine detaylı araştırmalar yapmışlardır.

R. radiobacter (*A. tumefaciens*)'in izolasyonuna yönelik daha önceki yöntemler basit besi ortamları kullanımını içeren yöntemlerdir. Patel besi ortamı (1926)'da bu ortamlardan biridir. Besi ortamı laktoz, agar, sodyum taurocholate, mangan sülfat ($MnSO_4$) içermektedir ve içerisindeki sodyum taurocholate diğer organizmaların gelişimini engelleyen bir kimyasaldır. Sonuç olarak *Agrobacterium* spp. hariç hemen hemen tüm mikroflora organizmalarının gelişimini inhibe eder (Clark 1969). Ancak bu ortamın bazı sınırlayıcı dezavantajları bulunmaktadır. Patel'in ortamında hızla büyüyen pek çok toprak kaynaklı fungusda olabileceğinden dolayı *Agrobacterium* kolonilerinin gelişimlerini baskılayabildikleri bildirilmiştir.

Hendrickson *et al.* (1934)'de yaptıkları çalışmada *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*) ve patojen olmayan *R. radiobacter* (*A. radiobacter*)'in demir amonyum sitrat besi ortamının yüzeyinde kırmızımsı kahverengimsi bir zar oluşturduğunu gözlemlemiştir.

Kovacs (1956), oksidaz reaksiyonunun biovar 1'i, biovar 2 ve 3'ten ayırıcı bir test olduğunu belirtmiş ve *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*)'in oksidaz testine karşı pozitif reaksiyon gösterdiğini tespit etmiştir (Kerr and Panagopoulos 1977; Moore *et al.* 1980).

Ark and Schroth (1958) havuç dilimlerinin *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*)'in izolasyonunda tercih edilebileceğini ortaya koymuşlar ancak havuç testinin sınırlandırılması, topraktaki *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*) popülasyonunu nicel olarak yansıtmaması ile dezavantajlı olabileceğini savunmuştur.

Hayward (1964) eritritol'den asit üretiminin tanısal testini *Ralstonia solanacearum*'u ayırt etmede kullanmış ve ayrıca bu testin *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*)'in biovar karakterizasyonunda da kullanılabileceğini savunmuştur.

Schroth *et al.* (1965)'de *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*)'in büyümesini azaltmadan birçok fungus ve bakteri büyümesini etkili bir şekilde sınırlayan bir ortam geliştirmiştir. Bu besiyeri, sırasıyla, temel karbon ve azot kaynağı olarak mannitol ve sodyum nitrat içermektedir. *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*)'in hızlı bir şekilde bu iki maddeyi kullanarak diğer birçok mikroorganizmaların kullanmasına engel olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca besiyeri sodyum selenit, kalsiyum propiyonat ve bir alkaloit olan berberin gibi birçok toksik madde içermektedir. Böylece diğer mikroorganizmaların *Agrobacterium*'ların gelişimini olumsuz yönde etkilenmesine engel olduğu belirlenmiştir. Çalışmaların artması ve tekniklerin geliştirilmesi ile ilerleyen zamanlarda Clark (1969), Kado and Heskett (1970), New and Kerr (1971)'de *Agrobacterium* türleri için farklı besi ortamları geliştirmişlerdir.

Keane *et al.* (1970), %2 NaCl içeren Nutrient Glikoz Agar (NGA) ortamında *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*)'in gelişebildiğini gözlemlemiştir.

Anderson (1977) NGA besiyerinde maksimum büyüme sıcaklığı çalışmalarında *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*)'in güçlü pozitif reaksiyon gösterdiğini belirlemiştir.

Kerr and Panagopoulos (1977) ve Moore *et al.* (1980), sitrat kullanımının *Agrobacterium* biovarlarını ayırmada kullanılan diğer bir özellik olduğunu belirtmişler ve biovar 2 ve 3 sitratı kullanırken biovar 1'in (*A. tumefaciens*) sitrat kullanımında değişiklik gösterebileceğini tespit etmişlerdir.

Dhanvantari (1978), fizyolojik ve biyokimyasal testlerine göre 30 adet *A. tumefaciens* izolatını iki gruba ayırmış, 24 izolat 3-ketolaktoz negatif, biovar 2'ye, 3 izolatın oluşan ikinci grup 3-ketolaktoza pozitif reaksiyon göstermiş ve biovar 1'e yani *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*) olarak tespit edilmiştir.

Romanenko and Perepnikhatka (1984)'de kök kanseri etmeninin yaklaşık 1-3 µm uzunluğunda ve yaklaşık 0,4 ile 0,8 µm çapında çubuk şekilli bir bakteri olduğunu bildirmiştir. Tek başına veya kısa zincirler halinde bulunduğunu ve peritrik kamçılı olduğunu gözlemlemişlerdir. Bakterinin ayrıca belirli ortamlarda kapsül oluşturduğunu belirtmiştir (Agrios 1997).

Jindal *et al.* (1990)'da *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*)'in NA ortamındaki özelliklerini incelerken bakterinin karakteristik olarak küçük, dairesel, düzgün, parlak opak veya yarı saydam konvex ve düzgün kenarlı beyaz koloniler olarak görüldüğünü bildirmiştir.

Shaad (2001) *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*) izolatlarının belirlenmesinde en temel testin yarı seçici besiyerine ekim yapıp daha sonra 1A seçici besiyerine yapılan ekimler olduğu bildirmiştir.

Benjama *et al.* (2001) ayrıca *Agrobacterium* cinsini karakterize etmek ve türleri tanılamak için farklı biyokimyasal testlerden olan üreaz+esculine hidrolizi ve 3-ketolaktoz testlerinin olduğunu bildirmiştir.

Aysan *et al.* (2003), *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*) ile enfekteli *P. armeniaca* (kayısı) ağaçlarının kök kısmından izole ettikleri bakterilerin gram negatif, spor ve pigment oluşturmayan, çubuk şekilli, oksidaz negatif ve katalaz pozitif olarak belirlemişler ve yağ asidi analiz sonuçlarına göre %94,6 ile %98,2 oranları arasında patojenin *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*) olarak tanılamışlardır.

Kamal (2004)'de *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*)'in Yeast ekstrakt mannitol agar (YEMA) ortamındaki özellikleri incelemiş ve bakterilerin dairesel, parlak, yarı saydam ve mucoid beyaz koloniler oluşturduğunu gözlemlemiştir.

Sharma *et al.* (2004)'de Hindistan'ın daha ılıman bölgelerinde kök kanserinin meydana geldiğini bildirmiş ve YEMA ortamında *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*)'i izole ettiklerini bildirmişlerdir

Gupta *et al.* (2005a), hastalıklı bitkiler üzerindeki genç urlu dokulardan ve fidanlık toprağından *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*)'i YEMA ve Kado and Heskett (1970) ortamlarını kullanarak izole etmişler ve 52 izolattan 51'i şeftali ve vişnede kök kanserine neden olduğu tespit edilmiştir. *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*) izolatları 3-ketoglikosit testine karşı pozitif reaksiyon göstermiş ve Schroth, Thompson ve Hildebrand ortamları üzerinde büyüme gösterdikleri için etmenin biyokimyasal testler ile de tanısı *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*) olarak desteklenmiştir.

Gupta *et al.* (2005a), Himachal Pradesh'teki farklı sert çekirdekli meyve fidanlıklarından *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*)'in 3-ketoglikozit testine karşı pozitif reaksiyon, 35°C'de gelişme ve Litmus milk ortamında alkali, eritritolden asit üretimi, Schroth ve Thompson ortamlarında büyüme gösterdiklerini ortaya koymuşlardır.

Putnam (2006), *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*) hareketli, laktoz ve mannitol kullanım testleri için pozitif reaksiyon veren bir bakteri olduğunu savunmuştur.

Murugesan (2010), *Agrobacterium* spp. karbonhidrat içeren ortamlarda büyümeye bırakıldığı zaman, hücre dışı ekstrapolisakarit maddeler salgıladığı ve bunun sonucu kolonilerin hacimli ve sümüksü bir görünüm bıraktığını gözlemlemiştir.

Shams *et al.* (2012), *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*)'in üreaz çözeltisinde, inkübasyondan sonra pembe renklenmenin gözleneceği kolorimetrik değişimi gözlemlediklerini bildirmiştir.

Min (2014)'de yaptığı tez çalışmasında iki seçici ortam olan 1A ve D1 ortamlarını kullanarak Kampar'daki 7 farklı bölge toprak örneklerinden toplam 229 *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*) izolatu elde etmiş ve 1A ortamının *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*) etmeninin izolasyonunda D1 ortamından iki kat daha etkili olduğunu ortaya koymuştur.

2.9. *Rhizobium radiobacter* (*Agrobacterium tumefaciens*)’in mücadelesine yönelik çalışmalar

Agrobacterium genellikle meyve ağaçlarını topraktan ve hastalıkla bulaşık alanlardaki yeraltı suları ile; asmaları ise sistemik olarak enfekte olmuş propagatif üretim materyali ile enfeksiyon oluşturduğu bildirilmiştir (Moore and Cooksey 1981). Kök ve kök boğazı kanseri hastalığı diğer bakteriyel hastalıklara benzememektedir. *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*)’in virülant suşlarında Ti plazmidinin yer almasından dolayı, dünya çapında birçok araştırmacı tarafından çalışmalar yapılmasına rağmen mücadelesi hala zor bir hastalıktır (Watson *et al.* 1975). Ayrıca kök kanseri hastalığı sonucu ur gelişimi başlamadıkça enfeksiyon tespit edilememektedir (Banfield 1934). Bu sebeple hastalıkla mücadele etmekte ki ilk aşama patojenin bitkiye girmesini önleyecek yöntemler kullanmaktır. Bu önlemler; topraktaki patojeni tespit etmeyi, patojenden arı üretim materyalinin kullanımı, biyolojik mücadele ve geleneksel veya moleküler metotlar ile yeni dirençli çeşitler üretmeyi içerir ancak umut verici sonuçlara rağmen, patojenin genetik çeşitliliği bu yöntemlerin verimliliğini sınırlayabilmektedir (Peluso *et al.* 2003).

Kültürel uygulamalar, kök kanserinin görülme sıklığını en aza indirmede önemli bir rol oynamaktadır (Wicks *et al.* 1993).

Smith and Townsend (1907) yaptıkları bir çalışmada hastalığa karşı hassas anaçların etmenle bulaşık alanlara dikim işleminin yapılmaması gerektiğini bildirmişlerdir.

Agrios (1997)’de hastalık ile bulaşık tarlaların, birkaç yıl boyunca mısır ve diğer tahıl bitkileri ekilerek münavebe yapılmasını önermiştir. Etmenin bitkiye giriş yollarından biride yara yerleri olduğu için transplantasyon sırasında kök boğazı ve köklerin yaralanmasından kaçınılması gerektiği ve böcekler tarafından köklerin yaralanmasından kaçınmanın hastalığın görülme sıklığını önemli ölçüde azalttığı bildirilmiştir (Saygılı 2008). Ayrıca enfekteli bitki materyallerinin imha edilmesi, sanitasyon, bulaşık fidanlık alanlarında rotasyon ve iyi çekirdeklenmiş anaçların kullanımı gibi başka uygulamalarla da hastalık oranını azaltıcı diğer kültürel yöntemlerdendir.

Gupta *et al.* (2005a), 1/3 doz Potasyum (K) ve Fosfor (P) ile birlikte normal doz Azot (N) ve bunun yanı sıra çiftlik gübresi uygulamasının hastalığın görülme sıklığını azalttığını gözlemlemişlerdir.

Krimi *et al.* (2006)'da %1,5 oranında hardal ve okaliptüs yaprakları ile yapılan toprak iyileştirme uygulamalarının da hastalığın görülme sıklığını azalttığını tespit etmişlerdir.

Toprak solarizasyonu, çeşitli toprak patojenlerini kontrol etmek için şeffaf polietilen tabakaların kullanılarak güneş enerjisi ile toprağın ısıtılmasıdır (Katan 1981). Jones *et al.* (1966)'da toprak patojenlerini hedef alan toprak solarizasyon tekniğini ilk kez kullanılmışlardır. Polietilen tarımda kullanılan en popüler malzemedir ve ilk kez 1939'da ticari ölçekte üretilmiştir.

Macfayden (1967)'de farklı polietilen malçları arasında yer alan şeffaf malçın toprağı ısıtan güneş ışınlarının çoğunu ilettiğini bildirmiştir. Aynı araştırmacı ayrıca malçlamanın yüksek sıcaklık döneminde yapılması gerektiğini de belirtmiştir.

Horowitz and Regev (1980)'de en ince polietilen malçının (25-30 μ m), diğer kalınlıktaki polietilen malçlar arasında en iyi ışık geçirgenliğine sahip olması nedeniyle toprağı ısıtmada daha etkili olduğunu bulmuştur.

Tjamos and Plomatas (1988) alt ölümcül sıcaklıkların patojen üzerindeki kümülatif etkilerinden dolayı daha alt derinlikteki topraklarda *Agrobacterium* popülasyon yoğunluğunda bir azalma olduğunu bildirmişlerdir.

Raio *et al.* (1997)'de alt ölümcül sıcaklıkların kümülatif etkisi nedeniyle daha alt derinliklerde *Agrobacterium* popülasyon yoğunluklarındaki azalmanın, sulanan alanlarda sulanmayan solarize alanlara göre çok daha fazla olduğunu tespit etmişlerdir.

Pinkerton *et al.* (2000) toprak solarizasyonunun etkinliğinin toprak tipi ile ilişkili olduğunu belirtmişler ve silt (alüvyon)-killi topraklara sahip solarize yataklara ekilmiş Mazzard kiraz anaçlarının kök kanserine yakalanma riskinin anlamlı derecede azaldığını gözlemişlerdir.

Zoina and Raio (1999)'da 6 adet şeftali anacını (Barrier 1, GF 677, Mariana GF 8-1, MrS 2/5, şeftali fidanı ve PS) kök kanserine karşı 4 yıl boyunca farklı izolatlar ile kök ve sürgünlere bulaştırmak suretiyle arazi denemeleri kurmuşlar ve MrS 2/5 anacının çok yüksek derecede hastalığa hassas olduğunu; GF 677'inde MrS 2/5'e bir derece daha az hassasiyet gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Rhouma *et al.* (2005)'de farklı meyve köklerinin (yumuşak ve sert çekirdekli meyve anaçları) kök kanserine duyarlılığını, üç yıl boyunca sayısız *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*) izolatı ile sera ve tarla denemelerinde araştırmışlardır. *P. dulcis* ve *P. persica* genotipleri, *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*)'e yüksek duyarlılık gösterirken, sert çekirdekli anaçlar arasında acı badem tüm çalışmalarda oldukça hassas bulunmuştur. Kayısı ve Cadaman anaçlarının düşük duyarlılığa sahip olduğu ancak ur büyüklüklerinin daha büyük olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak anaç duyarlılığı ile ur büyüklüğü arasında bir ilişki olmadığı belirlenmiştir. Yumuşak çekirdekli meyve anaçlarından ayva BA29 hastalığa dirençli iken MM106 elma anacı saksı denemelerinde hassas bulunmuştur.

Thomidis *et al.* (2005)'de 5 tane *Prunus* anacının; GF677 (*P. persica* x *P. amygdalus*), Antafuel (*P. amygdalus* x *P. persica*), St. Julien 655/2 (*P. insititia* x *P. domestica*), şeftali fidanı (*P. persica*), Gisela (*P. cerasus* x *P. canescens*) *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*)'e karşı dayanıklılıklarını test etmişler ve hiçbir anacın hastalığa dayanıklı olmadığını tespit etmişlerdir. St. Julien 655/2 anacı en dayanıklı anaç olarak bulunurken diğer anaçlar arasında belirgin bir fark olmadığı ortaya konulmuştur.

Uzun süreli toprak solarizasyonu (90 gün) uygulaması istenen termal dozların elde edilmesinde çok daha etkili olduğu bildirilmiştir (Pinkerton *et al.* 2000). 8 cm'nin

üstündeki toprak katmanlarında 40°C’de ~195 sa ve 45°C’nin üzerindeki sıcaklıklarda 62,5 sa istenen termal dozların elde edilebildiği belirlenmiştir. Gupta and Khosla (2007)’de yaptıkları bir çalışmada 2001 ve 2002 yılları boyunca 15-30 cm derinlikteki toprakta, 35°C’nin üzerindeki sıcaklıklarda termal dozları sırasıyla 196,5 ve 93 sa olarak belirlemişler ve bu topraklara ekilmiş olan Colt kiraz anacında kök kanserinin görülme insidansının önemli miktarda azaldığını tespit etmişlerdir.

Horuz vd (2017)’de *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*)’e dayanıklı anaç bulunmasına yönelik yaptıkları çalışmada Garnem anacının hastalığa karşı oldukça duyarlı, Myrobolan anacının orta derecede duyarlı ve GF-677 anacının ise daha az duyarlı olduğunu belirlemişlerdir.

Ark (1941, 1942) kök boğazı kanserine karşı fungusitler, antibiyotikler ve diğer kimyasalların (fumigantlar, toprak sterilize edici ajanlar, herbisitler gibi) kullanılabileceğini bildirmiştir. Kapshuk (1933)’de en umut verici sonuçların Kloropikrinden elde edildiğini bildirmiştir. Araştırmacı bu kimyasalın toprağa uygulandığında 20 cm derinliğe kadar nüfuz edebildiğini ve *Agrobacterium*’u etkili bir şekilde öldürdüğünü tespit etmiştir.

Blanchard (1951)’de, deneysel olarak civa klorür ($HgCl_2$), bakır sülfat ($CuSO_4$) ve kireç klorür doğal olarak veya yapay olarak *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*) ile bulaşık topraklarda dezenfektan olarak kullanılamayacağını ancak Aureomisin’in hastalığa karşı etkin olarak kullanılabileceğini kanıtlanmıştır.

Dickey (1962)’de yapay olarak *A. tumefaciens* ile bulaşık 3,9 ve 15 inç arasındaki tüm derinliklerdeki topraklara Metil bromür (CH_3Br) uygulanmasıyla %90’dan fazla patojenin popülasyonunda azalma olduğunu belirlemiştir.

R. radiobacter (*A. tumefaciens*)’e karşı birçok yazar farklı antibiyotikler kullanmış ve Terramisin (Deep 1958a), Penisilin ve Streptomisin (Hampton 1948, Deep 1958b)’in etkinliklerini tespit etmişlerdir. Ark and Bingham (1958)’de, ne Streptomisin ne de

Tetrasiklinin kök daldırma metoduyla (60 dk), hastalığın başlangıç aşamasında olan armut veya kiraz anaçlarında hastalığın başarılı bir şekilde kontrolünü sağlamadığını bildirmişlerdir.

Deep and Young (1965)'de fidanlık arazilerine tohum ekiminden önce toprağa çok sayıda fungusit uygulamışlar ve hastalık oranında artışlar gözlemlemişlerdir. Bu durumun toprak fungus mikroflora popülasyonundaki azalmasının *A. tumefaciens* ile daha az rekabet etmesinden kaynaklanabileceğini belirtmişlerdir.

Deep *et al.* (1968)'de Mazzard kiraz anacında kök boğazı kanserine karşı 7 fumigant test etmişler ve Metil bromür, Kloropikrin, Provigil bromürün, hastalığın kontrolünü düşük oranda sağladığını gözlemlemişlerdir.

Ogg and Graf (1974)'de elma, armut, kiraz ve erik anaçlarına hem sera hem de tarla koşullarında dikim öncesi uygulama olarak 8 herbisit test etmişler ve Trifluraince uygulamasının (1,7 kg/h) kullanımı ile kiraz anacında kök kanseri ve saçak kök hastalığının görülme sıklığında artış olduğunu bildirmişlerdir.

Utkhede and Smith (1993), British Columbia'da genç elma ağaçlarındaki kök kanserinin kontrolü için biyolojik ve kimyasal uygulamaları değerlendirmişler ve %4'lük Formaldehitte toprak sterilizasyonu sonucu minimum hastalık şiddeti (%9,77) gözlemlemişlerdir.

Agrios (1997)'de hastalığın kimyasal kontrolünün, geleneksel pestisitlerin kullanımının başarısız olduğunu ve yaygın olarak kullanılan bakır hidroksitin etkinliğinin yetersiz olduğunu bildirmiştir. Bakırlı bileşikler kök kanserini kontrol etmede en iyi sonuçları verir ancak ancak patojen direnci ve bazı bitki türlerinde neden olduğu fitotoksisite sebebiyle nadiren tatmin edici kontrol sağlamaktadır.

Burr (2004)'de bitkide yara açılmasının kaçınılmaz olduğu durumlarda, bitki yüzeylerindeki *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*) popülasyonlarını azaltmak ve hastalığın

yeniden enfeksiyonunu en aza indirmek için aşı yoluyla bakır veya dezenfektan etkili bakterisitler kullanılabileceğini kaydetmiştir. *Agrobacterium* enfeksiyonunu azalttığı bildirilen diğer çiftlik uygulamaları ise, taze inek gübresi kullanımı ve bakır alımını teşvik edici besin takviyeleri olduğunu bildirmiştir.

Kamal (2004)'de beyazlatıcı pudra (bleaching powder) (%0,3) uygulaması hastalık oranını %23,33'e; Oksiflorfen'in (0,5 l/h) bitki öncesi tedavisi olarak herbisitlerin uygulanması hastalık insidansını %30,33'e düşürürken, CuSO₄ (%1) gibi antibakteriyel bileşiklerin kök daldırma usulüyle uygulanmasının minimum hastalık düzeyinin %30,17 görüldüğünü bildirmişlerdir. Ayrıca kiraz anaçlarında Streptosiklin kullanımının hastalık görülme düzeyini %34,90'a düşürdüğü belirlenmiştir

Gupta (2005a)'de Streptosiklin (%0,1) ve CuSO₄ (%0,3) uygulamasının hastalığı önlemede bir dereceye kadar etkili olduğunu ve Colt kiraz anaçlarında hastalığının %40-50 oranında kontrol edilebildiğini bildirmiştir.

Gupta and Kamal (2006)'da Colt kiraz anaçlarında ekim öncesi %4'lük Formaldehit uygulamasının hastalığın görülme sıklığını %81, Oksiflorfen (0,5 l/h) uygulamasının %50 oranında azalttığını belirlemişlerdir.

Bitki hastalıklarını en aza indirmek için umut verici alternatif bir yaklaşım, patojen gelişimini baskılayabilen antagonist etkiye sahip organizmaların uygulanmasıdır. Bu kavram biyolojik mücadele olarak adlandırılmaktadır ve kullanılan organizmaya biyolojik mücadele ajanı denilmektedir (Wilson 1997). Kullanılan biyolojik mücadele ajanları virüs, bakteri, fungus veya böcek gibi patojenik olmayan antagonistik organizmalardır (Otten *et al.* 2008). Biyolojik olarak kullanılan etken maddenin seri üretimi, pestisitlerin kimyasal sentezine kıyasla daha düşük maliyetlidir (Shoda 2000). Biyokontrol ürünler püskürtme veya ıslatma gibi geleneksel tekniklerle uygulanabildiğinden, üretimleri sabit popülasyonları oluşturma ve çoğaltma şeklinde olmasından dolayı uygulama maliyetleri düşüktür (Montesinos 2003). Bir biyoajanın, yerli mikroskobik canlılar veya ekosistemdeki diğer organizmalar üzerindeki etkisinin,

geniş spektrumlu pestisitlere göre daha az etkisinin olması önemli bir avantajdır (Emmert and Handelsman 1999). Ayrıca direnç oluşum riskinin az olması bir diğer avantajdır. Etkili bir biyokontrol ajanı yalnızca antagonistik olmamalı, aynı zamanda hedef bitkide ve/veya ortamda stabil bir şekilde hayatta kalabilmelidir. Bu zamana kadar patojen *Agrobacterium*'lara karşı kullanılan antagonistik mikroorganizmaların çoğunluğu *Agrobacterium* cinsine aittir. Şeftalide patojen *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*) üzerine inhibisyon etki gösteren ilk etkili biyokontrol ajan, Avustralya'da izole edilmiş *R. radiobacter* (*A. radiobacter*) K-84'tür (Kerr 1972). Dünya genelinde tümörülen *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*)'in neden olduğu kök kanseri hastalığının biyolojik kontrolü için ticari bir ajan olarak kullanılmaktadır (Farrand and Wang 1992). Biyolojik mücadele ajanı olarak ilk denemelerden sonra K-84 farklı birçok bitkide hızlıca test edilmiştir (Moore and Warren 1979). 1972'den beri, *R. radiobacter* (*A. radiobacter*) K-84, kök kanseri etmeni ile bulaşık topraklarda kök daldırması, tohum ve toprak muamelesi, olmak üzere dünya çapında hastalığın kontrolü için etkili ve yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Schroth and Moller 1976; Matthee *et al.* 1977; Moore 1977, 1979; Moore and Warren 1979; Panagopoulos *et al.* 1979; Gupta *et al.* 2010). Bir toprak kaynaklı patojen için hedeflenen biyolojik kontrol ajanının belki de en iyi belgelenmiş başarısı, 20 yıl boyunca tüm dünyada çeşitli bitkilerde kök kanserini kontrol etmek için kullanılan *R. radiobacter* (*A. radiobacter*) K-84'ün kullanılması olmuştur.

R. radiobacter (*A. radiobacter*) K-84 izolatu üç plazmit içermektedir. 47 kb pAgK84, birçok patojenik *Agrobacterium* izolatına karşı etkili ve spesifik bir antibiyotik olan agrocin 84'ü üretmektedir (Slota and Farrand 1982; Farrand and Wang 1992). Agrocin 84, agrocinopine benzeyen ve DNA sentezini inhibe eden bir adenin nükleotid analogudur. İkinci plazmid 173 kb pNoc, nopalın katabolizmasını kodlar, ancak virülans ve onkogenik fonksiyonlardan yoksundur (Clare *et al.* 1990). Üçüncü, daha az karakterize edilmiş büyük (300-400 kb) bir plazmid ve ikinci bir antibiyotik olan agrocin 434'ü kodlar (Donner *et al.* 1993; McClure *et al.* 1998). Bu antibiyotiklerin yanı sıra, K-84, aynı zamanda ALS84 adı verilen bir siderefor üretmektedir (Penyalver *et al.* 2001). K-84 izolatu ayrıca farklı ülkelerde Agrocin 84'e dirençli patojenleri de

kontrol edebildiği gösterilmiştir (Bouzar *et al.* 1983; Lopez *et al.* 1987; Lopez *et al.* 1989; Vicedo *et al.* 1993). Agrocine 84'e dirençli patojenlerin kontrolünde rol oynayan mekanizmalar tespit edilememiştir, ancak bu mekanizmaların agrocine 84'ün üretimi ile veya pAgK84 ile ilişkili olmadığı bilinmektedir (Lopez *et al.* 1989). Bu bulgular K-84'ün biyolojik kontrol özelliklerinin karmaşık olduğunu ve Agrocine 84 üretiminin bileşenlerden sadece biri olduğunu göstermektedir (Farrand and Wang 1992).

Faivre *et al.* (1979), süs bitkilerinden Chantilly Blanc, Eureka ve Madame Wolf'un krizantem çeşitlerinde kök kanserini kontrol etmek için K-84 suşu kullanmışlar ve uygulama yapılmayanlarda hastalık %97,1 görülürken uygulama yapılmışlarda hastalık %5,83 oranında görüldüğünü kaydetmişlerdir.

Vicedo *et al.* (1993)'de yaptıkları bir çalışma ile pAgK84'ün K-84 izolatından patojenik izolatlara transferi sonucu biyolojik mücadelenin etkinliğini azaltabileceğini belirtmişlerdir. Çünkü pAgK84 agrocine üretimini ve Agrocine 84'e dayanıklılığı kodlar. Bu transferden kaçınmak için K-84'ün stabil bir Tra⁻ delesyonu yoluyla K-1026 mutanlığı yapılmıştır (Jones *et al.* 1988) yani K-1026, pAgK84'ün transfer bölgesinde bir delesyon içermektedir. K-1026'ın patojen izolatların biyolojik kontrolünde K-84 kadar etkili olduğu belirlenmiştir. Bugüne kadar, her iki izolatın kök kanserini kontrol etme, plazmid transferi, antibiyotik üretimi, kök kolonizasyonu ve rizosferde yaşama süresi kabiliyetlerini karşılaştırmak için çok sayıda çalışma yapılmıştır (Gupta *et al.* 2010). K-1026, 1988 sonunda Avustralya'da biyopestisit olarak tescil edildi ve ticari ürün Nogall olarak satılmaktadır (Bullard 1988). Başka bir turba bazlı formülasyon olan *A. radiobacter* suşu K-84'ün saf kültürünü içeren Dygall Yeni Zelanda'da ruhsatlıdır. Galltrol, California AgBiochem tarafından üretilen başka bir ticari formülasyon, aynı bakterinin bir agar plak kültürüdür. Amerika Birleşik Devletleri'nde, Çevre Koruma Ajansı (EPA), Galltrol-A ve Nobac 84-C'nin tescilini sağlamıştır (Carter 1989).

R. radiobacter (*A. radiobacter*) K-84 ticari olarak agar plakalarında karboksimetil selüloz ve ince öğütülmüş bir turba içeriğine sahip bir formülasyonda üretimi yapılmaktadır (Galltrol; AgBiochem, Inc., Orinda, California).

Arazi koşullarında dikimden önce tohumların veya köklerin bir K-84 süspansiyonuna daldırılması, güllerin köklerinde (Kerr 1980; Farkas and Haas 1985; Jones *et al.*1991) ve birkaç sert çekirdekli meyve üzerinde şeftali (Kerr 1972), badem (Jones and Kerr 1989) ve kiraz (Moore 1977) gibi kök kanseri oluşumunu önledikleri farklı araştırmacılar tarafından belirlenmiştir.

Pseudomonas, *Bacillus*, *Brevibacillus* cinsleri farklı meyve anaçlarında kök kanserine karşı test edilmiş ve *R. radiobacter* (*A. radiobacter*) K-84 dışında hastalığı kontrol edebilen diğer biyolojik mücadele ajanları olduğu bildirilmiştir (Gupta and Kamal 2006; Gupta *et al.* 2007; Gupta *et al.* 2010).

Hayman and Farrand (1988) *B. subtilis* izolatlarını, *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*), C58, AR125 ve B6 izolatlarına karşı çok etkili olduğunu gözlemlemişlerdir. Bununla birlikte, *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*)'in B6 izolatına karşı *in vitro* koşullarda referans antagonist suş olan K-84 ve K-1026 bir inhibisyon zonu oluşturmadığı bilinmektedir. Buna göre, *B. subtilis* izolatlarının antibakteriyel bileşiklerinin, K-84 ve K-1026'dan farklı olduğunu ortaya koymuşlardır.

Zhang *et al.* (1991)'de yaptıkları bir çalışmada bakteriyel antagonist izolat olan *P. fluorescens*'in şeftali bitkisindeki ur oluşumunu %95 oranında kontrol altına alabildiğini ortaya koymuşlardır.

Handelsam and Stabb (1996)'da rizosferde bulunan antagonistlerin kolonizasyonunun hızlı ve uzun süre toprakta canlılığını devam ettirmesinin toprak kaynaklı patojenlerin biyolojik kontrolü için gerekli olduğunu kanıtlamışlardır. *R. radiobacter* (*A. radiobacter*) K-84 ve K-1026 izolatları farklı konukçu bitkilerin kök sistemine iyi ve hızlı kolonize olduğunu kanıtlanmışlardır (Vicedo *et al.* 1993).

Khmel *et al.* (1998)'de *P. aureofaciens* B4117 ve *P. fluorescens* CR330D izolatlarını birarada kullanmak üzere ahududu ile asmada sorun olan *A. tumefaciens*'e karşı *in vivo* şartlarda test etmişler ve asmada hastalığı %56-80 arasında azalttıklarını

kaydetmişlerdir. Elde ettiği sonuçların, bu antagonistlerin kullanımıyla ilgili etkili bir yöntem olduğunu savunmuşlardır.

Wang *et al.* (2000)'de Çin'de yaptıkları bir çalışmada K-84 izolatı genetik olarak modifiye edildiğinde kiraz çiçeklenmesinde ur oluşumunu %67 ile 99 oranında kontrol edebildiğini bildirmiştir.

Silva and Romerio (2001)'de sera koşullarında gül üzerinde ur oluşumuna karşı etkili 14 *Actinomyces* tespit etmişlerdir.

Benjama *et al.* (2002), Fas'ta 206 adet patojenik *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*), izolatına karşı *in vitro* koşullar altında *R. radiobacter* (*A. radiobacter*) K-84 ve K-1026'yı test etmişler ve K-1026 suşunun K-84 suşundan daha etkili olduğunu bulmuşlardır.

Wazir *et al.* (2002)'de kiraz anacı Colt'ta *R. radiobacter* (*A. radiobacter*) K-1026'nın ticari bir formülasyonu olan Nogall'ın ur oluşumu üzerine etkinliğini anaçlara dikimden önce 150 mg/l uygulayarak etkili sonuçlar aldıklarını bildirmişlerdir.

P. aureofaciens ve *P. fluorescens* asma ve ahududa ur oluşumunu engellemiştir. Benzer bir etki *P. putida*, *Burkholderia phytofirmans* ve *Azospirillum brasilense* strainleri 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase üreterek bitkide etilen sentezinin öncüsünü degrede olmasını sağlayarak domates bitkilerinde ur oluşumunu engelledikleri açığa çıkarılmıştır.

Rhouma *et al.* (2004)'de Tunus'ta *R. radiobacter* (*A. radiobacter*) suşu K-84'ü ve bunun genetik olarak değiştirilmiş izolatı K 1026'yı acı badem üzerindeki ur oluşumuna karşı test etmişler ve her iki antagonistik suşun, bitki başına düşen ur sayısını önemli ölçüde azalttığını bulmuşlardır.

Gupta and Khosla (2007)'de *B. subtilis* izolatu (patojenden 24 sa önce biyoajan verilmesi) ve toprak solarizasyonunun birlikte uygulanmasıyla kiraz anacı olan Colt'ta ur oluşumlarını çok etkili bir şekilde azalttığını ortaya koymuşlardır.

Chen *et al.* (2007) *Rahnelia aquatilis* HX2 izolatu asma kök bölgesinden izole edilmiş ve *R. vitis*, *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*), ve *R. rhizogenes*'e karşı *in vitro* koşullarda test edilmiş ve patojenlerin gelişmelerini engellediğini belirlemişlerdir.

Hammami *et al.* (2008) *B. subtilis* 14B strainini *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*)'e karşı kullanmışlardır. *B. subtilis* 14B üretmiş olduğu Bacteriosin 14B sayesinde hastalığı inhibe ettiğini ortaya koyulmuştur.

Yangui *et al.* (2008)'de zeytin değirmeni atık suyunu *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*)'in neden olduğu kök kanserine karşı *in vitro* ve *in vivo* şartlarda test etmişler. *In vitro* şartlarda yüksek düzeyde antibakteriyel gösterdiğini, saksı denemelerinde hastalığı önemli derecede azalttığını kaydetmişlerdir. Aynı zamanda zeytin atık suyundan izole edilmiş 5 bakteri izolatıda antagonistik etki gösterdiğini belirlemişlerdir.

Stanojković *et al.* (2009)'da yapmış oldukları bir çalışmada Asteraceae familyasına ait bazı bitki ekstraktlarının antibakteriyel etkilerinden dolayı *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*)'den kaynaklı ur oluşumunu engelleyebileceğini *in vitro* şartlarda belirlemişler ve formülasyona dönüştürebilirse preparat olarak hastalığa karşı koruyucu olarak kullanılabileceğini kaydetmişlerdir.

Dandurishvili *et al.* (2010)'da *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*) ve *R. vitis*'den kaynaklı ur oluşumunu engellemek için *Serratia plymuthica* IC1270, *P. fluorescens* Q8r1-96 ve *P. fluorescens* B-4117 izolatlarını kullanmışlar ve *in vitro* ve sera koşullarında domates bitkisinde ur oluşumunu engellediğini gözlemlemişlerdir.

Tolba and Soliman (2013)'de Yunanistan'da gül bitkisinden izole edilmiş *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*)'e karşı *B. megaterium*, *Paenibacillus polymyxa*, *P. fragi*,

P. viridiflava ve *P. asplenii* ve *Curtobacterium flaccumfaciens* bakterilerini kullanmışlar ve önemli derecede ur oluşumunu engelleyebildiklerini hem *in vitro* hem de *in vivo* koşullarda ortaya koymuşlardır. *C. flaccumfaciens*, gül sürgünleri ve kalanchoe yapraklarında hastalığı %100, aynı antagonist, kabak meyvelerinde %75 oranında azaltmıştır. Aynı şekilde, *P. asplenii*, *P. viridiflava* ve *P. polymyxa*, kalanchoe yaprakları ve kabak meyvesinde hastalık oluşumunu yaklaşık %100'e kadar düşürürken, gül sürgünlerinde sırasıyla %66,7; 55,6 ve 44,5'e düşürmüştür.

Kawaguchi *et al.* (2013) yılında elma ağacında görülen kök kanseri hastalığına karşı non-patojenik *R. vitis*, VAR03-1, biyoajan olarak kullanmışlar ve hastalığı başarılı bir şekilde önleyebildiğini gözlemlemişlerdir.

Limanska *et al.* (2015)'de yaptıkları çalışmaya göre *Lactobacillus* cinsine ait bakterilerin de *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*)'e karşı kullanılabilme potansiyeline sahip olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca *L. plantarum*, FAO tarafından biyokoruma sisteminde güvenilir olarak kabul edilmiş bir bakteri türüdür.

Kahla *et al.* (2017)'de *Eucalyptus cinerea* bitkisinin içermiş olduğu antimikrobiyal maddelerden kaynaklı uçucu yağları *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*)'e karşı açmış oldukları yara başına 0,625 and 2,5 mg olacak şekilde kullanmışlar ve urların ağırlığında sırasıyla %95, %97,5 oranında azalma gözlemlemişlerdir. Ayrıca domates tohumlarına da bu uçucu yağı test etmişler ve fitotoksik etkisinin olmadığını belirlemişlerdir. Bu sonuçlara göre kök boğazı kanserinin biyolojik olarak önlenmesi açısından iyi bir biyokontrol madde olma potansiyeline sahip olduğunu göstermişlerdir.

Abdallah *et al.* (2018)'de ilk kez *B. amyloliquefaciens*'in üretmiş olduğu 32a lipopeptinin *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*) C58 ve B6'nın biyofilmleri üzerindeki etkilerini çalışmışlar ve güçlü bir biyosüpfektan madde olmasının yanısıra *Agrobacterium* hücrelerine karşı bakteriyosidal etkiye sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Daha da önemlisi, lipopeptid bakımından zenginleştirilmiş ekstre, yaralı dokulara

patojen bulaşmasından sonra tedavi amaçlı uygulandığında domates gövdesinde ur oluşumunu inhibe ettiğini de ortaya koymuşlardır.

Liang *et al.* (2019)'da *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*)'in kiraz anacı Gisela 6'da enfeksiyon öncesi ve sonrasındaki fizyolojik değişiklikleri incelemek bitki savunma mekanizmasında rol alan enzimlerin aktivitelerini ve fitohormonların içeriklerini tayin etmişlerdir. *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*) ile enfeksiyon, Peroksidaz (POD), Superoksit dismutaz (SOD), Polifenol oksidaz (PPO), Askorbat peroksidaz (APX), Monodehidroaskorbat redüktaz (MDHAR), ve Glutation redüktaz (GR),'ın aktivitelerini ve Jasmonik asit (JA) içeriğini arttırdığını ancak Katalaz (CAT) ve Fenilalanin amonilaz (PAL) aktiviteleri ile Salisilik asit (SA) içeriğinde anlamlı bir fark bulunmadığını belirlemişlerdir.

3. MATERİYAL ve YÖNTEM

Bu çalışma Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Bitki Klinik Laboratuvarında yürütülmüştür.

3.1. Materyal

Potansiyel patojen izolatlar: Erzurum ve Adana illerinde farklı zamanlarda izole edilmiş beş farklı *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*) izolatları oluşturmuştur.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan potansiyel patojen izolatlar ve izole edildiği bitkiler

Sıra	Patojen izolat	İzole edildiği bitki
1.	1A	Şeftali
2.	1B	Şeftali
3.	2A	Kayısı
4.	2B	Kayısı
5.	RK 473	Elma

Potansiyel biyoajan izolatlar: Çalışmada kullanılan aday potansiyel biyoajan bakterileri Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü Kültür Koleksiyonu'nda muhafaza edilen bakteriler oluşturmuştur. Bu izolatların birçoğu daha önce farklı çalışmalarda farklı bakteriyel ve fungal bitki patojenlerine ve bitki zararlılarına karşı test edilmiş izolatlardan ve ilk kez bu çalışmada test edilmiş izolatlardan oluşmuştur (Kotan 1998; Kotan 2002; Kotan *et al.* 2002; Karagöz 2009; Kotan *et al.* 2009; Erman *et al.* 2010). Bu izolatların tanıları, klasik tanı yöntemleri ve bakterilerin yağ asitleri izole edilerek mikrobiyal identifikasyon sistem (MIS)'de yapılmıştır (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan potansiyel biyoajan bakteri izolatlarının ait olduğu cinsler ve izolat sayıları

	Bakteri Cinsi	IS*		Bakteri Cinsi	IS*		Bakteri Cinsi	IS*		Bakteri Cinsi	IS*
1	<i>Bacillus</i> spp.	388	28	<i>Klebsiella</i> spp.	9	55	<i>Neisseria</i> spp.	3	82	<i>Colwellia</i> spp.	1
2	<i>Pseudomonas</i> spp.	184	29	<i>Sphingobacterium</i> spp.	9	56	<i>Thermus</i> spp.	3	83	<i>Comamonas</i> spp.	1
3	<i>Erwinia</i> spp.	77	30	<i>Brevundimonas</i> spp.	8	57	<i>Deinococcus</i> spp.	2	84	<i>Corynebacterium</i> spp.	1
4	<i>Enterobacter</i> spp.	70	31	<i>Clavibacter</i> spp.	8	58	<i>Dermabacter</i> spp.	2	85	<i>Delftia</i> spp.	1
5	<i>Brevibacillus</i> spp.	69	32	<i>Pseudoalteromonas</i> spp.	8	59	<i>Edwardsiella</i> spp.	2	86	<i>Desemzia</i> spp.	1
6	<i>Paenibacillus</i> spp.	59	33	<i>Myroides</i> spp.	7	60	<i>Ewingella</i> spp.	2	87	<i>Dermabacter</i>	1
7	<i>Pantoea</i> spp.	48	34	<i>Achromobacter</i> spp.	6	61	<i>Hydrogenophaga</i>	2	88	<i>Dunganella</i> spp.	1
8	<i>Kocuria</i> spp.	44	35	<i>Kurthia</i> spp.	6	62	<i>Gluconacetobacter</i> spp.	2	89	<i>Empedobacter</i> spp.	1
9	<i>Acinetobacter</i> spp.	37	36	<i>Microbacterium</i> spp.	6	63	<i>Kingella</i> spp.	2	90	<i>Flavimonas</i> spp.	1
10	<i>Arthrobacter</i> spp.	37	37	<i>Rhodococcus</i> spp.	6	64	<i>Kluyvera</i> spp.	2	91	<i>Gordona</i> spp.	1
11	<i>Salmonella</i> spp.	34	38	<i>Methylobacterium</i> spp.	5	65	<i>Kytococcus</i> spp.	2	92	<i>Kytococcus</i> spp.	1
12	<i>Micrococcus</i> spp.	30	39	<i>Chromobacterium</i> spp.	5	66	<i>Lysobacter</i> spp.	2	93	<i>Micobacterium</i> spp.	1
13	<i>Xanthomonas</i> spp.	29	40	<i>Geobacillus</i> spp.	5	67	<i>Nocardia</i> spp.	2	94	<i>Ochrobactrum</i> spp.	1
14	<i>Chryseobacterium</i> spp.	28	41	<i>Photobacterium</i> spp.	5	68	<i>Novosphingobium</i> spp.	2	95	<i>Pandorea</i> spp.	1
15	<i>Alcaligenes</i> spp.	26	42	<i>Photorhabdus</i> spp.	5	69	<i>Plesiomonas</i> spp.	2	96	<i>Pediococcus</i> spp.	1
16	<i>Burkholderia</i> spp.	22	43	<i>Acidovorax</i>	4	70	<i>Providencia</i> spp.	2	97	<i>Proteus vulgaris</i>	1
17	<i>Paenibacillus</i> spp.	22	44	<i>Bergeyella</i> spp.	4	71	<i>Psychrobacter</i>	2	98	<i>Pseudoxanthomonas</i> spp.	1
18	<i>Salmonella</i> spp.	22	45	<i>Citrobacter</i> spp.	4	72	<i>Ralstonia</i> spp.	2	99	<i>Rahnella</i> spp.	1
19	<i>Aeromonas</i> spp.	19	46	<i>Escherichia coli</i>	4	73	<i>Shewanella</i> spp.	2	100	<i>Raoutella</i> spp.	1
20	<i>Serratia</i> spp.	19	47	<i>Hafnia</i> spp.	4	74	<i>Tetragenococcus</i> spp.	2	101	<i>Rothia</i> spp.	1
21	<i>Yersinia</i> spp.	19	48	<i>Proteus</i> spp.	4	75	<i>Weeksella</i> spp.	2	102	<i>Shigella</i> spp.	1
22	<i>Staphylococcus</i> spp.	18	49	<i>Sphingomonas</i> spp.	4	76	<i>Virgibacillus</i> spp.	2	103	<i>Variovorax</i> spp.	1
23	<i>Leclercia</i> spp.	13	50	<i>Stenotrophomonas</i> spp.	4	77	<i>Varivorax</i> spp.	2	104	<i>Zobellia</i>	1
24	<i>Agrobacterium</i> spp.	12	51	<i>Actinomadura</i> spp.	3	78	<i>Streptovorticillium</i> spp.	2	105	Tanımlanamadı	451
25	<i>Brevibacterium</i> spp.	12	52	<i>Cellulomonas</i> spp.	3	79	<i>Aerococcus</i> spp.	1			
26	<i>Curtobacterium</i> spp.	11	53	<i>Flavobacterium</i> spp.	3	80	<i>Cellulosimicrobium</i> spp.	1			
27	<i>Vibrio</i> spp.	11	54	<i>Janthinobacterium</i> spp.	3	81	<i>Chyseomonas</i> spp.	1		TOPLAM	2012

* IS: İzolat sayısı

3.1.1. Bakterinin geleneksel yöntemlerle tanısında kullanılan malzemeler

Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Bitki Klinik Laboratuvar'ında bulunan farklı büyüklükte cam ve plastik malzemeler, petri kapları (90 mm, 60 mm), cam pipet ve pastör pipeti, çeşitli kimyasal malzemeler, mikropipet (Ependorf), hassas terazi (Scaltec), hemotolojik çalkalayıcı (Fisher), ısıtıcı ve karıştırıcı (Nüve, MK318), su banyosu (Bandelin Sonorex), çalkalayıcı (Gerhardt), pH metre (Hanna), inkübatör (Nüve ES500), saf su cihazı (Gfl 2004), otoklav (Hirayama), spektrofotometre (Shimadzu), steril kabin, santrifüj (Hettich Universal 32R), vorteks (Velp Scientifica), türbidimetre (Biolog), PZR Cihazı (Biorad Thermocycler), jel tankı (Biorad), derin dondurucu (-80°C Wisd) ve buzdolabı (Arçelik) bu tez çalışması kapsamında kullanılmıştır.

3.1.2. Besiyerleri

Patojen ve biyoajan bakterilerin inokulum olarak üretilmelerinde ve etki mekanizmalarının saptanmasına yönelik çalışmalarda farklı besiyerleri kullanılmış olup bu besiyerlerinin içeriği Çizelge 3.3'de verilmiştir.

Çizelge 3.3. Çalışmalarda kullanılan besiyerleri ve bileşimleri

Besiyeri adı	Kullanım amacı	İçeriği (1 L)
Nutrient Agar (NA)	Bakteri inokulumu üretimi	23 g NA
Nutrient Broth (NB)	Bakteri inokulumu üretimi	8 g NB
King B	Bakteri inokulumu üretimi	20 g Pepton 1,5 g MgSO ₄ .7H ₂ O 1,5 g K ₂ HPO ₄ 10 g Gliserol 16 g Agar
Nutrient Sükroz Agar (NSA)	Levan testi	5 g Peptone 3 g Beef extract 5 g Sükroz 15 g Agar

Çizelge 3.3. (devam)

Besiyeri adı	Kullanım amacı	İçeriği (1 L)
National Botanic Research Institute's Phosphate (NBRIP)	Biyoajan bakterilerin fosfat çözünürlüklerinin tespiti	20 g Glukoz 5 g $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 0,5 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,2 g KCl 0,25 g MgSO_4 0,5 g Yeast ekstrakt
Chrome Azurol S Agar (CAS)	Biyoajan bakterilerin siderefor üretiminin tespiti	60,5 mg CAS 10 ml (1mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ + 10 mM HCL) 72,9 mg HDTMA 30,32 g Pipes 12 g NaOH(%50 w/v) 3 g KH_2PO_4 5 g NaCl 10 g NH_4Cl 20 mM MgSO_4 1 mM CaCl_2 15 g Agar
Demir Amonyum Sitrat Besiyeri	<i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>)'e özel besi ortamı	$(\text{NH}_4)_5\text{Fe}(\text{C}_6\text{H}_4\text{O}_7)_2$ 10g 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g CaCl_2
Litmus Milk Besiyeri	<i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>)'e özel besi ortamı	100 g Skim Milk 4 mg Bromcresol purple
Asit Üretimi Temel Besiyeri	<i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>)'e özel besi ortamı	1 g $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 0,2 g KCl 1 g Yeast ekstrakt 3 ml Bromthymol blue 0,2 g $\text{Mg}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,5 g Agar
Sitrat Besiyeri	<i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>)'e özel besi ortamı	2 g Sodyum sitrat 0,2 g $\text{Mg}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 1 g K_2HPO_4 5 g NaCl 15 ml Bromthymol blue 1,5 g Agar

Çizelge 3.3. (devam)

Besiyeri adı	Kullanım amacı	İçeriği (1 L)
Malonik Asit besiyeri	<i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>) 'e özel besi ortamı	2 g (NH ₄) ₂ SO ₄ 0,4 g KH ₂ PO ₄ 0,6 g K ₂ HPO ₄ 2 g NaCl 0,1 g Yeast ekstrakt 3 g Malonik asit, sodyum tuzu 2,5 ml Bromthymol blue [%50 etanol içerisinde %1 (w/v)]
Mucic ve L-tartarik Asit Besiyeri	<i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>) 'e özel besi ortamı	0,5 g NaNH ₄ PO ₄ 0,17 g NaH ₂ PO ₄ 0,2 g KCl 2,5 ml Bromthymol blue

3.1.3. Kullanılan test bitkileri

Patojenite çalışmalarında havuç dilimleri (*Daucus carota* L.) ve kabak meyveleri (*Cucumis pepo*), domates (*S. lycopersicum* L.) ve ayçiçeği (*Helianthus annus* L.) fideleri, kalonşe (*Kalonchoe daigremontiana* Raym-Hamet and H.Perrier) yaprakları ile GF 677 şeftali (*Prunus persica* x *Prunus amygdalus*), M9 ve MM106 (*Malus domestica* L.) elma anaçları kullanılmıştır.

Çalışmanın ilk basamağı olan potansiyel patojenlerin virülanslık testi (havuç dilimleri ve kabak meyvelerinde), patojen-biyoojan petri denemeleri Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Bitki Klinik Laboratuvarında yürütülmüştür. Çalışmanın patojenite ve seralarda yürütülen aşamalarında, 5 numara (23x17 cm) saksılar ve yetiştirme ortamı olarak steril torf ve perlit karışımı (3:1) kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Potansiyel patojen bakteri izolatlarının virölanslık testleri ve aşırı duyarlılık reaksiyonu

Daha önceden farklı araştırmacılar tarafından izole edilmiş beş adet potansiyel patojen bakteri izolatın patojenite yeteneklerini test etmek ve aralarında en virulent olanını tespit etmek amacıyla havuç dilimleri (*D. carota* L.) ve kabak meyveleri (*C. pepo*), domates (*S. lycopersicum* L.) ve ayçiçeği (*H. annuus* L.) fideleri, kalonşe (*K. daigremontiana* Raym.-Hamet and H. Perrier) yaprakları ile GF 677 (*P. persica* x *P. amygdalus*) şeftali, M9 ve MM106 elma (*M. domestica* L.) anaçları kullanılmıştır.

Eastwell *et al.* (2006)'ya göre bakteri inokulumu hazırlanmıştır. Buna göre NA besiyerinde 48 sa geliştirilmiş bakteriler, 250 ml sıvı NB'ye aktarılmış ve 24 sa daha gelişmeleri beklenmiştir. Bu süre sonunda sıvı besiyerinde gelişmiş bakteriler 30 dk boyunca +4°C buzdolabında bekletilmiştir. Daha sonra 50 ml'lik falcon tüplerine aktarılan bakteriler 6000 rpm'de 15 dk santrifüj yapılmış ve pellet kısmı 2 kez %0,85'lik NaCl (serum fizyolojik) ile yıkanmıştır. En son aşamada bakteri süpernatantları steril saf su ile spektrofotometre cihazında absorbansı 600 nm'de ayarlanmıştır.

Havuç dilimlerinde virölanslık testi: Marketten alınmış havuçlar steril kabin içerisinde önce %10'luk sodyumhipoklorit (NaClO) içinde 20 dk bekletilmiş ve sonra 3 defa steril dH₂O ile yıkanmıştır. Bütün olarak steril edilmiş havuçlar kalınlıkları 0,5-0,8 cm olacak şekilde dilimlenmiş ve içlerine nemli kurutma kağıtları serilmiş olan 90 mm çapındaki petri kaplarına yerleştirilmiştir. Daha sonra havuç dilimlerinin yüzeyi steril bistüri ucuyla hafifçe çizilmiş ve mikropipet yardımıyla Eastwell *et al.* 2006'ya göre hazırlanmış olan her bir bakteri inokulumundan 100 µL (OD₆₀₀ nm'de 2; 1; 0,5 ve 0,25 ayarlanmış) inokule edilmiştir. Her bir bakteri için uygulama 3 tekerrürlü ve her tekerrürde 3 havuç dilimi olmak üzere toplam 9 havuç dilimi kullanılmıştır. Kontrol olarak steril dH₂O kullanılmıştır. Petri kapları 16 sa aydınlık/8 sa karanlık fotoperiyotta

oda sıcaklığında 30 gün süreyle bekletilmiş, Şekil 3.1’de verilen skalaya göre değerlendirme yapılmış ve değerlendirme sonuçları JMP 5.0.1 istatistik analiz programı ile analiz edilerek en virulent izolat belirlenmiştir (Limanska *et al.* 2015).



Şekil 3.1. Havuç dilimlerinde virülanslık test skalası

Skala değerleri:

1. Ur gelişimi yok
2. Ur gelişimi hafif yüzeye yayılmış
3. Ur gelişimi iletim dokusu etrafında başlangıcı
4. Ur gelişimi iletim dokusu etrafında belirgin gelişmiş ve hafif yüzeye yayılmış
5. Ur gelişimi iletim dokusu etrafında belirgin gelişmiş ve yüzeye yayılmış
6. Yoğun ur gelişimi ve yüzeyi tamamen kaplamış

Kabak meyvesinde virülanslık testi: Marketten alınan kabaklar önce %10'luk NaClO 10 dk bekletilmiş ve 3 defa sdH₂O ile yıkanmıştır. Daha sonra her bir bakteri için 1 adet kabak meyvesi kullanılmış ve her birinin üzerine steril kürdan yardımıyla 12 adet çukur açılmıştır. Her bir çukura Eastwell *et al.* 2006'ya göre hazırlanmış olan bakteri inokulumundan 10 µL konulmuş ve parafilm ile sarılmıştır. Kabak meyveleri kurutma kağıdı serilmiş olan steril şeffaf kutulara yerleştirilmiştir. Daha sonraki aşamada 16 sa aydınlık/8 sa karanlık oda sıcaklığında bekletilmişlerdir. Kontrol uygulaması olarak sdH₂O kullanılmıştır. İnokulasyondan 10-15 gün sonra oluşan urların büyüklüğü ve sayısına göre değerlendirme yapılmıştır. En erken ur oluşturan ve ur çaplarına göre değerlendirme yapılmıştır (Tolba and Soliman 2013).

Kalonşe yapraklarında virölanslık testi: Patojen izolatların virölanslıklarını test etmek için 10-20 cm uzunluğunda genç kalonşe bitkilerinin yaprakları kullanılmış ve 48 sa NA' da geliştirilmiş olan patojen bakteri izolatları kürdan yardımıyla yaprakların karşılıklı damarları boyunca inokule edilmiştir. Kontrol olarak steril dH₂O kullanılmıştır. Her bir patojen bakteri izolatu için 3 yaprak kullanılmış ve her yaprağa 2 adet yara açılmıştır. Yara yerleri inokulasyondan sonra pamuk ve parafilm ile kapatılmıştır (Şekil 3.2). Ur varlığı/yokluğuna göre değerlendirme yapılmıştır (Minnemayer *et al.* 1991)



Şekil 3.2. Patojen izolatların test bitkilerine inokulasyonu (a) ayçiçeği fidesi, (b) kalonşe yaprağı, (c) domates fidesi

Domates ve ayçiçeği fidelerinde virölanslık testi: ~5 haftalık domates ve ayçiçeği fideleri kullanılmıştır. Fidelerin gövdelerinde daha hızlı ur oluşturmaları sebebiyle gövde üzerinde steril neşter yardımıyla yara açılmış (kök boğazından yaklaşık 10 cm üzerinden başlayarak) ve yara yerlerine Eastwell *et al.* 2006'ya göre hazırlanmış olan patojen bakteri inokulumlarından 100 µL inokule edilmiştir. Yara yerleri daha sonra pamuk ve parafilm ile kapatılmış ve 10 gün boyunca yara yerleri nemlendirilmiştir. Kontrol uygulaması olarak yara yerlerine steril dH₂O verilmiştir (Şekil 3.2). Her bir uygulama için 5 bitki her bitkide ise 3'er yara açılmış olup toplamda 15 yara yeri

değerlendirilmeye tabi tutulmuştur (Jaeger 1974). İnokulasyondan 8 hafta sonra ur varlığı/yokluğuna göre değerlendirilme yapılmıştır.

Fidanlarda virülanslık testi: ~30 cm boyundaki şeftali (GF 677) ve elma (M9 ve MM106) anaçları kullanılmıştır. Fidanların gövdelerinde daha hızlı ur oluşturmaları sebebiyle gövde üzerinde steril neşter yardımıyla yara açılmış (kök boğazından yaklaşık 10 cm üzerinden başlayarak) ve yara yerlerine Eastwell *et al.* 2006'ya göre hazırlanmış olan patojen bakteri inokulumlarından 100 µL inokule edilmiştir. Yara yerleri daha sonra pamuk ve parafilm ile kapatılmış ve 10 gün boyunca yara yerleri nemlendirilmiştir. Kontrol uygulaması olarak yara yerlerine steril dH₂O verilmiştir. Her bir uygulama için 5 fidan her fidanda ise 3'er yara açılmış olup toplamda 15 yara yeri değerlendirilmeye tabi tutulmuştur (Jaeger 1974). Ayrıca kökler yaralanarak patojen solüsyonlarına daldırma yöntemiyle de patojenite testi yapılmıştır. Uygulamadan 6 ay sonra ur varlığı/yokluğuna göre değerlendirilme yapılmıştır. Fidanlarda gövde inokulasyonu değerlendirilmesi yara yerlerinde oluşan urların büyüklüğüne göre oluşturulan skalaya bağlı olarak değerlendirme yapılmıştır (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Anaç fidanlarında virülanslık test skalası

Skala değerleri

1. yara yerinde bir değişim yoksa
2. yara yerinin genişliği 0,5-1 cm
3. yara yerinin genişliği 1-2 cm
4. yara yerinin genişliği 2-3 cm olursa
5. yara yerinin genişliği 3-5 cm olursa

Aşırı duyarlılık reaksiyon testi (Hipersensitif reaksiyon-HR): NA besi yerinde ~48 sa geliştirilen patojen bakteri izolatları steril dH₂O içerisinde 10⁸ kob/ml yoğunluğunda süspansiyon hazırlanmıştır. Hazırlanan süspansiyonların her biri tütün (*N. tabacum* var. *Samsun*) bitkisinin yan damarlarında iki damar arasındaki alana enjektör yardımıyla inokule edilmiştir. Bakteri inokule edilen alanda 24-48 sa sonra su emmiş gibi şeffaf görünüm oluşması pozitif olarak değerlendirilirken negatif kontrol olarak steril dH₂O kullanılmıştır (Lelliot and Stead 1987).

3.2.2. Potansiyel patojen bakteri izolatlarının klasik yöntemlerle tanısı

Farklı araştırmacılar tarafından izole edilmiş, virölensliği belirlenmiş ve MIS sistemi ile tanısı yapılmış beş adet potansiyel patojen izolatın (1A, 1B, 2A, 2B, RK 473) tanısını klasik yöntemlerle de desteklemek amacıyla biyokimyasal ve fizyolojik testlere tabi tutulmuştur. Bu testler *Agrobacterium* cinsinde yer alan üç türün (*A. tumefaciens*, *A. vitis*, *A. rhizogenes*) ayırımında kullanılan testler arasında en çok kullanılanlarındandır. Bu tez çalışması kapsamında Çizelge 3.4’de yer alan biyokimyasal ve fizyolojik testler yapılmıştır.

Çizelge 3.4. *Agrobacterium* türlerinin ayırımında kullanılan biyokimyasal ve fizyolojik testler

Testler	A.t ¹	A.r ²	A.v ³	Referanslar
35°C gelişme	+	V	V	Anderson <i>et al.</i> (1977)
Laktozdan 3-ketolaktoz üretimi	+	V	V	Dhanvantari (1978)
%2 NaCl besi yerinde gelişme	+	-	+	Kaena <i>et al.</i> (1970)
KOH testi	-	-	-	Moore <i>et al.</i> (2001)
PDA+CaCO ₃ asit temizleme	-	+	-	Moore <i>et al.</i> (2001)
Demir amonyum sitrat kullanımı	+	-	-	Hendrickson <i>et al.</i> (1934)
Malonik asitten alkali oluşturma	-	+	+	Moore <i>et al.</i> (2001)
Mucic asitten alkali oluşturma	-	+	-	Moore <i>et al.</i> (2001)
Tartarik asitten alkali oluşturma	-	+	+	Moore <i>et al.</i> (2001)
Melezitozdan asit üretimi	+	-	-	Moore <i>et al.</i> (2001)
Eritritolden asit üretimi	-	+	-	Hayward (1964)
Sükrozdan asit üretimi	+	-	-	Dye (1968)
Sitrat kullanımı	V	+	+	Moore <i>et al.</i> (2001)
Litmus Milk'te reaksiyon	Alk	Ac	Alk	Gupta <i>et al.</i> (2005b)
Oksidaz testi	+	V	V	Kovacs (1956)

1: *Agrobacterium tumefaciens*, 2: *Agrobacterium rhizogenes*, 3: *Agrobacterium vitis*, +: %80 ve üzeri pozitif, V: %21-79 arasında pozitif, -: %80 ve üzeri negatif, **Alk**: alkali, **Ac**: Asidik

35°C'de gelişme: Potansiyel patojen bakteri izolatları NA besiyerine 3 tekerrürlü olarak ekilmiş ve 35°C'ye ayarlanmış inkübatörde gelişmeye bırakılmıştır. Gelişim gösteren izolatlar pozitif, gelişim göstermeyen izolatlar negatif olarak kabul edilmiştir (Moore *et al.* 2001).

Laktozdan 3-ketolaktoz üretimi: Potansiyel patojen bakteri izolatları 10 g laktoz, 1 g yeast ekstrakt ve 20 g agar içeren besiyerine çizgi ekim yoluyla ekilmiş ve petriler 27°C'de 2 gün inkübe edilmiştir. Daha sonra besiyeri üzerine 5-10 ml Benedict ayracı dökülmüş ve oda sıcaklığında 1 sa beklenildikten sonra kolonilerin etrafında sarı hale oluşturan izolatlar pozitif olarak kabul edilmiştir (Moore *et al.* 2001).

%2 NaCl içeren besiyerinde gelişme: %2 oranında sodyum klorür (NaCl) içeren NA besiyerine potansiyel patojen bakteri izolatları inokule edilmiştir. Gelişim gösteren izolatlar pozitif, gelişim göstermeyen izolatlar ise negatif olarak değerlendirilmiştir (Moore *et al.* 2001).

Potasyum hidroksit (KOH) testi: Temiz bir lam üzerine damlatılmış %3'lük KOH solüsyonu üzerine bir öze dolusu potansiyel patojen bakteri kültüründen konulmuş ve iyice karışması sağlanmıştır. Hemen sonra öze yukarı doğru kaldırılıp iplik gibi bir uzama gerçekleşiyor ise pozitif, uzama gerçekleşmiyorsa negatif olarak değerlendirilmiştir (Moore *et al.* 2001).

PDA+CaCO₃ besi yerinde asit temizleme: Potansiyel patojen bakteri izolatları kalsiyum karbonat (CaCO₃) içeren patates dekstroz agar (PDA) besiyerine çizgi ekim yöntemiyle ekilmiş ve petriler 25°C'de 2 gün inkübasyona bırakılmıştır. Besiyerinde gelişen koloni etrafında saydamlaşma olması pozitif olarak kabul edilmiştir (Moore *et al.* 2001).

Demir amonyum sitrat kullanımı: Demir amonyum sitrat içeren besiyerine potansiyel patojen bakteri izolatları ekilmiş ve 25°C'de 2 gün inkübe edilmiştir. Tüp üzerinde kiremit rengi bir tabaka oluşması pozitif kabul edilmiştir (Moore *et al.* 2001).

Malonik, mucic ve tartarik asit'ten alkali oluşturma testi: Malonik, mucic ve tartarik asit içeren besiyeri test tüplerine potansiyel patojen bakteri izolatları ekilmiş ve 27°C'de 2 gün inkübasyona bırakılmıştır. Mavi renk oluşumu pozitif olarak kaydedilmiştir (Moore *et al.* 2001).

Melezitoz, eritritol ve sükrozdan asit üretimi: Filtre ile steril edilmiş %10'luk melezitoz, eritritol ve sükroz ilave edilmiş temel besiyerine potansiyel patojen bakteri izolatları ekilmiş ve 25°C'de 2 gün inkübasyona bırakılmıştır. Besiyerinin renginin sarıya dönüşmesi pozitif olarak değerlendirilmiştir (Moore *et al.* 2001).

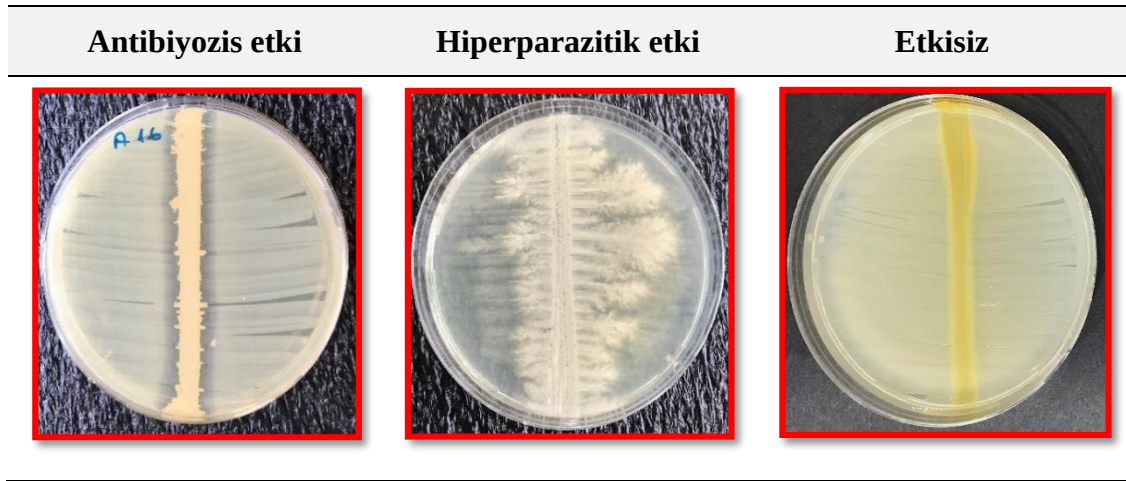
Sitrat kullanımı: Potansiyel patojen bakteri izolatları tüplerde hazırlanmış sitrat besiyerine inokule edilmiş ve besiyerinin koyu mavi renge dönmesi pozitif olarak değerlendirilmiştir (Moore *et al.* 2001).

Litmus milk'te reaksiyon: Hazırlanmış olan litmus milk besi yerine bir öze dolusu potansiyel patojen bakteri izolatu inokule edilmiş ve 27°C'de 2 gün inkübasyona bırakılmıştır. Besiyerinin mavi renge dönüşmesi alkali, pembe renk asit olarak kabul edilmiştir (Moore *et al.* 2001).

Oksidaz testi: 1 öze dolusu patojen bakteri izolatu steril filtre kurutma kağıdına çizilmiş ve üzerine %1'lik N₄-tetrametil-1-4-fenilin-diamonyum-diklorür çözeltisinden damlatılmıştır. Reaksiyon sonucu 10 s içinde koyu mor renk oluşumu pozitif, 10-60 s koyu mor renk oluşumu zayıf pozitif ve 60 s sonunda mor renk oluşmaması negatif olarak değerlendirilmiştir (Kovacks 1956).

3.2.3. Potansiyel biyoajan bakterilerin katı besiyerinde patojene karşı test edilmesi

NB besiyerine virulans test sonucu en virulent patojen seçilen 1B patojen izolatu NA içeren petrinin (90 mm) tüm yüzeyine swap yardımıyla ekilmiştir. Daha sonra bu petrilerin tam ortasına potansiyel aday biyoajanlar öze yardımıyla tek çizgi olarak çizilmiş ve petriler parafilm ile sarılarak 27°C'de 2-4 gün inkübatörde inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda biyoajanların patojen izolatu antibiyozis ve hiperparazitizm etkileşim ile kontrol edip etmediğine bakılmıştır (Şekil 3.4). Antibiyozis etkileşimde, biyoajanın patojenin gelişimine engel olup bir inhibisyon zonu (mm) oluşturmuş ve bu zonun uzunluğu mm olarak ölçülmüştür. Hiperparazitizmde ise, biyoajan zamanla patojen izolatu geliştiği alanı kaplamaya başlamıştır. Hiperparazitizmde biyoajanın kapladığı alanlarda 3 farklı noktadan ölçüm alınmıştır. Bu işlem her biyoajan bakteri için 3 kez tekrar edilmiş ve bu değerlendirmede 3 değerın ortalaması alınmıştır (Tolba and Soliman 2013).



Şekil 3.4. Patojen-biyoajan arasındaki etki

3.2.4. Katı besiyerinde antibiyozis ve hiperparazitik etkiye sahip ilk on potansiyel biyoajan bakterinin sıvı besiyerinde patojene karşı test edilmesi

NB sıvı besiyerinde 24 sa geliştirilmiş 1B patojen ve petri ortamında en etkili olan antagonistik ve hiperparazitik etkiye sahip ilk 5 izolat sıvı besiyerinde test edilmiştir. Türbidimetre cihazı yardımıyla 10^8 kob/ml konsantrasyona ayarlanmış olan patojen:biyoajan izolatlar 1:1 hacimde (5 ml patojen+5 ml biyoajan) 190 ml NB sıvı besiyerine toplam hacim 200 ml olacak şekilde karıştırılmıştır. Karıştırılma yapıldıktan hemen sonra 1 ml örnekler alınıp dilüsyonlar hazırlanmıştır. İlk karıştırılma anından sonra 5 gün ve 10 gün sonra tekrardan dilüsyonlar hazırlanıp petrilere ekim yapılarak patojen ve biyoajan kolonileri ayrı ayrı sayılmıştır.

3.2.5. Potansiyel biyoajan bakterilerin biyokimyasal ve kültürel tanı testleri

Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Klinik Laboratuvarı'nda yer alan ve 1B patojen izolatına karşı *in vitro*'da test edilmiş ve etkili olmuş biyoajan izolatların klasik yöntemlerle de tanıların desteklemek amacıyla biyokimyasal testlere tabi tutulmuştur.

Potasyum hidroksit (KOH) testi: %3'lük KOH solüsyonundan lam üzerine bir damla damlatıldıktan sonra, potansiyel biyoajan bakterilerin 48 sa kültüründen 1 öze dolusu

alınarak solüsyon ile homojen hale gelmesi sağlanmış ve daha sonra öze yukarı doğru kaldırılmıştır. Viskoz, yapışkanimsi bir uzamanın oluşması pozitif, oluşmaması negatif olarak kaydedilmiştir (Moore *et al.* 2001).

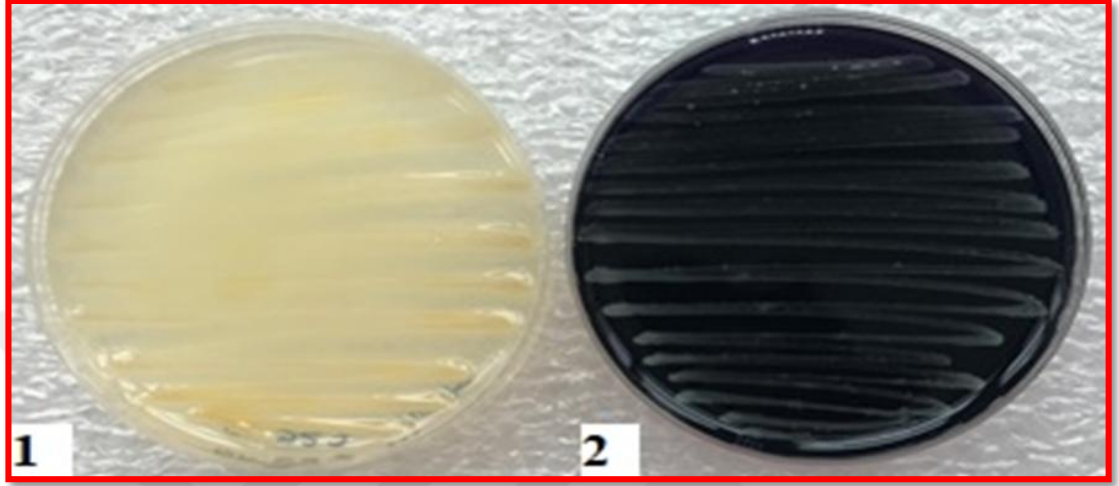
Gram boyama testi: 18-24 sa kültürden preparat hazırlanır, üzeri kristal viyole ile kaplanır ve 1 dk beklenir. Preparat dH₂O yıkanır. Preparat üzeri lugol çözeltisi ile kaplanır ve 1 dk beklenir. Lugol akıtılarak dH₂O yıkanır. Preparat üzerine %95'lik etil alkol yayılarak 10-15 s beklenir ve dH₂O ile yıkanır. Preparat daha sonra safranin ile kaplanarak 30 s beklenir. En son aşamada preparat bol dH₂O ile yıkanır ve kurutma kağıdı arasında kurutulur. Preparat mikroskopta incelenir. Kristal viyole çözeltisini hücre içinde tutabilen (mikroskop altında mor renkte görünen) bakteriler gram pozitif; Kristal viyole çözeltisini tutamayıp hücre dışına bırakan (mikroskop altında pembe-kırmızı renkte gözüken) bakteriler de gram negatif olarak değerlendirilmiştir (Beveridge, 2001).

Katalaz testi: NA besiyerinde gelişmiş 24 sa bakteri kültürlerine pastör pipet yardımıyla H₂O₂ ilave edilmiş, O₂'nin kabarcıklar halinde çıkışı gözlenmiş ve böylece H₂O₂'nin ayrıştığı dolayısıyla Katalaz enziminin varlığı gösterilmiştir. O₂'nin kabarcıklar halinde çıkışı Katalaz pozitif (aeorobik), oluşmaması ise katalaz negatif (anaerobik) olarak değerlendirilmiştir (Klement *et al.* 1990).

Oksidaz testi: Bir öze dolusu patojen bakteri izolatu steril filtre kurutma kağıdına çizilmiş ve üzerine %1'lik N;N;N;N-Tetrametil-1-4-fenilin-diamonyum-diklorür çözeltisinden damlatılmıştır. Reaksiyon sonucu 10 s içinde koyu mor renk oluşumu pozitif, 10-60 s koyu mor renk oluşumu zayıf pozitif ve 60 s sonunda mor renk oluşmaması negatif olarak değerlendirilmiştir (Kovacks 1956).

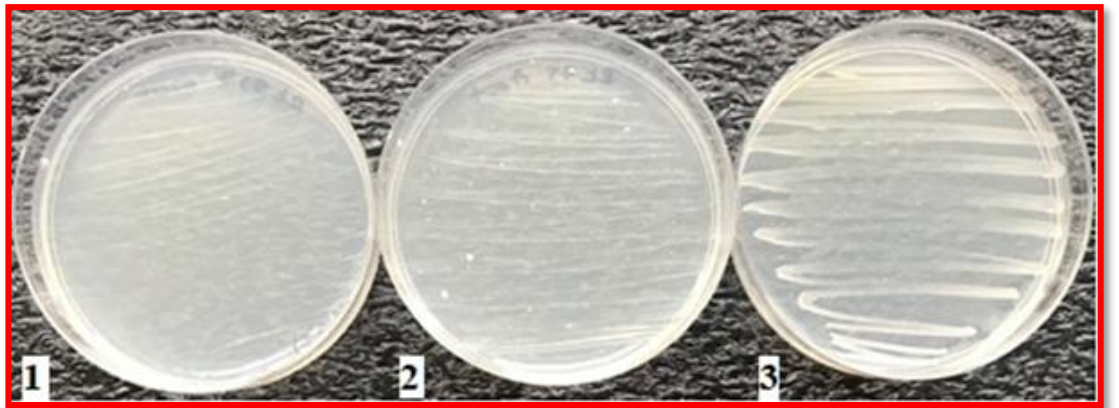
Nişastanın hidrolizi: %1'lik Nişasta besiyerine bakteriler çizgi ekimle ekilmiş ve 2 günlük bir inkübasyon süresi sonunda besiyerlerine lügol solüsyonu damlatılmıştır. Nişasta hidroliz testi sonucu Şekil 3.5'deki skalaya göre nişastayı hidroliz edebilen

izolat pozitif, nişastayı hidroliz edemeyen negatif olarak değerlendirilmiştir (Klement *et al.* 1990; Saygılı 2005).



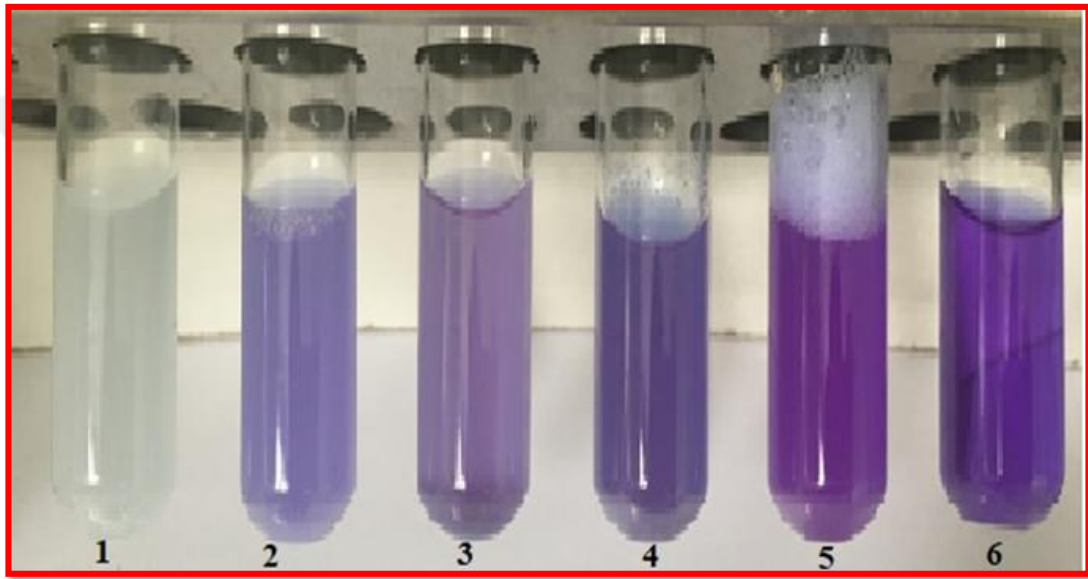
Şekil 3.5. Nişasta hidroliz testi (1) pozitif reaksiyon, (2) negatif reaksiyon

İzolatların azot fiksasyonunun tespiti: Potansiyel biyoajan bakteriler Burk's Azot besiyerine ekilmiş ve 3 gün boyunca 27°C'ye ayarlı inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. Besiyerinde görülen bakteri gelişimi Şekil 3.6'da sunulan skala ile 1: gelişmeyen (-), 2: zayıf gelişen (Z+), ve 3: kuvvetli gelişen (K+) olarak değerlendirilmiştir (Mary *et al.* 1985).



Şekil 3.6. Azot fiksasyon testi; 1: Gelişmeyen, 2: Zayıf gelişen ve 3: Kuvvetli gelişen

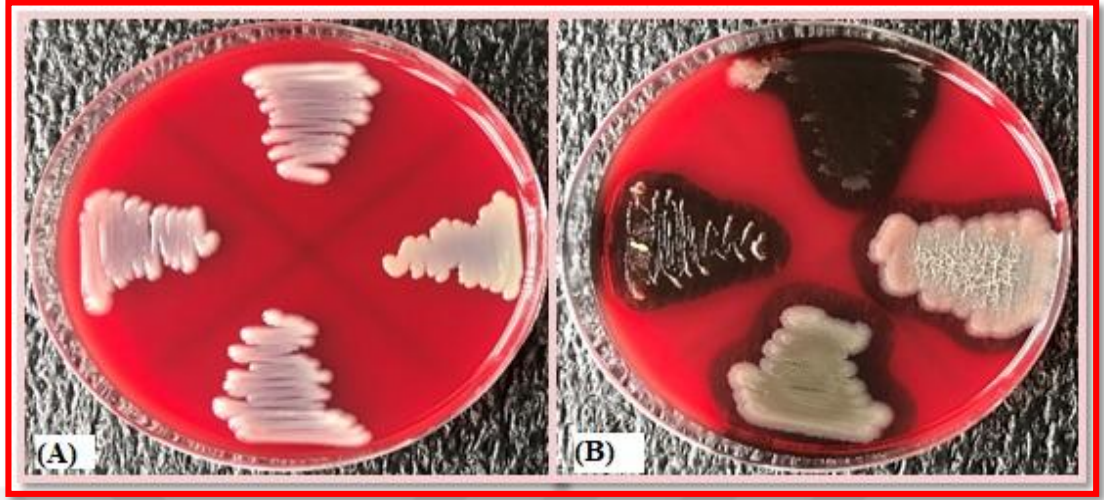
Fosfat çözücü bakterilerin tespiti: Potansiyel biyoajan bakteriler National Botanic Research Institute's Phosphate (NBRIP-BPB) besiyeri içeren tüplere aktarılarak 27°C'de inkübe edilmiştir. Besiyerinde görülen renk açılması fosfat çözümü pozitif olarak değerlendirilmiştir (Nautiyal 1999). Besiyerinde görülen renk açılması aşağıda verilen skalaya göre değerlendirilmiştir. Skala değerleri 1 (++++), 2 (++++), 3 (+++), 4 (++) , 5 (+) ve 6 (-) olarak derecelendirilmiştir (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. Fosfat çözücü bakterilerin tespit skalası; 1:(++++), 2:(++++), 3:(+++), 4:(++), 5:(+) ve 6:(-)

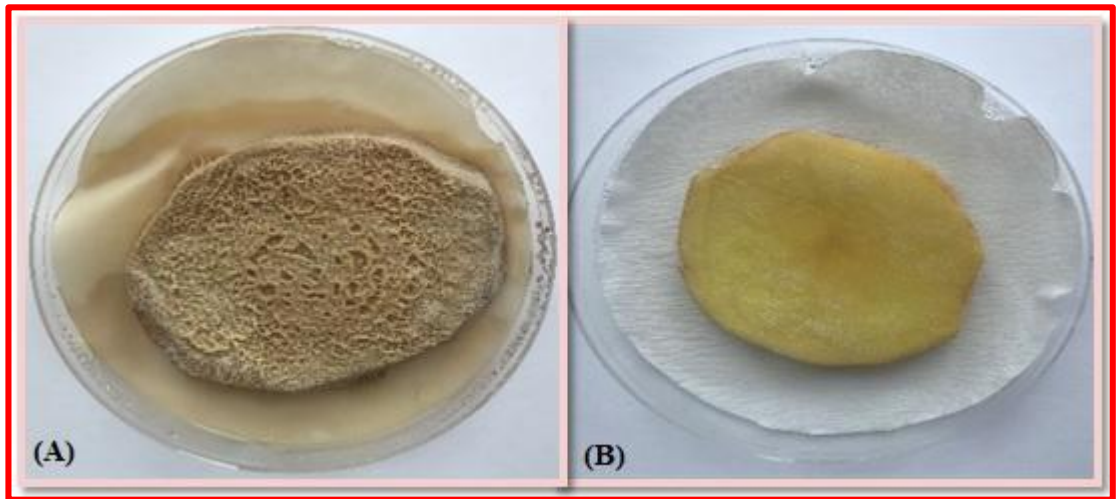
Levan testi: NSA besiyerine çizgi ekim yöntemiyle ekilen potansiyel biyoajan bakteriler izolatları 27°C'de 5 gün inkübe edilmiştir. Levan testinde sükras enziminin sükrozu parçalaması sonucu oluşan konveks, mukoid koloniler levan pozitif olarak, konveks ve mukoid yapıda olmayan koloniler ise levan negatif olarak değerlendirilmiştir (Lelliot and Stead 1987).

Hemolitik aktivite testi: Hazır olarak satın alınmış olan %5 koyun kanlı agar petrisi (90 mm) 4'e bölünmüş ve *in vitro* şartlarda etkili olmuş potansiyel biyoajan bakteri izolatları ekilmiştir. 48 sa 28°C'de inkübasyona tabi tutulmuş petrilere zon oluşumu hemolitik aktivite pozitif, zon oluşmaması negatif olarak değerlendirilmiştir (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. Hemolitik aktivite testi (A) negatif reaksiyon, (B) pozitif reaksiyon

Pektolitik aktivite testi: Patates yumruları çeşme suyu altında topraktan arındırma işlemine tabi tutulmuştur. Yüzeysel sterilizasyon için %10'luk NaOCl'da 10 dk bekletilmiş ve 3 set steril dH₂O'dan geçirilmiştir. Steril bir bisturi ile 0,5-0,9 cm kalınlıkta olacak şekilde dilimlenen patatesler steril nemli filtre kağıdı içeren petri kaplarına (90 mm) yerleştirilmiştir. Swap yardımıyla 24-48 sa NA'da geliştirilmiş olan biyoajan izolatlardan alınıp patates dilimleri yüzeyine inokule edilmiş ve 25°C'de 48 sa inkübasyon sonunda değerlendirme yapılmıştır (Şekil 3.9). İnokule edilen bölgedeki yumuşama pozitif olarak değerlendirilmiştir (Lelliott and Stead 1987).



Şekil 3.9. Pektolitik aktivite (A) pozitif reaksiyon, (B) negatif reaksiyon

3.2.6. *In vitro* şartlarda etkili olan biyoajan bakterilerin havuç dilimlerinde ve kabak meyvesinde test edilmesi

Havuç ve kabak meyveleri 3.2.1. bölümünde anlatıldığı şekilde steril edilmişlerdir. 1B patojen izolatu ve biyoajan bakteriler NB besi ortamında 28°C’de geliştirilmiş ve Eastwell *et al.* 2006’ya göre bakteri inokulumları hazırlanmıştır. Daha sonra bakteri konsantrasyonları spektrofotometrede 600 nm dalga boyunda 10^8 kob/mL olacak şekilde ayarlanmış ve 1B patojen izolatu ile biyoajan bakteri kültürleri eşit hacimlerde (1:1) karıştırılmıştır. Steril nemli filtre kağıdı serilmiş petri kaplarına (90 mm) havuç dilimleri, kabak meyveleri ise şeffaf dikdörtgen kutulara (7 L) yerleştirilmiştir. Havuç dilimlerinin yüzeyine, kabak meyvelerinde ise açılan çukurlara 100 µL patojen-biyoajan karışımından inokule edilmiştir. Pozitif kontrol olarak 1B ile steril su eşit hacimde karıştırılmış ve aynı oranda havuç dilimlerine ve kabak meyvesine 100 µL inokule edilmiştir. Negatif kontrol olarak etkili olan biyoajan bakteriler kullanılmıştır. Çalışma her bir biyoajan için 3 tekerrürlü olarak yapılmıştır. Havuç dilimleri ve kabak meyveleri inokulasyondan 30 gün sonra değerlendirme yapılmıştır. Havuç dilimlerinde değerlendirme Limanska *et al.* 2015’e göre ++++ kambiyal halka tamamen ur ile kaplı; +++ kambiyal halkanın %75’ini kaplamışsa; ++ kambiyal halkanın %50’sini kaplamışsa; + kambiyal halkanın %25’inden daha az kaplamış ise;- değerlendirme yapılmış, kabak meyvelerinde ise sayı ve boyutları ölçülerek değerlendirme yapılmıştır (Tolba and Soliman 2013).

3.2.7. Sera denemesinde kullanılacak biyoajan bakterilerin metabolit testi

In vitro şartlarda, havuç dilimleri ve kabak meyvesinde en etkili olan biyoajan bakterilerden en etkili olan biyoajan bakterilerin metabolit üretip üretmediklerini belirlemek amacıyla yapılmıştır.

Hidrojen siyanid (HCN) üretimi: Bakker and Schipper (1987) yöntemine göre kalitatif olarak test edilmiştir. Biyoajan bakteriler King B ortamına 4,4 g/l glisin ilave edilmiş besi ortamına çizgi ekim metoduyla ekilmiştir. Petri kabının kapağına pikrik asit

çözeltisi (2,5 g pikrik asit, 12,5 g Na₂CO₃, 1000 ml dH₂O) ile nemlendirilmiş steril filtre kağıdı yerleştirilmiş ve parafilm ile kapatılarak 28°C’de 48 sa süreyle inkübe edilmiştir. Filtre kağıdının renginin sarıdan açık kahverengine, kahverengine veya kırmızımsı kahverengiye dönüşmesi sırasıyla zayıf (+), orta (++) veya güçlü (+++) HCN ürettiği belirlenmiştir.

İndol asetik asit (IAA): Biyoajan bakteri izolatları tarafından IAA üretimi L-Triptofan’ın varlığında kolorimetrik olarak belirlenmiştir. Bunun için 20 ml NB besiyerine 5 ml L-Triptofan (0,2 µm filtreden geçirilmiş) eklenmiştir. NB+L-TRP sıvı besiyerine biyoajan bakteri izolatları 100 µl (10⁸ kob/ml) inokule edilerek 27°C yatay çalkalayıcıda inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda sıvı inokulumlar santrifüj tüplerine aktararak 6000 rpm’de 15 dk santrifüj edilmiş ve süpernatant alınarak Whatman (No:2) filtre kağıdından geçirilmiştir. Filtrasyondan sonra filtrat ependorf tüplere konularak 10,000 rpm’de 5 dk santrifüj edilmiş, süpernatanttan 3 ml alınıp steril tüp içerisine konulmuş ve üzerine 2 ml Salkowski ayırıcı (2 ml 0.5 M FeCl₃+98 ml %35 HClO₄) eklenerek renk oluşumu için 30 dk bekletilmiştir. Daha sonra biyoajan bakteri izolatları spektrofotometre yardımıyla 535 nm dalga boyunda absorbans değerleri kaydedilmiştir (Gorden and Paleg 1957; Asghar *et al.* 2002).

Salisilik asit (SA): SA, lokal patojen saldırısına karşı aşırı duyarlılık reaksiyonunda ve sistemik kazanılmış dayanıklılıkta önemli rol oynayan bir metabolittir (Alvarez 2000). Süksinat ortamında biyoajan bakteri izolatları, 48 sa 28°C’de bekletilmiştir. Biyoajan bakteri inokulumları 5 dk 8000 rpm’de santrifüj edilmiş ve 1 ml 0,1M fosfat tampon çözeltisinde tekrar karıştırılmıştır. 4 ml filtrat, 1N HCl ile pH: 2’ye ayarlanmış ve SA, CHCl₃ içinde ekstre edilmiştir. Sonra 4 ml su ve 5 µl 2M FeCl₂ eklenmiştir. Sulu fazda geliştirilmiş mor demir SA kompleksi, absorbansı, 527 nm’de okunmuş standart eğrisi süksinat ortamı içinde çözülmüş SA elde edilerek ve üretilen SA kalitesi hesaplanarak yapılmıştır (Meyer and Abdallah 1978).

Siderefor: CAS agar (Schwynn and Neilands 1987) ortamı kullanılarak yapılan testte; petri kapları (90 mm) 4 eşit parçaya bölünerek farklı biyoajan bakteri izolatları çizgi

ekimle 4 ayrı noktaya inokule edilmiş ve 24 sa 28°C'de inkübe edilmiştir. Renk değişimi maviden turuncuya siderofor üretiminin göstergesi olduğu için kolonilerin etrafında turuncu zon çapı ölçülmüştür.

3.2.8. Sera denemesinde kullanılacak biyoajan bakterilerin enzim aktivitelerinin ölçülmesi

Havuç dilimlerinde ve kabak meyvesinde etkili olan biyoajan bakteri izolatlarının kitinaz, fitaz ve amilaz enzim aktivitelerine bakılmıştır.

Kitinaz: Biyoajan bakteri izolatları NB besiyerinde geliştirilmiş ve 48 sa inkübasyon sonrasında santrifüj işlemi ile elde edilen pellet kısmı kullanılmıştır. Kitinaz enzimi aktivite tayini hesaplanırken 200 µL enzim çözeltisi üzerine 500 µL substrat (0,02 M sodyum sitrat çözeltisine %0,05'lik kitin ilave edilerek hazırlanmış) eklendikten sonra vorteks ile karıştırılmış daha sonra 30 dk 37°C'de bekletilmiştir. Su banyosundan alınan tüplere 750 µL renklendirme çözeltisi (0,01 M dinitrosalisilikasit) eklenmiş ve 10 dk 80°C'de su banyosunda bekletilmiştir. Daha sonra su banyosundan çıkarılan her bir tüpün üzerine 1300 µL saf su eklenmiş ve örnekler kör kullanılarak (200 µL saf su+500 µL substrat+750 µL renklendirme çözeltisi+1300 µL saf su) spektrofotometrede 540 nm dalga boyunda ölçüm yapılarak aktivite tayini tamamlanmıştır.

Fitaz: Biyoajan bakteri izolatları NB'de 24 sa geliştirilmiş ve fitaz enzim aktivitesi ölçülürken her aralıkta elde edilen çökeleklerden ve çöktürme sonrası elde edilen süpernatanttan tek tek aktivite tayini yapılmıştır. 100 µL enzim çözeltisi ile 250 µL substrat vorteks ile karıştırıldıktan sonra 10 dk 37°C'ye ayarlanmış su banyosunda reaksiyona sokulmuş ve reaksiyonu durdurmak için 500 µL %10'luk TCA eklenmiştir. Su banyosundan çıkarılan tüplere 500 µL renklendirme çözeltisi eklendikten sonra 15 dk inkübe edilmiş ve 4000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra örnekler kör kullanılarak spektrofotometrede 700 nm dalga boyunda ölçülmüştür.

Amilaz: %1 nişasta besiyerinde 2-3 gün 28°C'de inkübasyon sonunda ortama iodin ilavesi ile amilaz enziminin üretimi belirlenmiştir. Kontrol olarak bakteri izolatu içermeyen sıvı nişasta ortamı kullanılmıştır. Mor rengin değişimi bakteri izolatının amilaz enzimi ürettiği, mor rengin aynı kalması amilaz enzimini üretmediğini göstermiştir (Sung *et al.* 1993).

Selülaz: %1 CMC (Karboksimetilselülaz) besiyerine biyoajan bakteriler ekilmiş ve 48 sa sonra %0,1 Congo kırmızı boyasının ilavesiyle oluşan zon miktarı mm cinsinden ölçülmüştür (Duman *et al.* 2016).

Proteaz: Biyoajan bakteri emdirilmiş diskler Skim milk agar (SMA) içeren petri kaplarının orta kısmına konulmuş ve 27°C'de 48 sa inkübe edilmiştir. Bakteri kolonilerinin etrafında oluşan zon ölçülerek (mm) değerlendirilme yapılmıştır (Atlas 1995).

3.2.9. GF 677 anacında sera denemesi

NB besiyerinde 27°C'de 48 sa geliştirilmiş olan patojen izolat ile en etkili 5 biyoajan bakteri izolat spektrofotometrede absorbansı 600 nm dalga boyunda steril su ile 10^8 kob/ml olacak şekilde ayarlanmıştır. Daha sonra anaçların gövdelerine kök boğazının 10 cm üzerinden başlamak üzere steril neşter yardımıyla 3 yara açılmış, her bir yaraya 100 µl biyoajan bakteri izolatu verilmiş ve yaraların etrafı pamuk ve parafilm ile sarılmıştır. Birkaç saat sonra (1-2 sa) yaraların etrafından pamuk açılıp patojen izolat verilmiş ve tekrardan yaranın etrafı pamuk ve parafilm ile sarılmıştır. 10 gün boyunca yara yerleri su ile nemlendirilmiştir. Kontrol olarak; kontrol 1: hiç uygulama yapılmamış anaç, kontrol 2: sadece patojen izolat uygulanmış anaç, kontrol 3: Nogall uygulanmış anaç kullanılmıştır. Ayrıca deneme anacın kökleri yaralanarak eşit hacimde patojen+biyoajan bakteri solüsyonunun (50 ml patojen+50 ml biyoajan) saksı toprağına dökülmesi usulüyle de uygulanmıştır. Çalışma Tesadüf Parselleri Deneme Desenine göre 5 tekerrürlü ve her tekerrürde 1 fidan olmak üzere serada yürütülmüştür. Yaklaşık 6 ay sonra saksılardan anaçlar sökülerek gövdedeki yara yerlerindeki ve köklerindeki ur

sayılarına bakılmıştır (Sharma *et al.* 2017). Biyoajan bakteri izolatlarının *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*)’in neden olduğu kök kanseri hastalığını baskılama oranı ve analiz çalışmaları uygun istatistik programı kullanılarak yapılmış ve değerlendirilmiştir.



Şekil 3.10. Sera denemesinden genel bir görünüm

3.2.10. Bitki savunma metabolizma enzimlerinin değerlendirilmesi

Enzimlerin ekstraksiyonu için anaçların kök boğazından itibaren açılan yara yerlerinden ve taze köklerinden ~200 mg alınarak havan içine konulmuş ve sıvı azot ile toz haline gelinceye kadar ezilmiştir. Sonra öğütülmüş örnekler üzerine 2 ml soğuk homojenat tamponu (%1 PVP ve 1 mM EDTA ihtiva eden 0,1 M KH_2PO_4 pH: 7,0) ilave edilerek, karışım bir santrifüj tüpüne aktarılaraq 15000 rpm ve +4°C’de 15 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi sonucunda elde edilen süpernatant, antioksidan enzimlerin aktivite ölçümleri için stok kültür olarak kullanılmıştır (Wang *et al.* 2012).

Katalaz: Katalaz enzim aktivitesi ortamdaki Hidrojen peroksit (H_2O_2)’in Oksijen (O_2) ve su (H_2O)’ya dönüşümünü sağlarken meydana gelen absorbans azalmasının 240 nm’de izlenmesi esasına göre yapılmıştır. Reaksiyon karışımı 100 mM KH_2PO_4 (pH: 7) ve 10 mM H_2O_2 içermektedir. 20 µl enzim ekstraktı 96’lık mikropate’de kuyucukların içerisinde pipetlenmiştir. 180 µl reaksiyon karışımı üstüne pipetlenip, hemen cihaz da 3 saniye karıştırıp 240 nm’de 3 dk boyunca absorbans azalmasını 1 dk aralıklarla

kaydedilmiş ve sonuçlar g taze doku başına düşen enzim ünitesi (EU/g doku) olarak kaydedilmiştir (Aebi 1984).

Peroksidaz (POD): POD enzim aktivitesi, guaikol H_2O_2 'nin substrat olduğu reaksiyonun ürünü olan renkli bileşiğin 470 nm'de spektrofotometrede ölçülmesi esasına dayalı bir yöntemdir. Reaksiyon karışımı 0,1M $Na_2H_2PO_4$ (pH:5,5), 30 µl guaikol ve 21 µl H_2O_2 %35 içermektedir. 50 µl enzim ekstraktı 96 kuyucuklu mikropate'de 200 µl reaksiyon karışımı üstüne pipetlenip, hemen cihaz da 3 s karıştırıp 470 nm'de 5 dk boyunca absorbans artışı 1'er dk aralıklarla kaydedilmiş ve absorbansın doğrusal olarak arttığı kısımdaki absorbans artışı 1 dk oranlanmıştır. 25°C'de 1 dk, absorbansı 0,01 artıran enzim miktarı 1 enzim ünitesi olarak kabul edilmiş ve sonuçlar g taze doku başına düşen enzim ünitesi (EU/g doku) olarak belirlenmiştir (Rao *et al.* 1996).

Süperoksit dismutaz (SOD): SOD enzim aktivitesi, nitrobluetetrazolyum (NBT)'un fotokimyasal reaksiyonunun inhibisyonunun izlenmesi ile analiz edilmiştir. Reaksiyon karışımı 50 mM KH_2PO_4 (pH: 7,8), 75 µM NBT, 0,1 mM EDTA ve 13 mM metionin içermektedir. 20 µl enzim ekstraktı 96'lık mikropate'in kuyucuklarının içinde pipetlenmiştir. 170 µl reaksiyon karışımı (50 mM fosfat tamponu (pH: 7,8), 0,1 mM EDTA, 63 µM Nitratetrazoliumblue (NBT) ve 13 mM metionin) üzerinde yerleştirilmiş ve sonra 10 µl riboflavin üstüne pipetlenip karıştırıldıktan hemen sonra, 15 dk beyaz bir ışık (40 W floresan ışık) önüne yerleştirmek suretiyle reaksiyon başlatılmıştır. 15 dk içerisinde NBT'nin renk açılma yoğunluğu 560 nm'de köre karşı okunmuştur. Kör olarak aynı reaksiyon içeriğinin enzimsiz örneğinden oluşmaktadır. SOD enzim aktivitesinin 1 ünitesi, 560 nm'de gözlenen NBT indirgenmesinin %50 inhibisyonuna neden olan enzim miktarı, 1 enzim ünitesi olarak kabul edilmiş ve değerler EU/g doku olarak sunulmuştur (Winterbourn *et al.* 1975).

Askorbat peroksidaz (APX): Enzim aktivitesi 290 nm'de absorbansdaki düşüşe göre belirlenmiştir. Askorbatın okside olmasından dolayı askorbat konsantrasyonunda azalma görülmektedir. Reaksiyon karışımı 100 mM KH_2PO_4 (pH: 7), 2,5 mM H_2O_2 , 0,5

mM LAA (Ascorbic Acid) ve 0,1 mM EDTA'dan oluşmaktadır. 50 µl enzim ekstraktı üzerine 200 µl reaksiyon karışımından konularak 290 nm'de 3 dk boyunca absorbans azalması 1 dk aralıklarla kaydedilmiş ve askorbatın ekstinksiyon katsayısı kullanılarak sonuçlar g taze bitki dokusu başına düşen enzim ünitesi (EU/g doku) olarak tespit edilmiştir (Sahin *et al.* 2018).

Elde edilen bulgular elde edilen veriler SPSS 20 istatistik paket programı kullanılarak analiz edilmiştir. Veriler varyans analizine (ANOVA) tabi tutulmuş ve ortalamalara ait farklılıklar Duncan çoklu karşılaştırma testi ile belirlenmiştir ($P < 0.05$).

3.2.11. Sera denemesinde kullanılacak bakterilerin moleküler tanıları

Kök kanseri hastalığına karşı etkili bulunan mikroorganizmaların tanılarını moleküler tanı ile desteklemek amacıyla DNA izolasyonu, PZR ve sekanslama çalışmaları yapılmıştır.

DNA izolasyonu: 24-48 sa NB besiyerinde geliştirilen bakteri izolatları 2 ml'lik ependorf tüpleri içerisine konulmuş ve 12000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Bakteri kültürü bitinceye kadar bu işlem tekrarlanmış, ependorf tüpte biriken pellet kısmı kullanılmış ve üzerine liziz tamponu (50 mM EDTA, % 3 SDS, 100 mM Tris-HCl (pH:8) eklenmiştir. Örnekler 30 dk maksimum hızda homojenizatörde parçalanmıştır. 12000 rpm'de 10 dk santrifüjün ardından, üst kısım yeni tüpe alınmış ve 2 µl, 20 U'luk RNase A eklenmiştir. Sonra tüpler 15 dk 37°C'de inkübasyona tabi tutulmuş ve tüplerin üzerlerine 1 hacim fenol:kloroform:izoamil alkol (25:24:1) eklenmiştir. Vorteks yapılarak, 12000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiş ve üst kısım yeni tüpe alınmış ve eşit hacimde %100 etil alkol eklenerek -20°C'de 1 sa inkübe edilmiştir. 12000 rpm'de 10 dk santrifüj sonrası oluşan çökelti, % 70'lik etil alkol ile üç kez yıkanarak havada kurutulmuş ve 50 µl Tris EDTA (TE) tamponunda çözülmüştür. Daha sonra %1'lik agaroz jel elektroforez ile total genomik DNA varlığı kontrol edilmiş ve izole edilen DNA'lar -20°C'ye konulmuştur. Daha sonra patojen ve biyoajan bakteri izolatlarını

tanıyan Universal primer çifti (27F ve 1492R) kullanılmış ve PZR yapılmıştır. PZR'ye ait reaksiyon karışımı (Çizelge 3.5) ve reaksiyona ait döngü Çizelge 3.6'da verilmiştir.

Çizelge 3.5. Kullanılan PZR karışımı

PZR karışımı	Miktar
dH ₂ O	37,2 µl
10X PZR tamponu	5 µl
MgCl ₂	3 µl
dNTP mix	0,7 µl
Forward primer	0,8 µl
Reverse primer	0,8 µl
DNA	2 µl
Taq Polimeraz (250 U)	0,5 µl
Toplam	50 µl

Çizelge 3.6. PZR döngüsü

PZR Döngüsü			
1	95°C	2 dk	1 döngü
2	94°C	1 dk	35 döngü
3	53°C	1 dk	
4	72°C	1,30 dk	
5	72°C	10 dk	1 döngü
6	4°C		

Agaroz jel elektroforezi: PZR ürünleri, %1'lik agaroz (1 g agaroz 100 ml TAE, 4 µl etidyum bromür (10 mg/ml) jelde görüntülenmiştir. Donmuş jele PZR ürünleri yüklenmiş ve 90V'da 50 dk yürütme işlemi yapılmıştır.

PZR Ürünlerinin Saflaştırılması ve DNA Sekans Analizi: Ticari olarak satılan PZR pürifikasyon kiti (Invitrogen) ile saflaştırma işlemi yapılmıştır. Saflaştırılan örnek, Refgen Biyoteknoloji Firması'ndan (Ankara, Türkiye) sekans hizmeti alınarak diziletilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Potansiyel Patojen Bakteri İzolatlarının Virölanslık Testleri ve Aşırı Duyarlılık Reaksiyon Test Sonuçları

Farklı araştırmacılar tarafından farklı bitkilerden izole edilmiş patojen izolatların (RK 473, 1A, 1B, 2A ve 2B) havuç dilimleri ve kabak meyvesi, kalonşe yaprağı, domates, ve ayçiçeği fideleri ile GF 677, M9 ve MM106 anaçlarında yapılan virölanslık test sonuçları Çizelge 4.1’de verilmiştir.

Tüm izolatlar havuç dilimi ve kabak meyvesinde patojen olmuştur. 1A, 1B, 2A ve 2B izolatları GF 677 şeftali anacının gövdesinde ur oluştururken, M9 ve MM106 elma anaçlarının gövdesinde ur oluşturmamıştır. GF 677 şeftali anacının kök uygulamasında 1B izolatında ur oluşumu gözlemlenirken diğer izolatlarda ur oluşumu gözlemlenememiştir. RK 473 izolatı M9 ve MM106 elma anaçlarında patojen olurken, diğer izolatların ur oluşturmadığı tespit edilmiştir. Tüm izolatların domates kök ve gövde, ayçiçeği gövde ve kalonşe yaprak uygulamalarında patojen olmadıkları görülmüştür.

Virölanslık test sonuçlarına göre 1B izolatı en virülant izolat olarak belirlenmiştir. En virülant izolat olan 1B’nin havuç dilimi, kabak meyvesi ve GF 677 şeftali anacında oluşturduğu urların resimleri Şekil 4.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Potansiyel patojen izolatlarının virülanslık test sonuçları

Patojen Bakteri İzolatlarının Virulanslık Test Sonuçları														
Test Bitkileri	RK473		1A		1B		2A		2B		Kontrol		CV	LSD
Havuç dilimi	3,67	C	4,67	AB	4,89	A	4,00	C	4,22	BC	0,00	D	0,18	0,60
Kabak meyve	0,33	D	2,25	C	6,75	A	3,75	B	1,00	D	0,00	D	0,59	1,13
GF 677 anaç gövde uygulama	0,00	D	1,86	B	2,73	A	1,33	AB	1,00	C	0,00	D	0,70	1,72
M9 anaç gövde uygulama	2,47	A	1,00	B	1,00	B	1,00	B	1,00	B	1,00	B	0,34	0,31
MM106 anaç gövde uygulama	2,39	A	1,00	B	1,00	B	1,00	B	1,00	B	1,00	B	0,41	0,36
GF 677 anaç kök uygulama	-		-		+		-		-		-			
M9 anaç kök uygulama	-		-		-		-		-		-			
MM106 anacı kök uygulama	-		-		-		-		-		-			
Ayçiçeği fide gövde uygulama	-		-		-		-		-		-			
Domates fide kök uygulama	-		-		-		-		-		-			
Domates fide gövde uygulama	-		-		-		-		-		-			
Kalonşe yaprak uygulama	-		-		-		-		-		-			
Aşırı duyarlılık reaksiyon testi	+		+		+		+		+		+			

*Aynı satırda benzer harflerle ifade edilen değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur ($p<0.01$), +: pozitif, -: negatif



Şekil 4.1. 1B patojen izolatının havuç dilimleri, kabak meyvesi ve GF 677 anacında oluşturduğu urlar

R. radiobacter (*A. tumefaciens*) potansiyel patojen izolatlarına (1A, 1B, 2A, 2B, RK 473) ait tütünde aşırı duyarlılık test sonuçlarına ait görsel Şekil 4.2’de verilmiştir. Bütün izolatlarda hafif sararma, tipik kloroz, 48 sa sonra verilen alanlarda görülmüştür. *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*) patojen izolatlarının çoğunlukla aşırı duyarlılık reaksiyonuna neden olmadıkları sadece filtrasyon yapılan bölgelerde hafif bir kloroza neden olduğu bilinmektedir (Kado and Crosa 1994).

1A	1B	2A	2B	RK 473
				

Şekil 4.2. Potansiyel patojen bakteri izolatlarının tütün bitkisinde oluşturduğu aşırı duyarlılık reaksiyon test sonucu

4.2. Potansiyel Patojen Bakteri İzolatlarının Klasik Yöntemlerle Tanı Sonuçları

1A, 1B, 2A, 2B ve RK 473 potansiyel patojen izolatlarına ait biyokimyasal ve fizyolojik test sonuçları Çizelge 4.2’de; görseller ise Şekil 4.3’de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Potansiyel patojen bakteri izolatlarının biyokimyasal ve fizyolojik test sonuçları

Testler	Referans	1A	1B	2A	2B	RK 473
35°C gelişme	+	+	+	+	+	+
23°C gelişme	+	+	+	+	+	+
Laktozdan 3-ketolaktoz üretimi	+	-	-	-	-	+
%2 NaCl besiyerinde gelişme	+	+	+	+	+	+
KOH testi	+	+	+	+	+	+
PDA+CaCO ₃ asit temizleme	-	-	-	-	-	-
Demir amonyum sitrat kullanımı	+	-	-	-	-	+
Malonik asitten alkali oluşturma	-	+	+	+	+	-
Mucic asitten alkali oluşturma	-	+	+	+	+	-
Tartarik asitten alkali oluşturma	-	-	+	+	-	-
Melezitozdan asit üretimi	+	-	-	-	-	+
Eritritolden asit üretimi	-	-	-	-	-	-
Sükrozdan asit üretimi	+	+	+	+	-	+
Sitrat kullanımı	V	+	+	+	+	-
Litmus milk’te reaksiyon	Alk	Alk	Alk	Alk	Alk	Alk
Oksidaz testi	+	+	+	+	+	+

+: %80 ve üzeri pozitif, -: %80 ve üzeri negatif, V: %21-79 arasında pozitif, **Alk**: Alk: alkali.

Biyokimyasal ve fizyolojik test sonuçlarına göre *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*) izolatları arasında farklılıklar bulunmuştur. Laktozdan 3-ketolaktoz üretimi, demir amonyum sitrat kullanımı, malonik asitten alkali oluşturma, mucic asitten alkali oluşturma, tartarik asitten alkali oluşturma, sitrat kullanımı, melezitozdan ve sükrozdan asit üretimi biyokimyasal testlerinde farklı reaksiyon gösterdikleri belirlenmiştir.

Farklı sıcaklık değerlerinde (23 ve 35°C) *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*) izolatlarının gelişimi incelenmiş ve bütün izolatların bu sıcaklık değerlerinde gelişim gösterdiği belirlenmiştir. Referans test sonuçları ile benzer sonuçlar elde edilmiştir.

Laktoz yeast agar besiyerinde 2 gün geliştirilen patojen izolatlar üzerine Benedict ayıracı döküldükten sonra bir saat içinde 3-ketolaktoz pozitif reaksiyon sonucu koloniler etrafında sarı-portakal renginde bir zon oluşmuş ve RK 473 izolatı sadece pozitif reaksiyon göstermiştir. Referans sonuçlar ile karşılaştırıldığında sadece RK 473 izolatı benzer sonuç verirken diğer izolatlar farklı sonuç göstermişlerdir.

R. radiobacter (*A. tumefaciens*) türlerinin genel olarak %2 NaCl içeren besiyerinde gelişme gösterdiği bilinmektedir ve çalışmada kullanılan bütün izolatların gelişme gösterdiği tespit edilmiştir.

KOH testine göre, lam üzerine bir öze dolusu bakteri kültüründen sürülmüş ve üzerine taze hazırlanmış %3'lük KOH solüsyonundan damlatılmıştır. Solüsyona iyice karıştırılmış olan bakteri öze ile yukarı doğru kaldırıldığında ipliksi bir uzama göstermiş ve KOH pozitif olarak belirlenmiştir. Bu test sonucuna göre bütün izolatlar pozitif reaksiyon göstermiş ve referans test sonuçları ile aynı sonuçlar elde edilmiştir.

PDA+CaCO₃ besiyerine ekilen patojen bakteri izolatlarının 2 gün inkübasyon süresi sonunda besiyerinde gelişen kolonilerin etrafında saydamlaşma olmadığı gözlenmiş ve test sonucu negatif olarak değerlendirilmiştir. Referans test sonuçları ile bakteri izolatlarının vermiş olduğu test sonuçları birbiriyle benzerlik gösterdiği görülmüştür.

Demir amonyum sitrat test sonucuna göre tüp üzerinde kiremit rengi bir tabaka oluşumu pozitif olarak kabul edilmiş ve RK 473 izolatı hariç diğer izolatlarda bu tabaka oluşumu gözlenmemiştir. Referans test sonuçları ile elde edilen sonuçlar kıyaslandığında RK 473 izolatının benzer sonuç verdiğini diğer izolatların ise referans sonuçlardan farklı sonuç verdiği belirlenmiştir.

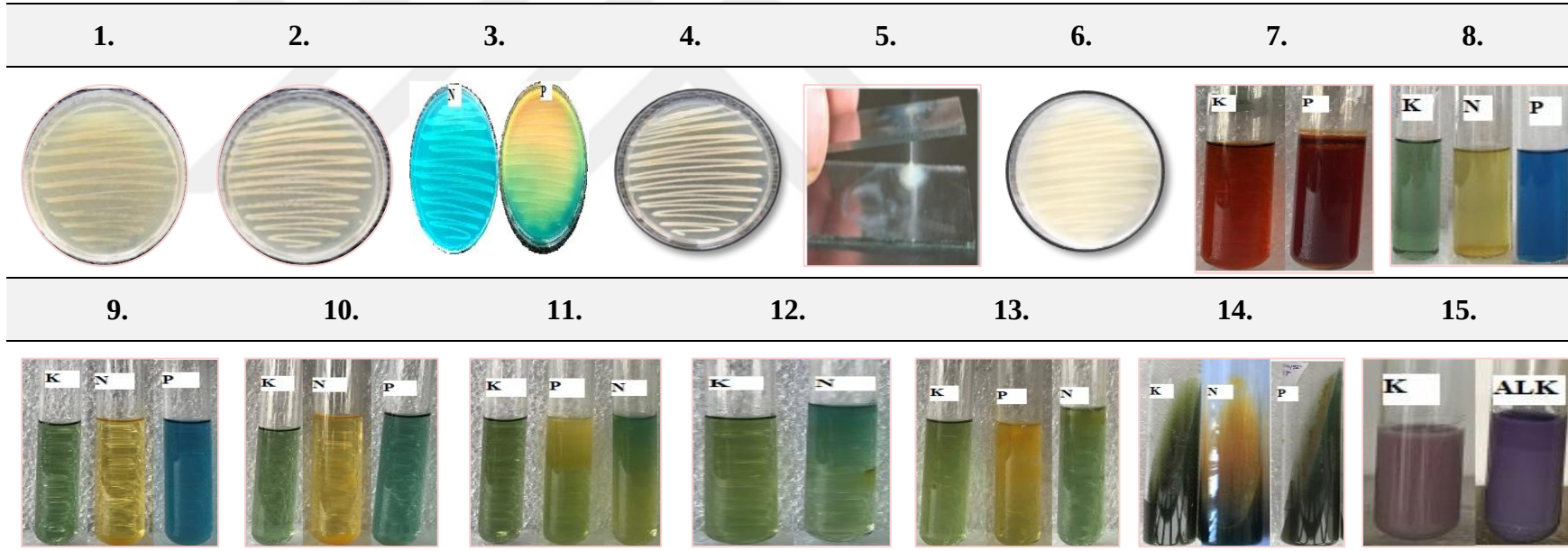
Malonik, mucic ve tartarik asitten alkali oluşturma test sonucuna göre besiyeri mavi rengine dönen izolatlar pozitif olarak değerlendirilmiştir. Buna göre malonik ve mucic asit testlerinde RK 473 izolatu hariç hepsi pozitif sonuç vermiştir. Referans test sonuçlarına göre *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*) izolatlarının negatif sonuç verdiği bilinmektedir. Buna göre referans sonuçlar ile RK 473 izolatının benzer sonuçlar verdiği grlmştir. Tartarik asitten alkali oluşturma testinde ise 1B ve 2A izolatları pozitif test sonucu verirken 1A, 2B ve RK 473 negatif (sarı renk oluşumu) sonuç vermiş ve referans test sonuçları ile benzerlik gösterdiği gözlemlenmiştir.

Melezitoz şekerinden asit üretimi test sonucuna göre; RK 473 izolatu hariç diğer izolatlar asit üretimi yapmamıştır ve %80'nin üzerinde pozitif reaksiyon gösteren referans sonucundan farklı bir sonuç elde edilmiştir. Eritritolden asit üretimi testi sonucuna göre hiçbir izolat asit üretimi yapmamıştır ve bu test sonucu ile referans sonuçların benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Sükrozdan asit üretimi testi sonucuna göre 2B izolatu hariç bütün izolatlar asit üretimi yapmıştır. Referans sonuçlar ile izolatların göstermiş olduğu sonuçlar karşılaştırıldığında 2B izolatu dışında diğer izolatların aynı sonucu verdiği tespit edilmiştir.

Sitrat kullanım test sonucuna göre izolatlar farklı reaksiyonlar göstermiş. 1A, 1B, 2A ve 2B izolatları pozitif reaksiyon gösterirken RK 473 izolatu negatif reaksiyon göstermiştir. Referans test sonucuna göre *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*) izolatlarının farklı sonuçlar verebileceği bilinmektedir.

R. radiobacter (*A. tumefaciens*) türlerinin genel olarak Litmus Milk besiyerinde alkali oluşturduğu bilinmektedir. Çalışmada kullanılan bütün izolatların besi ortamını alkali reaksiyon gösterdiği ve referans sonuçlarla benzerlik gösterdiği grlmştir.

Oksidaz testi sonucuna göre 10 saniye içerisinde mavi renk oluşumu pozitif olarak değerlendirilmiş ve bütün izolatların pozitif reaksiyon verdiği gözlenmiştir.



Şekil 4.3. Potansiyel patojen izolatların farklı biyokimyasal ve fizyolojik testlere verdiği reaksiyonlar

(1) 35°C gelişme gösteren izolat; (2) 23°C gelişme gösteren izolat; (3) Laktozdan 3-ketolaktöz üretimi (P) pozitif reaksiyon, (N) negatif reaksiyon; (4) %2 NaCl besiyerinde gelişme gösteren izolat; (5) KOH testinde pozitif sonuca sahip izolat; (6) PDA+CaCO₃ asit temizleme özelliği göstermeyen izolat; (7) Demir amonyum sitrat kontrol besiyeri (K), pozitif reaksiyon (P); (8) Malonik asitten alkali oluşturma (K) kontrol besiyeri, (N) negatif reaksiyon, (P) pozitif reaksiyon; (9) Mucic asitten alkali oluşturma (K) kontrol besiyeri, (N) negatif reaksiyon, (P) pozitif reaksiyon; (10) Tartarik asitten alkali oluşturma (K) kontrol besiyeri, (N) negatif reaksiyon, (P) pozitif reaksiyon; (11) Melezitozdan asit üretimi (K) kontrol besiyeri, (P) pozitif reaksiyon, (N) negatif reaksiyon; (12) Eritritolden asit üretimi (K) kontrol besiyeri, (N) negatif reaksiyon, (P) pozitif reaksiyon; (13) Sükrozdan asit üretimi (K) kontrol besiyeri, (P) pozitif reaksiyon, (N) negatif reaksiyon; (14) Sitrat kullanımı (K) kontrol besiyeri, (N) negatif reaksiyon (P) pozitif reaksiyon; (15) Litmus milk'te reaksiyon (K) kontrol besiyeri, (ALK) alkali reaksiyon veren izolat

4.3. Potansiyel Biyoajan Bakterilerin Katı Besiyerinde Patojene Karşı Test Edilmesinin Sonuçları

In vitro şartlarda katı besiyerinde en virülant izolat 1B'ye karşı test edilmiş potansiyel biyoajan bakterilerin toplam izolat sayıları, etkili olan izolatların sayıları, antibiyozis etki gösteren izolat sayısı ve cins düzeyinde en küçük-en büyük ortalama inhibisyon zonu ile hiperparazitik etki gösteren izolat sayısı ve cins düzeyinde en küçük-en büyük ortalama yayılma alanına ait değerler Çizelge 4.3'de verilmiştir.



Çizelge 4.3. Çalışmada kullanılan potansiyel biyoajan bakteri cinslerine ait NA besiyerinde patojene karşı etkililik test sonuçları

	BAKTERİ CİNSİ	TİS ¹	EİS ²	AEİS ³	AE ⁴	HEİS ⁵	HE ⁶		BAKTERİ CİNSİ	TİS ¹	EİS ²	AEİS ³	AE ⁴	HEİS ⁵	HE ⁶
1	<i>Bacillus</i> spp.	388	45	23	4,5-24	22	19-78,5	51	<i>Thermus</i> spp.	3	0	0	0	0	0
2	<i>Pseudomonas</i> spp.	184	6	2	0-11,5	4	23,5-48	52	<i>Deinococcus</i> spp.	2	0	0	0	0	0
3	<i>Erwinia</i> spp.	77	0	0	0	0	0	53	<i>Dermabacter</i> spp.	2	0	0	0	0	0
4	<i>Enterobacter</i> spp.	70	0	0	0	0	0	54	<i>Edwardsiella</i> spp.	2	0	0	0	0	0
5	<i>Brevibacillus</i> spp.	69	5	4	7-16	1	0-28	55	<i>Ewingella</i> spp.	2	0	0	0	0	0
6	<i>Paenibacillus</i> spp.	81	5	5	3,5-13,5		0-23	56	<i>Hydrogenophaga</i> spp.	2	0	0	0	0	0
7	<i>Pantoea</i> spp.	48	1	1	0-13	0	0	57	<i>Gluconacetobacter</i> spp.	2	0	0	0	0	0
8	<i>Kocuria</i> spp.	44	0	0	0	0	0	58	<i>Kingella</i> spp.	2	0	0	0	0	0
9	<i>Acinetobacter</i> spp.	37	0	0	0	0	0	59	<i>Kluyvera</i> spp.	2	0	0	0	0	0
10	<i>Arthrobacter</i> spp.	37	1	1	0-4	0	0	60	<i>Kytococcus</i> spp.	2	0	0	0	0	0
11	<i>Salmonella</i> spp.	56	5	5	8,5-14	0	0	61	<i>Lysobacter</i> spp.	2	0	0	0	0	0
12	<i>Micrococcus</i> spp.	30	0	0	0	0	0	62	<i>Nocardia</i> spp.	2	0	0	0	0	0
13	<i>Xanthomonas</i> spp.	29	0	0	0	0	0	63	<i>Novosphingobium</i> spp.	2	0	0	0	0	0
14	<i>Chryseobacterium</i> spp.	28	1	1	0-12	0	0	64	<i>Plesiomonas</i> spp.	2	1	0	0	1	0-56
15	<i>Alcaligenes</i> spp.	26	1	1	0-10	0	0	65	<i>Providencia</i> spp.	2	0	0	0	0	0
16	<i>Burkholderia</i> spp.	22	0	0	0	0	0	66	<i>Psychrobacter</i> spp.	2	0	0	0	0	0
17	<i>Aeromonas</i> spp.	19	2	2	5-7	0	0	67	<i>Ralstonia</i> spp.	2	0	0	0	0	0
18	<i>Serratia</i> spp.	19	3	2	6-14,5	1	0-43	68	<i>Shewanella</i> spp.	2	0	0	0	0	0
19	<i>Yersinia</i> spp.	19	1	1	0-12,5	0	0	69	<i>Tetragenococcus</i> spp.	2	0	0	0	0	0
20	<i>Staphylococcus</i> spp.	18	0	0	0	0	0	70	<i>Weeksella</i> spp.	2	0	0	0	0	0
21	<i>Leclercia</i> spp.	13	0	0	0	0	0	71	<i>Virgibacillus</i> spp.	2	0	0	0	0	0
22	<i>Agrobacterium</i> spp.	12	2	2	21-37,5	0	0	72	<i>Varivorax</i> spp.	2	1	0	0	1	0-32,5
23	<i>Brevibacterium</i> spp.	12	1	0	0	1	0-12,5	73	<i>Streptoverticillium</i> spp.	2	0	0	0	0	0
24	<i>Curtobacterium</i> spp.	11	1	1	0-7,5	0	0	74	<i>Aerococcus</i> spp.	1	0	0	0	0	0
25	<i>Vibrio</i> spp.	11	3	2	0-12	1	0-30	75	<i>Cellulosimicrobium</i> spp.	1	0	0	0	0	0
26	<i>Klebsiella</i> spp.	9	0	0	0	0	0	76	<i>Chyseomonas</i> spp.	1	0	0	0	0	0
27	<i>Sphingobacterium</i> spp.	9	0	0	0	0	0	77	<i>Colwellia</i> spp.	1	0	0	0	0	0
28	<i>Brevundimonas</i> spp.	8	0	0	0	0	0	78	<i>Comamonas</i> spp.	1	0	0	0	0	0
29	<i>Clavibacter</i> spp.	8	0	0	0	0	0	79	<i>Corynebacterium</i> spp.	1	0	0	0	0	0
30	<i>Pseudoalteromonas</i> spp.	8	1	1	0-9	0	0	80	<i>Delftia</i> spp.	1	0	0	0	0	0
31	<i>Myroides</i> spp.	7	0	0	0	0	0	81	<i>Desemzia</i> spp.	1	0	0	0	0	0
32	<i>Achromobacter</i> spp.	6	2	2	10-15	0	0	82	<i>Dermabacter</i> spp.	1	0	0	0	0	0
33	<i>Kurthia</i> spp.	6	1	0	0	1	0-25	83	<i>Dunganelia</i> spp.	1	1	0	0	1	0-29
34	<i>Microbacterium</i> spp.	6	0	0	0	0	0	84	<i>Empedobacter</i> spp.	1	0	0	0	0	0
35	<i>Rhodococcus</i> spp.	6	0	0	0	0	0	85	<i>Flavimonas</i> spp.	1	0	0	0	0	0
36	<i>Methylobacterium</i> spp.	5	0	0	0	0	0	86	<i>Gordona</i> spp.	1	0	0	0	0	0

Çizelge 4.3. (devam)

	BAKTERİ CİNSİ	TİS ¹	EİS ²	AEİS ³	AE ⁴	HEİS ⁵	HE ⁶		BAKTERİ CİNSİ	TİS ¹	EİS ²	AEİS ³	AE ⁴	HEİS ⁵	HE ⁶
37	<i>Chromobacterium</i> spp.	5	0	0	0	0	0	87	<i>Kytococcus</i> spp.	1	0	0	0	0	0
38	<i>Geobacillus</i> spp.	5	0	0	0	0	0	88	<i>Ochrobactrum</i> spp.	1	0	0	0	0	0
39	<i>Photobacterium</i> spp.	5	0	0	0	0	0	89	<i>Pandorea</i> spp.	1	0	0	0	0	0
40	<i>Photorhabdus</i> spp.	5	2	0	0	2	65-70	90	<i>Pediococcus</i> spp.	1	0	0	0	0	0
41	<i>Acidovorax</i> spp.	4	0	0	0	0	0	91	<i>Proteus vulgaris</i>	1	0	0	0	0	0
42	<i>Bergeyella</i> spp.	4	0	0	0	0	0	92	<i>Pseudoxanthomonas</i> spp.	1	0	0	0	0	0
43	<i>Citrobacter</i> spp.	4	0	0	0	0	0	93	<i>Rahnella</i> spp.	1	0	0	0	0	0
44	<i>Escherichia coli</i>	4	0	0	0	0	0	94	<i>Raoutella</i> spp.	1	0	0	0	0	0
45	<i>Hafnia</i> spp.	4	1	1	0-11,5	0	0	95	<i>Rothia</i> spp.	1	0	0	0	0	0
46	<i>Proteus</i> spp.	4	0	0	0	0	0	96	<i>Shigella</i> spp.	1	0	0	0	0	0
47	<i>Sphingomonas</i> spp.	4	1	0	0	1	0-65	97	<i>Variovorax</i> spp.	1	0	0	0	0	0
48	<i>Stenotrophomonas</i> spp	4	4	3	7-12	1	0-53,5	98	<i>Zobellia</i> spp.	1	1	1	0-4	0	0
49	<i>Actinomadura</i> spp.	3	0	0	0	0	0	99	Tanımlanamadı	451	17	6	6,5-30	11	14-70
50	<i>Cellulomonas</i> spp.	3	0	0	0	0	0								
TOPLAM 2012															

* 1: TİS: Toplam izolat sayısı, 2: EİS: Etkili izolat sayısı, 3: AEİS: Antagonistik etki gösteren izolat sayısı, AE: Antagonistik etki gösteren izolatların en düşük ve en yüksek inhibisyon zon ölçüm değerleri, HEİS: Hiperparazitik etki gösteren izolat sayısı, HE: Hiperparazitik etki gösteren izolatların en düşük ve en yüksek yayılma alanı ölçüm değerleri (mm)

Doksan dokuz adet bakteri cinsine ait 2012 adet potansiyel biyoajan bakteri izolatu katı besiyerinde test edilmiş ve 27 adet bakteri cinsine ait 106 adet biyoajan bakteri izolatu az veya çok etkili olmuştur. Bu 106 adet biyoajan bakteri izolatından 66 adedi antibiyozis etki gösterirken, 40 adedi hiperparazitik etki göstermiştir. Toplam etkili olan izolatların %42,45 *Bacillus* (45 izolat) cinsine ait olduğu, ikinci ve üçüncü olarak sırasıyla %5,66 *Pseudomonas* (6 izolat) ve %4,72 *Brevibacillus* (5 izolat) cinslerinin olduğu tespit edilmiştir. Potansiyel biyoajan bakteri cinsleri arasında en etkili olan *Bacillus* cinsine ait izolatların 4,5-24 mm aralıklarında antibiyozis etki, 19-78,5 mm aralıklarında hiperparazitik etki göstermiştir. Diğer cinslere ait izolatların 0-16 mm arasında değişen farklı değerlerde antibiyozis etkiye sahip oldukları tespit edilmiştir. En yüksek hiperparazitik etkiye sahip izolatlarında yine *Bacillus* cinsine ait olduğu (19-78,5 mm), onu *Photorhabdus* (65-70 mm) ve *Sphingomonas* (0-65 mm) cinslerinin takip ettiği belirlenmiştir.

Çalışmada etkili olan 106 adet biyoajan bakteri izolatının ortalama inhibisyon zonu (antibiyozis etki) ve ortalama yayılma alanına (hiperparazitik etki) ait sonuçlar Çizelge 4.4'de verilmiştir.

Çizelge 4.4. *In vitro* şartlarda patojene karşı antibiyozis ve hiperparazitik etki gösteren biyoajan bakteri izolatlarının NA besiyerinde ortalama inhibisyon zon çapları (mm), ortalama yayılma alanları (mm) ile biyokimyasal ve fizyolojik test sonuçları

Sıra no	İzolat	MIS Tanı	Antibiyozis Etki		Biyokimyasal ve Fizyolojik Testler								
			OİZ ¹ (mm)		KOH ²	K ³	NH ⁴	N ⁵	P ⁶	L ⁷	O ⁸	PA ⁹	HA ¹⁰
1	RK 1250	<i>Bacillus atrophaeus</i>	24±0,49	C	-	+	+	Z+	6	-	-	+	+
2	FDG 48	<i>Bacillus sphaericus</i>	19±0,08	DE	-	+	+	Z+	5	-	+	+	+
3	RK 546	<i>Bacillus subtilis</i>	16,5±0,12	EF	-	+	+	K+	3	-	-	+	+
4	RK 1062	<i>Brevibacillus choshinensis</i>	16±0,34	GL	-	+	+	Z+	6	-	+	+	+
5	RK 554	<i>Bacillus atrophaeus</i>	15±0,0	FG	-	+	+	K+	3	-	-	+	+
6	RK 578B	<i>Brevibacillus choshinensis</i>	15±0,24	FG	+	+	+	-	4	+	+	+	-
7	RK 1077	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	15±0,41	FG	+	+	+	K+	6	-	+	+	+
8	RK 547	<i>Bacillus megaterium</i>	14,5±0,12	F-H	-	+	+	Z+	5	-	-	+	+
9	RK 576B	<i>Serratia fonticola</i>	14,5±0,29	FH	+	+	+	K+	3	+	-	-	-
10	RK 834	<i>Bacillus cereus</i>	14±0,08	F-I	-	+	+	Z+	3	-	-	+	+
11	RK 594	<i>Salmonella typhimurium</i>	14±0,33	F-I	+	+	+	K+	3	+	-	+	+
12	RK 1763	<i>Paenibacillus macerans</i>	13,5±0,12	G-J	-	+	+	Z+	2	-	-	+	+
13	RK 1224	<i>Pantoea agglomerans</i>	13±0,24	G-K	+	+	+	K+	2	+	-	-	+
14	R2/2	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	12,5±0,20	G-L	-	+	+	Z+	3	-	-	+	+
15	FDG 98	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	12,5±0,20	G-L	+	+	+	-	5	-	-	+	+
16	RK 578A	<i>Bacillus megaterium</i>	12,5±0,12	G-L	-	+	+	K+	5	-	-	+	+
17	RK 957	<i>Chryseobacterium meningosepticum</i>	12±0,33	H-M	+	+	+	-	4	+	+	-	+
18	RK 1071	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	12±0,24	H-M	-	+	+	Z+	3	-	-	+	+
19	RK 1088	<i>Vibrio hollisae</i>	12±0,24	H-M	+	+	+	Z+	6	-	+	+	+
20	RK 600	<i>Hafnia alvei</i>	11,5±0,12	I-N	+	+	-	Z+	3	+	-	+	+
21	RK 1064	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	11,5±0,12	I-N	-	+	+	Z+	5	-	+	+	+
22	RK 1080	<i>Bacillus megaterium</i>	11,5±0,29	I-N	-	+	+	Z+	4	-	-	+	+
23	RK 844	<i>Bacillus megaterium</i>	11±0,08	J-O	-	+	+	Z+	3	-	-	+	+
24	RK 562	<i>Vibrio hollisae</i>	11±0,08	J-O	+	+	+	K+	3	+	+	+	+
25	RK 572B	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	11±0,08	J-O	-	+	+	Z+	5	-	-	+	+
26	RK 588	<i>Salmonella typhimurium</i>	11±0,08	J-O	+	+	+	K+	3	+	-	+	+
27	RK 1255	<i>Bacillus atrophaeus</i>	10,5±0,04	K-P	-	+	+	K+	3	-	-	-	+
28	FDG 27	<i>Brevibacillus brevis</i>	10±0,0	L-Q	-	+	+	Z+	3	-	+	+	+
29	RK 574A	<i>Bacillus cereus</i>	10±0,0	L-Q	-	+	+	Z+	3	-	-	+	+
30	RK 1031	<i>Alcaligenes faecalis</i>	10±0,0	L-Q	+	+	-	-	5	-	+	+	+
31	RK 1074	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	10±0,0	L-Q	+	+	+	K+	6	-	+	-	+
32	RK 932	<i>Bacillus megaterium</i>	9,5±0,37	M-R	-	+	+	K+	4	-	-	+	+

Çizelge 4.4. (devam)

Sıra no	İzolat	MIS Tanı	Antibiyozis Etki		Biyokimyasal ve Fizyolojik Testler									
			OİZ ¹ (mm)		KOH ²	K ³	NH ⁴	N ⁵	P ⁶	L ⁷	O ⁸	PA ⁹	HA ¹⁰	
33	RK 1257	<i>Bacillus atrophaeus</i>	9,5±0,12	M-R	-	+	+	K+	5	-	-	+	+	
34	RK 561	<i>Bacillus subtilis</i>	9±0,08	N-S	-	+	+	Z+	3	-	-	+	+	
35	RK 1061	<i>Pseudoalteromonas terraodonis</i>	9±0,08	N-S	-	+	+	K+	6	-	+	+	+	
36	RK 581	<i>Salmonella typhimurium</i>	8,5±0,12	O-T	+	+	+	K+	2	+	-	+	+	
37	RK 590	<i>Salmonella typhimurium</i>	8,5±0,12	O-T	+	+	+	K+	2	+	-	+	+	
38	RK 602	<i>Salmonella typhimurium</i>	8,5±0,12	O-T	+	+	+	Z+	3	+	-	+	+	
39	RK 1253	<i>Bacillus atrophaeus</i>	8±0,16	P-T	-	+	+	Z+	5	-	-	+	+	
40	RK 1273	<i>Peaibacillus macerans</i>	8±0,16	P-T	-	+	+	Z+	3	-	-	+	+	
41	RK 37	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	7,5±0,20	Q-U	-	+	+	K+	3	-	-	+	+	
42	RK 1050	<i>Bacillus megaterium</i>	7,5±0,12	Q-U	-	+	+	Z+	5	-	-	+	+	
43	RK 1078	<i>Bacillus subtilis</i>	7,5±0,20	Q-U	-	+	-	Z+	5	-	-	+	+	
44	RK 605	<i>Brevibacillus choshinensis</i>	7±0,16	R-V	+	+	+	K+	2	+	+	+	+	
45	RK 985	<i>Stenotrophpmonas maltophilia</i>	7±0,16	R-V	+	+	+	Z+	3	-	-	+	+	
46	RK 1086	<i>Aeromonas salmonicida</i>	7±0,24	R-V	+	+	+	-	6	-	+	-	+	
47	RK 1252	<i>Bacillus atrophaeus</i>	7±0,08	R-V	-	+	+	K+	5	-	-	+	+	
48	RK 1022	<i>Bacillus-GC group</i>	6,5±0,12	S-W	-	+	+	Z+	6	-	-	+	+	
49	RK 1104	<i>Bacillus megaterium</i>	6,5±0,12	S-W	-	+	+	Z+	5	-	-	+	+	
50	RK 1239	<i>Bacillus subtilis</i>	6,5±0,12	S-W	-	+	+	Z+	5	-	-	+	+	
51	RK 506	<i>Bacillus subtilis</i>	6±0,16	T-X	-	+	+	Z+	3	-	-	+	+	
52	RK 601	<i>Serretia fonticola</i>	6±0,08	T-X	+	+	+	Z+	5	+	-	+	+	
53	RK 877	<i>Aeromonas salmonicida</i>	5±0,00	U-X	+	+	-	-	6	-	+	+	+	
54	RK 1274	<i>Peaibacillus macerans</i>	4,5±0,04	V-X	-	+	+	Z+	5	-	-	+	+	
55	RK 1275	<i>Bacillus coagulans</i>	4,5±0,12	V-X	-	+	+	Z+	3	-	-	+	+	
56	RK 981	<i>Zobellia uliginosa</i>	4±0,08	WX	-	+	+	K+	3	-	-	+	+	
57	RK 1058	<i>Arthrobacter agilis</i>	4±0,16	WX	-	+	+	Z+	6	-	+	+	+	
58	RK 1095	<i>Paenibacillus larvae</i>	3,5±0,12	X	-	+	+	Z+	5	-	-	+	+	
59	FDG 97	Tanılanamadı	12,5±0,20	G-L	+	+	+	K+	6	-	-	+	+	
60	RK 1238	Tanılanamadı	8±0,0	P-T	-	+	-	Z+	5	-	-	+	+	
61	RK 1752	Tanılanamadı	8±0,16	P-T	-	+	+	Z+	3	-	-	+	+	
62	RK 999	Tanılanamadı	7,5±0,20	Q-U	-	+	+	Z+	4	-	-	+	+	
63	RK 952	Tanılanamadı	6,5±0,12	S-W	+	+	+	Z+	6	-	-	+	+	
64	RK 1977	Tanılanamadı	37,5±0,20	A	-	+	+	Z+	5	-	+	+	+	
65	RK 1978	Tanılanamadı	30±0,82	B	-	+	+	Z+	3	-	-	+	+	
66	RK 1986	Tanılanamadı	21±0,08	D	-	+	+	Z+	2	-	+	-	+	

Çizelge 4.4. (devam)

Sıra no	İzolat	MIS Tanı	Hiperparazitik Etki		Biyokimyasal ve Fizyolojik Testler								
			OYA ¹¹ (mm)		KOH ²	K ³	NH ⁴	N ⁵	P ⁶	L ⁷	O ⁸	PA ⁹	HA ¹⁰
1	RK 593	<i>Bacillus cereus</i>	78,5±0,69	A	-	+	+	K+	6	-	-	+	+
2	FDG 105	<i>Bacillus mycoides</i>	70±1,22	AB	-	+	+	Z+	3	-	-	+	+
3	FDG 137	<i>Bacillus-cereus</i>	70±0,82	AB	-	+	+	K+	6	-	-	+	+
4	RK 587	<i>Photorhabdus luminescens</i>	70±0,82	AB	+	+	+	Z+	5	-	-	+	+
5	RK 504	<i>Bacillus megaterium</i>	65±1,22	BC	-	+	+	K+	5	-	-	+	+
6	FDP 8	<i>Bacillus thuringiensis</i>	65±1,22	BC	-	+	+	K+	6	-	-	+	+
7	RK 38	<i>Sphingomonas capsulata</i>	65±0,10	BC	+	+	+	Z+	6	-	-	+	+
8	RK 1786	<i>Photorabds luminescens</i>	65±0,41	BC	+	+	+	K+	3	-	-	-	+
9	RK 23	<i>Bacillus mycoides</i>	63±0,65	B-D	-	+	+	Z+	5	-	-	+	+
10	RK 75	<i>Bacillus cereus</i>	62,5±0,61	B-D	+	+	+	Z+	6	-	-	+	+
11	FDG 110	<i>Bacillus mycoides</i>	62,5±0,20	B -D	-	+	+	K+	5	-	-	+	+
12	RK 159	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	56±0,33	C-F	-	+	+	K+	6	-	-	+	+
13	RK 574B	<i>Stenotrophpmonas maltophilia</i>	53,5±0,12	D-G	-	+	+	Z+	5	-	-	+	+
14	RK 301	<i>Bacillus cereus</i>	52,5±0,20	D-G	+	+	+	K+	5	-	-	+	+
15	RK 142	<i>Pseudomonas putida</i>	48±2,29	F-H	-	+	+	K+	3	-	-	+	+
16	RK 1395	<i>Serretia odorifera</i>	43±0,57	G-J	-	+	-	Z+	6	-	-	+	+
17	RK 52	<i>Pseudomonas syringae</i>	40±1,22	H-L	+	+	+	K+	5	-	-	+	+
18	RK 1079	<i>Pseudomonas agarici</i>	40±1,22	H-L	-	+	+	-	6	+	+	+	+
19	PM 18	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	36±1,96	I-M	+	+	+	K+	5	-	-	+	+
20	RK 1364	<i>Varivorax paradoxus</i>	32,5±1,02	J-N	-	+	-	-	6	-	-	-	+
21	RK 1094	<i>Vibrio hollisae</i>	30±0,41	K-O	+	+	+	Z+	5	-	+	+	+
22	RK 1066	<i>Dunganella zoogloeoides</i>	29±0,49	L-P	-	+	-	-	6	-	-	+	+
23	RK 993	<i>Brevibacillus centrophorus</i>	28±1,63	M-P	+	+	+	Z+	5	-	-	+	+
24	RK 1338	<i>Bacillus cereus</i>	26±1,14	M-P	-	+	+	Z+	6	-	-	+	+
25	RK 570A	<i>Kurthia gibsonii</i>	25±0,82	MQ	-	+	+	K+	3	-	-	-	+
26	RK 54	<i>Pseudomonas viridiflava</i>	23,5±1,35	N-R	-	+	+	Z+	5	-	-	+	+
27	RK 1433	<i>Paenibacillus macerans</i>	23±0,98	N-R	-	+	+	Z+	3	-	-	+	+
28	RK 1036	<i>Bacillus megaterium</i>	19±1,14	O-R	-	+	-	Z+	5	-	-	+	+

Çizelge 4.4. (devam)

Sıra no	İzolat	MIS Tanı	Hiperparazitik Etki		Biyokimyasal ve Fizyolojik Testler								
			OYA ¹¹ (mm)		KOH ²	K ³	NH ⁴	N ⁵	P ⁶	L ⁷	O ⁸	PA ⁹	HA ¹⁰
29	RK 1223	<i>Brevibacterium epidermidis</i>	12,5±0,45	R	-	+	+	K+	6	+	-	+	+
30	RK 1429	Tanılanamadı	70±1,63	AB	-	+	-	Z+	3	+	-	+	+
31	IA 1	Tanılanamadı	67,5±0,61	AB	-	+	+	Z+	6	-	-	+	+
32	RK 1417	Tanılanamadı	65±2,04	BC	-	+	+	Z+	6	-	-	+	+
33	RK 1416	Tanılanamadı	61±1,14	B-E	+	+	+	K+	6	-	-	+	+
34	RK 1305	Tanılanamadı	60±0,41	B-E	-	+	+	K+	6	-	-	+	+
35	RK 1414	Tanılanamadı	50,5±1,27	E-H	-	+	+	K+	6	-	-	+	+
36	RK 1413	Tanılanamadı	46,5±0,86	F-I	-	+	+	K+	6	-	-	+	+
37	RK 1407	Tanılanamadı	40,5±2,0	H-K	-	+	+	Z+	6	-	-	+	+
38	RK 1458	Tanılanamadı	20±0,24	O-R	+	+	+	K+	5	+	-	+	-
39	RK 1278	Tanılanamadı	18±0,98	P-R	+	+	+	Z+	6	-	-	+	+
40	RK 1102	Tanılanamadı	14±0,65	QR	-	+	+	Z+	5	-	-	+	+

1: OİZ: Ortalama inhibisyon zonu (mm), 2: KOH: Potasyum hidroksit testi (+: pozitif, -: negatif), 3: K: Katalaz testi (+: pozitif, -: negatif), 4: NH: Nişasta hidrolizi (+: pozitif, -: negatif), 5: N: Azot çözebilme (K: kuvvetli pozitif, Z: zayıf pozitif, -: negatif), 6: P: Fosfatı çözebilme (1: (++++), 2: (++++), 3: (+++), 4: (++) 5: (+) 6: (-) fosfat testi skala değerleri), 7: L: Levan testi (+: pozitif, -: negatif), 8: O: Oksidaz testi (+: pozitif, -: negatif), 9: PA: Pektolitik aktivite (+: pozitif, -: negatif), 10: HA: Hemolitik aktivite (+: pozitif, -: negatif), 11: OYA: Ortalama yayılma alanı (mm).

Petri denemelerinde 66 adet biyoajan bakterinin antibiyozis etki gösterdiği ve ortalama inhibisyon zon (mm) değerlerinin 0-37,5 aralığında değiştiği belirlenmiştir. En yüksek antibiyozis etkiye sahip izolatın RK 1977 (37,5 mm) olduğu, RK 1978 (30 mm) ve RK 1250 (24 mm) izolatlarının diğer en yüksek etkiye sahip ikinci ve üçüncü izolat olduğu belirlenmiştir. RK 1095 (3,5 mm) en düşük ortalama inhibisyon zonu oluşturan izolat olduğu tespit edilmiştir.

Petri denemelerinde etkili olan 40 adet biyoajan bakteri izolatı hiperparazitik etkiye sahip olduğu ve ortalama yayılma alanı ise 0-78,5 (mm) aralığında değiştiği belirlenmiştir. Bu biyoajanlar içerisinde en yüksek hiperparazitik etkiye sahip izolatın RK 593 (78,5 mm) olduğu, bu izolatı FDG 105 (70 mm), FDG 137 (70 mm) izolatları takip etmiştir. RK 1223 (12,5 mm) biyoajan bakteri izolatının da en düşük ortalama yayılma alanı sahip izolat olmuştur.

4.4. Katı Besiyerinde Antibiyozis ve Hiperparazitik Etkiye Sahip İlk Beş Potansiyel Biyoajan Bakterinin Sıvı Besiyerinde Patojene Karşı Test Edilmesi Sonuçları

In vitro petri denemelerinde antibiyozis veya hiperparazitik etki gösteren en etkili ilk beş biyoajan izolat patojene karşı sıvı besi ortamında test edilmiş ve bakteri sayım sonuçlarına ait koloni sayıları (kob/ml) Çizelge 4.5’de verilmiştir.

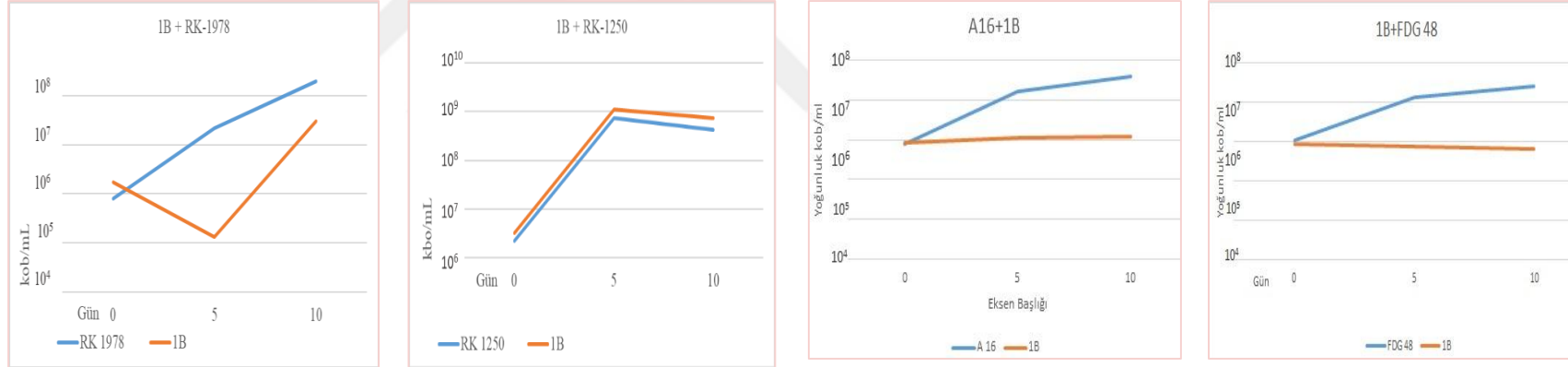
Çizelge 4.5. Katı besiyerinde antagonistik ve hiperparazitik etki gösteren ilk beş bakterinin sıvı besiyerinde patojene karşı test edilmesinin sonuçları (kob/ml)

Antibiyozis Etki Gösteren İlk 5 İzolat						
Patojen ve biyoajan bakteri sayıları (kob/ml)						
Uygulamalar	0. gün		5. gün		10. gün	
	PS¹	BS²	PS¹	BS²	PS¹	BS²
1B+RK 1977	*	*	*	*	*	*
1B+RK 1978	20x10 ⁵	8x 10 ⁵	1,3x10 ⁵	22x10 ⁶	0,3x10 ⁸	2x10 ⁸
1B+RK 1250	91,7x10 ⁴	2,3x10 ⁶	3,7x10 ⁸	7,4x10 ⁸	3,1x10 ⁸	4,3x10 ⁸
1B+RK 1986	86x10 ⁴	67,2x10 ⁴	1,1x10 ⁶	15x10 ⁶	1,2x10 ⁶	38x10 ⁶
1B+FDG 48	10,2x10 ⁵	1x10 ⁶	7,3x10 ⁵	11x10 ⁶	65x10 ⁴	25x10 ⁶
Hiperparazitik Etki Gösteren İlk 5 İzolat						
Patojen ve biyoajan bakteri sayıları (kob/ml)						
Uygulamalar	0. gün		5. gün		10. gün	
	PS¹	BS²	P¹	B²	P¹	B²
1B+RK 593	81,3x10 ⁴	52,7x10 ⁴	4,4x10 ⁸	25x10 ⁶	8,0x10 ⁸	44x10 ⁶
1B+FDG 105	90x10 ⁴	23x10 ⁴	10x10 ⁸	20x10 ⁶	2,2x10 ⁸	27x10 ⁶
1B+FDG 137	66,3x10 ⁴	32x10 ⁴	28x10 ⁸	17x10 ⁶	1,9x10 ⁸	59x10 ⁶
1B+RK 1429	*	*	*	*	*	*
1B+RK 587	1,4x10 ⁶	5x10 ⁴	20x10 ⁸	3,3x10 ⁶	5x10 ⁸	8x10 ⁶

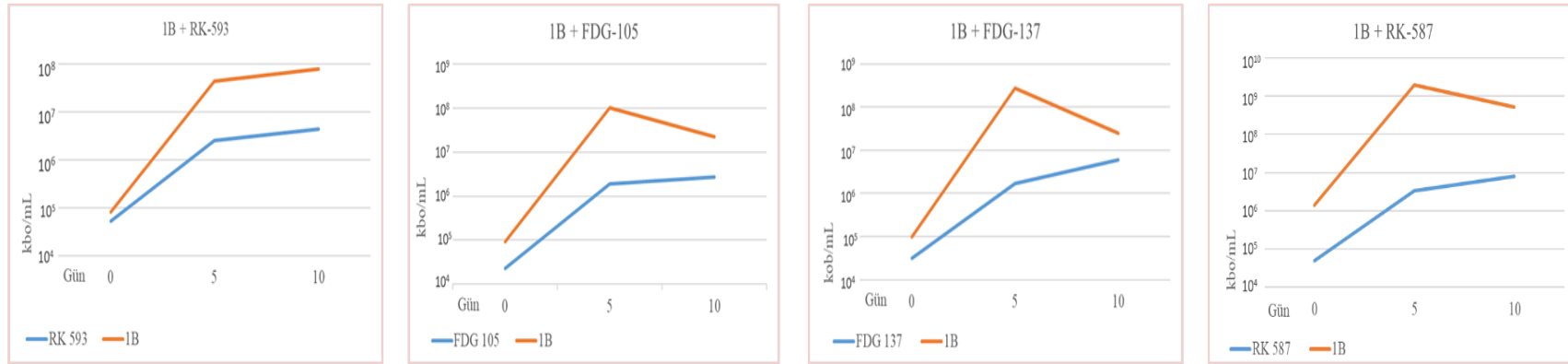
1: Patojen sayısı, 2: Biyoajan sayısı, *: koloni yapılarının benzerliğinden dolayı ayrı ayrı sayım yapılamamıştır

Sayım sonuçlarına göre; patojen ve biyoajanın 0, 5 ve 10. gün sayımlarında farklılıklar gözlenmiştir. Patojen ve biyoajan uygulamalarında sayım yapılan dilüsyonlara ait (kob/ml) koloni sayılarının grafikleri Şekil 4.4’de, ayrıca petri görünümleri Şekil 4.5’de verilmiştir. Sayım sonuçlarında antibiyozis ve hiperparazitik etki gösteren biyoajan bakteri izolatlarının patojenin gelişimini tamamen engelleyemediği ve ortamda birlikte yaşamaya devam ettiği görülmüştür. Antibiozis etkiye sahip biyoajan bakterilerin onuncu gün sonunda patojene göre daha fazla sayıda bulunduğu belirlenmiştir.

Antibiyozis Etki Gösteren İzolatlar



Hiperparazitik Etki Gösteren İzolatlar



Şekil 4.4. Patojen+biyoajanların sıvı besiyerinde test edilmesine ait grafikler

Antibiyozis Etki Gösteren İzolatlar

RK 1978



RK 1250



RK 1986



FDG 48



Hiperprazitik Etki Gösteren İzolatlar

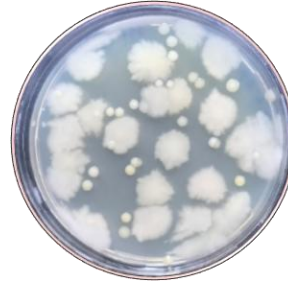
RK 593



FDG 105



FDG 137



RK 587



Şekil 4.5. Katı besiyerinde en etkili olan ilk beş antibiyozis ve hiperparazitik etkiye sahip biyoajanın patojene karşı sıvı besiyerinde test edilmesine ait 10. gün petri resimleri

4.5. Potansiyel Biyoajan Bakterilerin Biyokimyasal ve Kültürel Tanı Testlerinin Sonuçları

Petri denemelerinde etkili olan 106 adet potansiyel biyoajan bakteri izolatına ait biyokimyasal ve kültürel test sonuçları Çizelge 4.4’de verilmiştir.

KOH testi sonucuna göre otuz sekiz izolat pozitif sonuç gösterirken altmış sekiz izolat negatif sonuç vermiştir yani otuz sekiz izolat Gram pozitif, altmış sekiz izolat Gram negatif olarak tespit edilmiştir.

Katalaz testine göre bütün izolatlar katalaz pozitif sonucu vermiştir bu da gösteriyor ki bütün izolatlar aerob ve fakültatif anaerob bakterilerin çoğu solunumun bir ürünü olarak H_2O_2 üretirler. Üreme ortamında H_2O_2 birikmesi halinde organizma için toksik etki yapacağı için organizma yapısında bulunan katalaz enzimi ile H_2O_2 ’yi O_2 ve H_2 ’ye indirgerler.

Nişasta hidroliz testine sonucuna göre; on izolat hariç bütün izolatlar nişastayı hidroliz edebilmişler ve amilaz enziminin varlığı kanıtlanmıştır.

Oksidaz testi sonucu yirmibir izolat oksidaz testine pozitif sonuç, seksenbeş bakteri izolatı negatif sonuç vermiştir. Oksidaz testi ile bakterilerin yapısında sitokrom C enziminin varlığını ve bunun da aerobik bakterilerde bulunduğu bilinmektedir.

Hemolitik aktivite testine göre üç izolat hariç bütün izolatlar hemolitik aktivite göstermişlerdir. Hemolitik aktivite testi sonucuna göre bazı izolatlar α -hemoliz bazıları ise β -hemoliz sonucunu vermişlerdir.

Pektolitik aktivite testine göre sekiz izolat hariç diğer bakteri izolatları patates dilimlerinde pektolitik aktiviteye sebep olmuşlardır.

Levan testi sonucuna göre ondokuz izolat pozitif reaksiyon verirken seksenyedi izolat negatif sonuç vermiştir. Bu test ile izolatların sükrozu kullanması sonucu konveks, mukoid koloniler oluşturur ve pozitif olarak değerlendirilirken, mukoid yapıda olmayan koloniler ise levan negatif olarak değerlendirilmiştir.

NBRIP besi ortamı fosfat çözücü bakterilerin tespiti için kullanılan bir besiyeridir. Belirlenen sklaya göre sonuçlar; otuziki izolat fosfatı hiç çözememiş (6:-), otuzbir izolat en düşük düzeyde (5: +), beş izolat (4:++) düzeyde, otuz izolat (3:+++) düzeyde ve altı izolat (2:++++) düzeyde fosfatı çözmüştür.

Azotsuz besi ortamına ekilen bakterilerden otuzdört izolat kuvvetli, ellisekiz izolat zayıf azot fiksasyonu yaparken ondört izolat ise hiç azot fiksasyonu yapamamıştır.

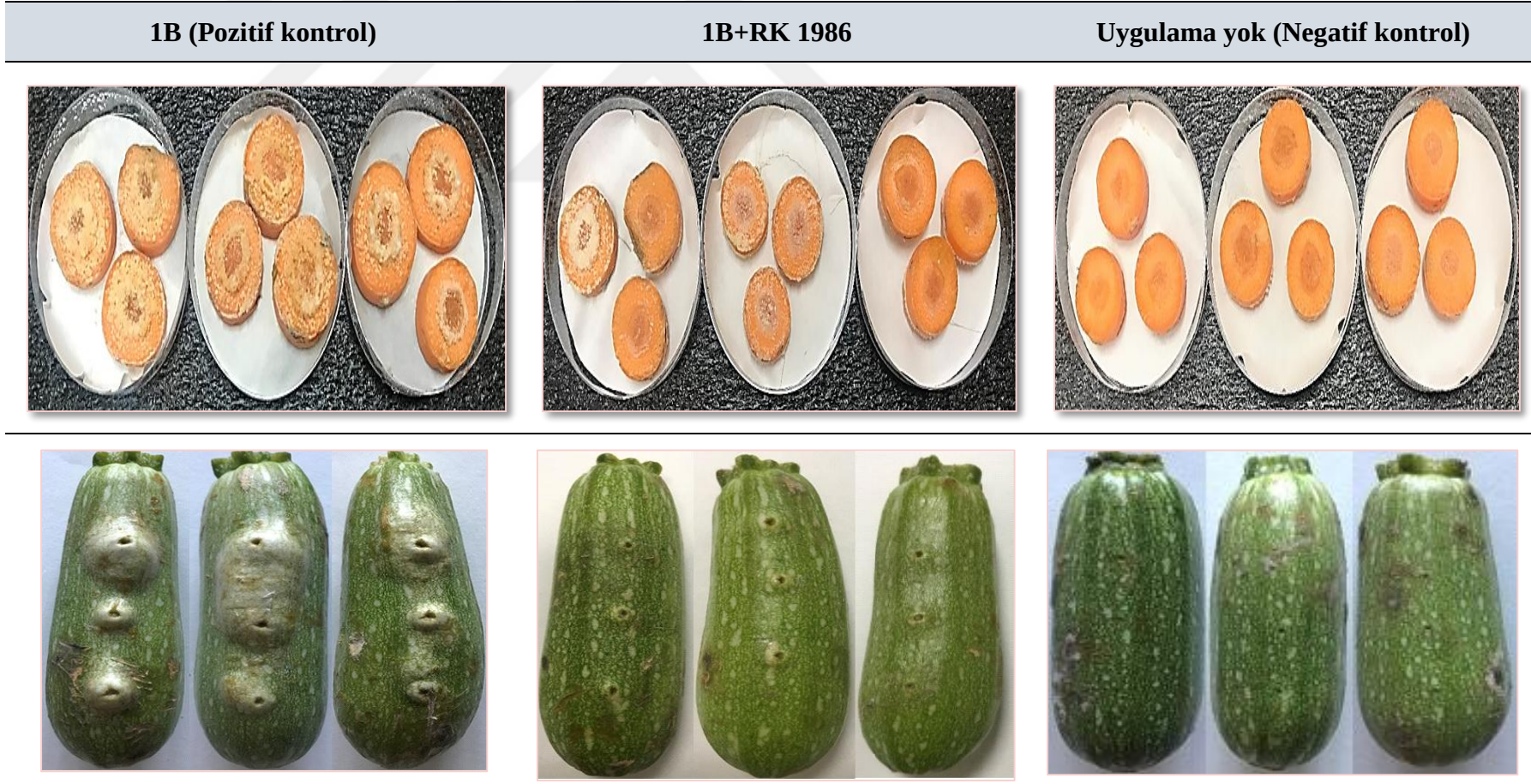
4.6. *In Vitro* Şartlarda Etkili Olan Biyoajan Bakterilerin Havuç Dilimlerinde ve Kabak Meyvesinde Test Edilmesinin Sonuçları

Çalışmada kullanılan biyoajanların patojenle birlikte havuç dilimlerinde ve kabak meyvesinde test edilmesine ait istatistik analiz sonuçları Çizelge 4.6'da verilmiştir. En etkili olan izolata ait görseller Şekil 4.6'da verilmiştir.

Çizelge 4.6. Patojen ve biyoajan uygulamalarının havuç dilimlerinde ve kabak meyvelerinde test sonuçları

Uygulamalar	Havuç dilimi testi	Kabak meyvesi testi
Patojen 1B+Biyoajan RK 1986	1,78 E	0,26 H
Patojen 1B+Biyoajan RK 570A	2,89 D	0,35 G
Patojen 1B+Biyoajan RK 1074	3,44 CD	0,46 F
Patojen 1B+Biyoajan RK 1086	3,78 B-D	0,59 E
Patojen 1B+Biyoajan RK 1224	3,89 B-D	0,68 E
Patojen 1B+Biyoajan RK 957	4,12 BC	0,82 D
Patojen 1B+Biyoajan RK 1364	4,56 AB	0,98 C
Patojen 1B+Biyoajan RK 1786	4,78 AB	1,16 B
Patojen 1B	5,44 A	1,61 A
CV:	0,29	0,12
LSD:	1,08	0,09

In vitro şartlarda etkili olan 106 adet potansiyel biyoajan bakteri izolatu hem havuç dilimlerinde ve hem de kabak meyvelerinde test edilmiş ve patatestte pektolitik aktivite gösteren izolatların aynı şekilde havuç dilimleri ve kabak meyvesinde de pektolitik aktiviteye neden oldukları görülmüştür. Pektolitik aktivite göstermeyen 8 izolat havuç dilimlerinde Limanska *et al.* 2015'e yapılan değerlendirmeye göre; kabak meyvesinde ur sayısı ve çapı ölçülerek ur oluşum yüzdesi istatistik analiz yapılarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlarda ur oluşumunu en aza indiren izolatın 1B+RK 1986 olduğu, onu 1B+RK 570A ve 1B+RK 1074'ün takip ettiği görülmüştür.



Şekil 4.6. Havuç dilimi ve kabak meyvesinde en etkili olan RK 1986 izolatına ait görsel

4.7. Sera Denemesinde Kullanılan Biyoajan Bakterilerin Metabolit Test Sonuçları

Havuç dilimlerinde ve kabak meyvesinde etkili olan izolatlar (RK 1986, RK 570A) ve *in vitro* şartlarda sıvı ve katı besiyerinde etkili olan izolatlardan (RK 1977, RK 1978, FDG 48) metabolit üretilip üretilmediklerini belirlemek amacıyla hidrojen siyanid, indol asetik asit (IAA), salisilik asit ve siderefor metabolit testleri yapılmış ve sonuçları Çizelge 4.7’de verilmiştir.

Çizelge 4.7. Biyoajan bakterilerin metabolit test sonuçları

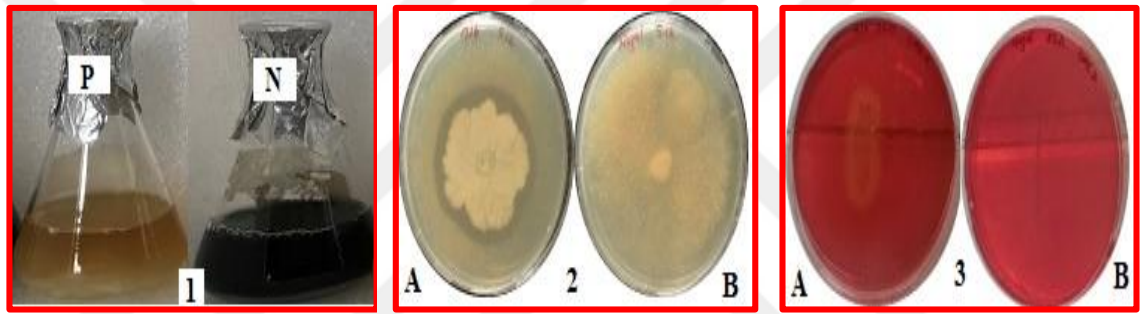
İzolat	Biyoajan Bakteri Metabolitleri			
	HCN ¹	IAA (µg/ml) ²	Salisilik asit	Siderofor
FDG 48	+	0,140	-	-
RK 570A	+++	0,031	-	-
RK 1977	+	0,102	-	-
RK 1978	-	0,286	-	-
RK 1986	-	0,128	-	-

1: Hidrojen siyanid -: üretmiyor, +: sarı-açık kahve, ++: kahve, +++: kırmızı-kahve; 2: Indol asetik asit

Biyoajan bakterilerin yapılan metabolit aktivite testleri sonucunda sadece RK 570A izolatı en çok HCN üretimi yapan izolat, FDG 48 ve RK 1977 sınırlı miktarda üretim, RK 1978 ve RK 1986 izolatlarının HCN üretimi yapmadığı belirlenmiştir. IAA testi (OD: 530 nm) sonucunda 0,031-0,286 µg/ml arasında değişen sonuçlar elde edilmiştir. IAA üretimi sonuçlarına göre: RK 1978 izolatının en çok IAA, RK 570A izolatının ise en düşük IAA üretimi yapan izolat olduğu belirlenmiştir. Salisilik asit ve siderefor üretimi sonuçlarına göre hiçbir izolatın salisilik asit ve siderefor üretmediği tespit edilmiştir.

4.8. Sera Denemesinde Kullanılan Biyoajan Bakterilerin Enzim Aktivitelerinin Sonuçları

Havuç dilimlerinde ve kabak meyvesinde etkili olan (RK 570A, RK 1986) ve *in vitro* şartlarda sıvı ve katı besiyerinde etkili olan izolatlar (FDG 48, RK 1977, RK 1978) tarafından bölüm 3.2.10'da açıklanan kitinaz, fitaz, amilaz [Şekil 4.7 (1), proteaz (Şekil 4.7 (2), selülaz (Şekil 4.7 (3)) enzimlerinin üretilip üretilmediği test edilmiş ve sonuçları Çizelge 4.8'de verilmiştir.



Şekil 4.7. Biyoajan bakterilere ait enzim test sonuçları (1) Amilaz enzimi üretimi (P) pozitif reaksiyon (N) negatif reaksiyon; (2) Proteaz enzimi (A) zon oluşturan (B) zon oluşturmeyen izolat; (3) Selülaz enzimi (A) zon oluşturan (B) zon oluşturmeyen izolat

Çizelge 4.8. Biyoajan bakterilerin enzim aktivite test sonuçları

İzolat	Enzimler*				
	Kitinaz	Fitaz	Amilaz	Proteaz	Selülaz
FDG 48	0,183	0,298	+	43,5	20,0
RK 570A	0,266	0,387	-	33,5	8,0
RK 1977	0,462	0,168	+	0,00	5,0
RK 1978	0,250	0,294	+	37,0	17,0
RK 1986	0,250	0,284	+	49,5	21,0

*Kitinaz OD: 540 ve Fitaz OD: 700'da absorbans olarak ölçülmüştür: +: pozitif reaksiyon, -: negatif reaksiyon; proteaz ve selülaz enzimlerinde zon ölçümü (mm) yapılmıştır.

Bu çalışmada kitinaz enzimi üretiminin (OD: 540 nm) 0,183-0,462 absorbans değerleri arasında olduğu belirlenmiştir. RK 1977 izolatının en yüksek ve FDG 48 izolatının ise en düşük kitinaz aktivitesini gösterdiği tespit edilmiştir. Fitaz enzimi üretiminin (OD: 700 nm) 0,168-0,387 absorbans değerleri arasında olduğu belirlenmiştir. RK 570A izolatı en yüksek ve RK 1977 izolatının ise en düşük fitaz aktivitesini gösterdiği belirlenmiştir. Amilaz enzimini RK 570A izolatı hariç diğer izolatlar, proteaz enzimini RK 1977 izolatı hariç bütün izolatlar üretmiş ve proteaz enzim aktivitesinde izolatların 33,5-49,5 mm arasında zon oluşturdıkları görülmüştür. Selülaz enzimi üretiminde bütün izolatların 5-21 mm arasında değişen zon oluşturdıkları görülmüştür. En yüksek selülaz enzimi üretimi RK 1986 izolatında olurken, en düşük selülaz enzim üretimi RK 1977’de olduğu görülmüştür.

4.9. GF 677 Anacında Sera Denemesinin Sonuçları

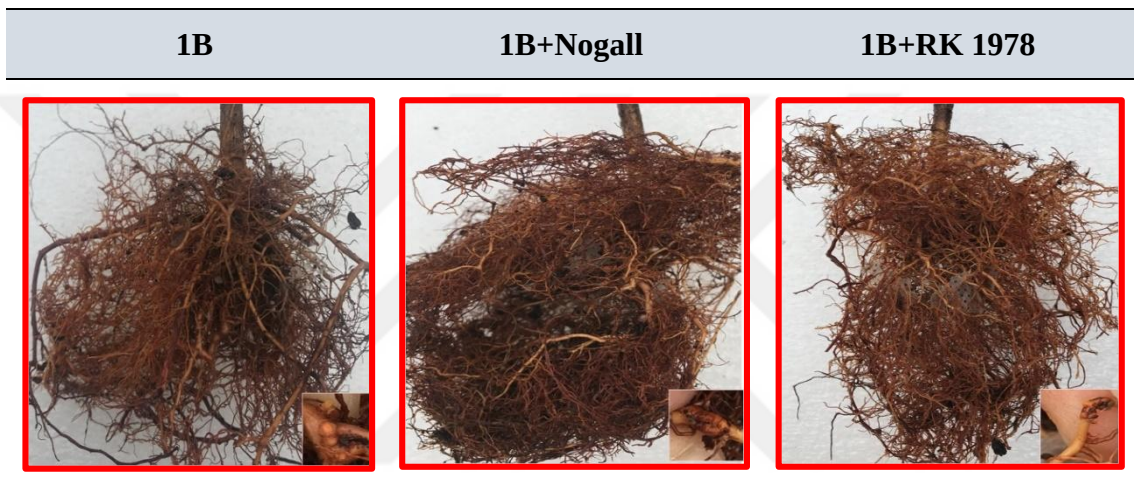
Havuç dilimlerinde ve kabak meyvesinde etkili olan (RK 1986, RK 570A) ve katı ile sıvı besiyerinde etkili olan izolatlar (RK 1977, RK 1978, FDG 48) GF 677 anacında kök ve gövde uygulaması olmak üzere iki farklı yöntemle test edilmiştir. Kök uygulamasında görülen ur sayısına göre, gövde uygulamasında yara açılan bölgelerdeki ur çapının ölçüm (en/boy) değerleri alınarak JMP istatistik programı ile analiz yapılmıştır. Denemeye ait uygulama sonuçları Çizelge 4.9’da ve kök uygulamasında görülen urlara ait görünüm Şekil 4.8’de verilmiştir.

Çizelge 4.9. GF 677 fidan anacında patojen+biyoajan kök ve gövde uygulama sonuçları

Formülasyonlar		Uygulamalar*			
		Kök Uygulama		Gövde Uygulama	
		Ur sayısı/Bitki sayısı		Ur çapı (cm)	
Kontrol 1	Yara açılmamış bitki	0±00	D	0±0,00	E
Kontrol 2	Patojen 1B	5,4±1,62	A	0,49±0,08	A
Kontrol 3	Patojen 1B+Biyopestisit Nogall	1,8±0,9	CD	0,48±0,13	B
Patojen+Biyoajan	Patojen 1B+Biyoajan RK 1986	3,8±1,9	A-C	0,47±0,06	AB
	Patojen 1B+ Biyoajan FDG 48	3,0±1,7	A-C	0,47±0,14	AB
	Patojen 1B+ Biyoajan RK 570A	4,4±1,8	AB	0,46±0,08	A-C
	Patojen 1B+ Biyoajan RK 1977	3,8±1,3	A-C	0,45±0,08	A-C
	Patojen 1B+ Biyoajan RK 1978	2,4±1,5	B-D	0,24±0,08	A-E
CV:		0,52		0,62	
LSD:		2,48		0,25	

* Aynı sütundaki aynı hafle gösterilen uygulamalar arasındaki farklılıklar istatistiki olarak önemli bulunmamıştır p<0,01

Çalışmada elde edilen bulgulara göre; kök uygulamalarında kontrole göre uygulamalar arasında farklılıklar gözlenmiştir. Biyoajan kök uygulamalarında patojen uygulamasına göre, en yüksek etkiye sahip uygulama ticari biyopestisit olan 1B+Nogall, onu 1B+RK 1978 takip etmiştir. 1B+RK 570A biyoajan uygulaması en az etkili uygulama olmuştur. Gövde uygulamalarında, en düşük ur çapı 1B+RK1978 uygulamasında gözlenmiştir. Diğer uygulamalar arasında istatistiksel bir fark gözlenmemiştir.



Şekil 4.8. Patojen ve en etkili olan uygulamalarda oluşan urlardan görünüm

4.10. Bitki Savunma Metabolizma Enzimlerinin Değerlendirilmesi

Anaç fidanlarda patojen+biyoajan kök/gövde uygulamalarının bitki savunma metabolizma enzimleri üzerine etkisini belirlemek amacıyla yapılan varyans analiz sonuçları Çizelge 4.10’da verilmiştir.

Kök ve gövde uygulamalarında hiçbir uygulama yapılmamış bitkiye göre tüm uygulamalarda antioksidan enzim miktarlarında artışlar görülmüştür (Çizelge 4.10).

Kök uygulamalarında CAT enzim aktivitesi en yüksek 1B+RK 570 ve 1B+RK 1977 uygulamalarında gözlenirken, en düşük 1B+RK 1978 ve 1B uygulamalarında gözlenmiştir. Gövde uygulamalarında CAT enzim aktivitesi en yüksek 1B+RK 1986 ve

1B+FDG 48 uygulamalarında gözlenmiştir. Kök uygulamaların POD enzim aktivitesi en yüksek 1B+Nogall ilaç uygulamasında gözlemlenirken onu 1B+RK 570A ve 1B+RK 1977 uygulamaları takip etmiştir. Gövde uygulamasında POD enzim aktivitesi en yüksek 1B+FDG 48'de gözlemlenirken onu 1B+RK 570A ve 1B+RK 1986 uygulamaları takip etmiştir. Kök uygulamalarında SOD enzim aktivitesi en yüksek RK 1B+RK 1977 uygulamasında daha sonra 1B+RK 1986 ve 1B+Nogall uygulamalarında görülmüştür. Gövde uygulamalarında SOD enzim aktivitesi en yüksek 1B+Nogall uygulamasında gözlemlenirken onu 1B+FDG 48 ve 1B+RK 1986 uygulamaları takip etmiştir. Kök uygulamalarında APX enzim aktivitesi en yüksek 1B+Nogall ve 1B+RK 1977 uygulamalarında en düşük 1B+RK 570A uygulamasında görülmüştür. Gövde uygulamalarında APX enzim aktivitesi en yüksek 1B+RK 1977 uygulamasında en düşük ise 1B+RK 570A uygulamasında gözlemlenmiştir (Çizelge 4.10).

Çizelge 4.10. Patojen+biyoajan kök ve gövde uygulamalarına ait bitki savunma metabolizma enzimlerinin test sonuçları

Kök Uygulama							
Uygulamalar	CAT ¹ (EU/g) ⁵		POD ² (EU/g)		SOD ³ (EU/g)		APX ⁴ (EU/g)
Kontrol	0,072±0,01	D	0,514±0,07	D	367,1±17,8	C	0,772±0,09 BC
1B	0,092±0,02	DC	1,152±0,01	C	511,0±11,8	B	0,899±0,13 AB
1B+Nogall	0,119±0,01	A-C	2,895±0,43	A	682,3±36,6	A	1,046±0,07 A
1B+FDG 48	0,131±0,04	AB	1,213±0,08	C	560,8±52,5	B	0,784±0,06 BC
1B+RK 570A	0,145±0,02	A	2,100±0,06	B	552,6±17,2	B	0,647±0,04 C
1B+RK 1977	0,142±0,01	A	1,891±0,14	B	751,4±60,5	A	0,969±0,11 A
1B+RK 1978	0,093±0,01	DC	1,066±0,05	C	656,3±119	A	0,670±0,06 C
1B+RK 1986	0,099±0,01	B-D	1,278±0,10	C	736,4±30,2	A	0,705±0,09 C
Gövde Uygulama							
Uygulamalar	CAT ¹ (EU/g) ⁵		POD ² (EU/g)		SOD ³ (EU/g)		APX ⁴ (EU/g)
Kontrol	0,037±0,01	C	0,411±0,19	D	608,9±102	E	0,32±0,06 E
1B	0,065±0,01	BC	0,425±0,31	D	808,7±52	C	0,65±0,03 D
1B+Nogall	0,089±0,01	AB	0,965±0,18	BC	1218,2±8	A	1,02±0,02 C
1B+FDG 48	0,108±0,02	A	1,665±0,03	A	1072,4±86	B	0,86±0,06 C
1B+RK 570A	0,095±0,01	AB	1,181±0,18	B	810,2±17	C	0,57±0,05 D
1B+RK 1977	0,100±0,03	AB	0,853±0,06	BC	710,0±7	D	1,50±0,05 A
1B+RK 1978	0,097±0,01	AB	0,660±0,13	CD	871,0±37	C	1,00±0,20 C
1B+RK 1986	0,110±0,03	A	1,135±0,28	B	1065,0±41	B	1,23±0,18 B

1: Katalaz, 2: Peroksidaz, 3: Superoksit dismutaz, 4: Askorbat peroksidaz, 5: EU/g: Enzim unitesi/gram doku, *Sütun içerisindeki aynı harfler ile gösterilen uygulamalar arasında fark önemli değildir (Duncan çoklu karşılaştırma testi, p<0.05)

4.11. Sera Denemesinde Kullanılan Bakterilerin Moleküler Tanı Sonuçları

Karşılaştırmalı DNA dizi analizi yöntemi mikrobiyal tanılamada en iyi genotipik yöntemlerden birisidir. En yaygın olan yaklaşım ise, izolatların 16S rDNA gen bölgesinin kullanımıyla tanılanmasıdır. Bu amaçla çalışmada amplifiye edilerek ve saflaştırılan ürünlerin sekans analizi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen diziler, Gen Bankasındaki dizi analizleriyle karşılaştırılmış ve tür seviyesinde tanıları yapılarak GenBank numaraları alınmıştır (Çizelge 4.11).

Çizelge 4.11. Sera çalışmasında kullanılan bakteriyel izolatların tanı sonuçları

İzolat	Tanı Sonucu	Genbank Numarası	Baz Uzunluğu	Benzerlik Yüzdesi
FDG 48	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	MN967174	885(bç) ¹	%98,84
RK 570A	<i>Bacillus cereus</i>	MN967299	319 (bç)	%92,45
RK 1977	<i>Aneurinibacillus migulanus</i>	MN967173	910 (bç)	%99,42
RK 1978	<i>Bacillus subtilis</i>	MN967135	325 (bç)	%97,49
RK 1986	<i>Bacillus mojavensis</i>	MN967303	916 (bç)	%99,54
1B	<i>Rhizobium radiobacter</i>	MN967438	909 (bç)	%85,38

1: baz çifti

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Sert ve yumuşak çekirdekli meyveler dünya çapında geniş bir alanı kaplar ve üretimi yönüyle de büyük paya sahiptir. Dünya genelinde meyve yetiştiriciliği konusunda yaşanan en büyük zorluklardan biri bitki hastalıklarıdır. Sert ve yumuşak çekirdekli meyveleri etkileyen tüm patojenler arasında *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*), kaliteli fidan yetiştiriciliğini sınırlayan, mücadelesi zor olan ve moleküler bitki patojeni bakteriler arasında ilk on içerisinde yer alan önemli bitki patojenlerinden biridir. *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*)'in tüm dünyaya yayılmış olması, bitki savunma sistemine karşı etkin bir mekanizmaya ve eşsiz genetik kolonizasyon patolojisine (Ti plazmit) sahip olması hastalığın kontrolünü zorlaştırmıştır. Etmene karşı kültürel ve kimyasal mücadelenin yetersiz kalmasından dolayı alternatif, çevre ve insan sağlığına dost mücadele yöntemi olan biyolojik mücadele yöntemi önem kazanmıştır.

Biyolojik mücadele üzerine yapılan bu tez çalışmasında; beş adet potansiyel patojen *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*) izolatu ve toplam 2012 adet potansiyel biyoajan bakteri izolatu kullanılmıştır. Patojen bakteri izolatları arasından en virulent olanı havuç dilimi, kabak meyvesi ve GF 677 anacında patojen olmasıyla seçilmiştir (Çizelge 4.1). En virulent patojene karşı 2012 adet potansiyel biyoajan bakteri katı besiyerinde ve katı besiyerinde antibiyozis ve hiperparazitik ilk beş izolat patojene karşı sıvı besiyerinde test edilmiştir. Katı besiyerinde 106 adet potansiyel biyoajan bakteri az veya çok etkili bulunmuş ve 66 tanesi antibiyozis etki, 40 tanesi hiperparazitik etki göstermiştir (Çizelge 4.4). Patojen ve biyoajan bakterilerin sıvı besiyerinde test edilmesi sonucu antibiyozis etkiye sahip bazı biyoajanların patojen miktarına göre daha fazla olduğu görülmüştür (Çizelge 4.5). 106 adet potansiyel biyoajan bakterinin biyokimyasal ve fizyolojik özelliklerine bakılmıştır (Çizelge 4.4). Etkili olan 106 adet potansiyel biyoajan bakteri ile yarı *in vivo* denemeler (havuç dilimleri ve kabak meyvesinde) kurulmuş ve pektolitik aktivite gösteren izolatların yumuşama ve çürümelere neden olduğu gözlenmiştir. Pektolitik aktivite göstermeyen sekiz adet biyoajan bakteri havuç dilimi ve kabak meyvesinde (yarı *in vivo*) test edilmiş ve RK 1986 ile RK 570A izolatları etkili bulunmuştur (Çizelge 4.6). Fidanlarda kurulacak denemede en etkili beş

biyoajan bakteri izolatu yarı *in vivo* (RK 1986 ve RK 570A) ve *in vitro* koşullarda (katı ve sıvı besiyeri testleri) en etkili olan (FDG 48, RK 1977, RK 1978) izolatlar seçilmiş ve metabolit ile litik enzim üretimlerine bakılmıştır (Çizelge 4.8). Daha sonra bu biyoajan bakteriler sera koşullarında GF 677 anacında kök ve gövde uygulamaları olmak üzere test edilmiştir. Kök uygulaması sonucu 1B+Nogall uygulaması en etkili olurken, onu 1B+RK 1978 uygulaması takip etmiştir. Gövde uygulaması sonucu en düşük ur çapı 1B+RK 1978 uygulamasında görölmüştür (Çizelge 4.9). Denemenin sonunda uygulamalardan alınan kök ve gövde örneklerinin bitki savunma sisteminde rol oynayan antioksidan enzim aktivitetlerine bakılmış (Çizelge 4.10). Uygulamalar arasında farklılıklar gözlenmiş ve kontrole göre enzim miktarlarında (SOD, POD, APX) artış gözlenmiştir.

Çalışmamızın ilk aşamasında farklı *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*) izolatlarının patojenite yetenekleri araştırılmıştır. Patojenite testi, bir bitki hastalığının etiyolojik ajanlarından şüphelenilen bakterilerin tanımlanması için ana kriterdir. Kontrollü koşullarda yarı *in vivo* veya sera koşullarında uygun konukçuların yapay enfeksiyonunu takiben lezyonların çoğalmasını içerir (Mushin *et al.* 1958). *Agrobacterium* cinsine ait çoğu türün konukçu çevresi geniştir. Ancak son zamanlarda, bazı strainlerin Ti plazmidine dayanan çok yüksek konukçu spesifikliği sergilediği bilinmektedir (Knauf *et al.* 1982). Ayrıca Owens and Cress (1985)'de soya fasulyesinin farklı genotiplerinde yaptıkları testler sonucu farklı *Agrobacterium* suşlarının ur oluşumunda değişkenlik sergileyebileceğini göstermişlerdir. Bunun bitki yaşı, çevresel faktörler ve hormonal duruma bağlı olarak değişebileceğini ve ur oluşumunda bu faktörlerin anahtar rol oynadığını bildirmişlerdir. Anderson and Moore (1979)'da *Agrobacterium* cinsine ait farklı izolatların virölanslığını test etmek için 11 farklı bitki kullanmışlar ve her bir izolatın farklı konukçularda patojen olduğunu gözlemlemişlerdir. Bu farklılıkların konukçu duyarlılığı, patojenin virölanslık derecesi veya ikisinin etkileşimi arasındaki farklılıklardan kaynaklanabileceğini belirtmişlerdir. Ayrıca geniş bir konukçu aralığına sahip *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*) izolatının bütün bitkilerde ur oluşumuna neden olamayacağı Deng and Nester (1998) tarafından bildirilmiştir.

Deng and Nester (1998)'de *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*)'in farklı izolatlarının konukçu aralığını ur oluşumuna göre değerlendirmişler ancak bazı monokotiledonların dahil olduğu bazı bitkilerin T-DNA transferine izin vermelerine rağmen ur oluşumuna tepki vermediğini bildirmişlerdir. Bu durum ile Jarchow *et al.* (1991)'de karşılaşmış ve bu bitkileri sessiz konukçular (silent hosts) olarak tanımlamıştır. Teorik olarak, ur oluşumunun gerçekleşmemesinin sebeplerinin zayıf bakteriyel büyüme, yara yerinde bakterinin hayatta kalamaması, bitkilerde bakteriyel bağlanma için vir geni indükleyicilerinin veya reseptörlerinin eksikliği veya T-DNA transferinde hatalı vir genlerinden kaynaklanabilmektedir. Ayrıca, T-DNA'nın bitkiye entegrasyonunun başarısız olması, T-DNA genlerinin tam bir setinin olmaması veya T-DNA genlerinin zayıf veya aşırı ekspresyonu nedeniyle ur oluşumunun indüklenemeyebileceği bilinmektedir. Bitkiler T-DNA geninin ekspresyonuna, fitohormonların düzeylerine ve etkilerinde farklı tepki verebilmektedir. Bunun sebebi her bitkinin hormon seviyelerindeki değişikliklere karşı duyarlılığının farklı olmasındandır. *Agrobacterium* cinsi, türe ve bazen de suşa özgü konukçu spesifikliği sergilemektedir. Bu spesifiklik, biyokimya ve fizyolojideki farklılıkların yanı sıra konukçuların anatomisindeki farklılıklar nedeniyle de olabilir. Ek olarak, farklı gelişim aşamalarındaki bitkiler de *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*) enfeksiyonuna farklı tepkiler verebilmektedir (Deng and Nester 1998). Çalışmanın amaçlarından ilki olan beş farklı *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*) izolatından en virülant olanın belirlenmesi amacıyla havuç dilimi, kabak meyvesi, kalonşe yaprak testi, ayçiçeği ve domates fideleri ile anaçlarda yapılan patojenite test sonucu izolatların bütün test bitkilerinde ur oluşumuna neden olmadığı yani izolatların patojenite yeteneklerinde farklılıklar olduğu gözlenmiştir (Çizelge 4.1). Patojenite testinde kullandığımız bitkiler, *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*)'in patojenitesinde yaygın olarak kullanılan bitkilerdir (Burr *et al.* 1995). İzolatların patojenite testinde bazı test bitkilerinde ur oluşumu gözlenirken bazılarında ur oluşumunun gözlenmemesi konukçular arasında patojenite açısından farklılıklar olduğunu göstermiştir. Yapılan literatür taramasıyla bir izolatın bütün bitkilerde patojen olabileceği konusunda bir kuralın bulunmadığı, yukarıda açıklanan durumlarla farklılıklar gösterebileceği tespit edilmiştir. Patojenite test bitkileri arasında en belirgin ve en hızlı sonucu kabak meyvesi (15 gün) daha sonra havuç diliminden (30 gün) elde edilmiştir. Böylece patojenite testinde kabak meyvesi ve havuç dilimi kullanımının

uygun olduğu sonucuna varılmıştır (Şekil 4.1). Tolba and Soliman (2013)'de *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*) patojenine karşı biyoajan uygulamalarını kabak meyvesinde belirgin sonuçlar elde ettiğini bildirmiştir. Havuç dilimi testinde bitkinin kallus tabakası oluşturmamasından dolayı uygulamaların dikkatli bir şekilde takip edilmesi gerekli olduğu görülmüştür. Cook (1923)'de bu durumu kallus tabakası oluşumunun ur oluşumundan yavaş olması sebebiyle ayırt edilebileceğini belirtmiştir. *Agrobacterium* cinsine ait izolatların patojenite testinde yaygın olarak havuç dilim testi yapılırsa da kallus oluşumundan dolayı bazı araştırmacılar tarafından test bitkisi olarak tercih edilmediği de bilinmektedir (Burr and Katz 1982). Otten *et al.* (2008)'de urların kambiyum hücrelerinin bölünmesinden kaynaklandığını belirtmiştir. Islam *et al.* (2010)'da Bangladeş'te farklı dikotiledon bitkilerden izole ettikleri *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*) izolatlarını havuç dilimi testiyle tanımlamışlardır. Abdellatif *et al.* (2013)'de 300 adet *Agrobacterium* spp. izolatını havuç dilimlerinde test etmişler ve sadece %16'sının yüksek oranda ur oluşturduğunu, %36'sının açıkça ayırt edilemeyen ur oluşumunu indüklediğini (+) ve geri kalanının (%48) ur oluşturmadığını tespit etmiştir. Burr ve Katz (1983) ile Argun (2001) tarafından yapılan çalışmalarda urlu dokulardan izole edilen *Agrobacterium* izolatlarının hepsinin ayçiçeği ve asmada bazılarının ise ek olarak domateste ur oluşturduğunu belirlemişlerdir. Küsek (2007)'de yaptığı çalışmada *A. vitis* patojenitesinde domates, kalonşe ve asma test bitkilerini kullanmış ve bazı izolatların kalonşe ile asmada ur oluşumuna neden olurken domateste ur oluşumuna neden olmadığını gözlemlemiştir. Yüzbaşıoğlu (2014)'de urlu dokulardan elde ettiği *Agrobacterium* cinsine ait 138 izolatın patojenite testlerinde bazı izolatların hiçbir indikatör bitkide patojen olmadığını sadece izole edildiği bitkide patojen olduğunu; bazı izolatların bütün indikatör bitkilerde patojen olduğunu geri kalan izolatların ise bir veya iki indikatör bitkide patojen olduğunu gözlemlemiştir. Bu sonuçlar ile tez çalışması kapsamında kullanılan patojen izolatların tüm test bitkilerinde patojen olamayabileceği sonucunu destekler niteliktedir. Ayrıca *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*) izolatlarının patojenite çalışmalarında tek bir indikatör bitki değil birden fazla bitkinin bir arada kullanılmasının gerekli olduğu ortaya konulmuştur. Tez çalışması kapsamında *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*) izolatlarının fidanlarda gövde uygulamalarında ur oluşumu gözlemlenirken, kök uygulamalarında ur oluşumu gözlemlenememiştir (Şekil 4.1). Yapılan literatür taramalarında uygulamaların gövde üzerinde yara açmak suretiyle

yapıldığı ve gövdede ur oluşumunun kök uygulamasına göre hızlı ve gözle görülebilir sonuçların elde edilebildiği bildirilmektedir. Patojenite testinde kök uygulamasının daldırma usulüyle (10 dk) yapılması ve köklere yeterli inokulumun bulaşmamasından, daha uzun süre bitkilerin bekletilmesinin veya kök ve gövdenin aynı ölçüde ur oluşumuna cevap verememesinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Aşırı duyarlılık reaksiyonu (HR), mikrobiyal patojenler tarafından oluşan enfeksiyonun yayılmasını önlemek için bitkiler tarafından kullanılan bir mekanizmadır. HR, enfeksiyon bölgesindeki hücrelerin hızlı ölümü ile karakterizedir. HR, patojenin büyümesini ve bitkinin diğer kısımlarına yayılmasını kısıtlar. Kado and Crosa (1994)'de *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*)'in tütün yapraklarında hafif bir kloroza neden olduğunu belirlemişlerdir. Çalışmada kullanılan potansiyel patojen izolatların sadece filtrasyon yapılan bölgelerde kloroza neden oldukları görülmüş ve elde edilen sonuçlar ile literatür taramasının örtüştüğü tespit edilmiştir (Şekil 4.2).

Tümörijenik *Agrobacterium* türlerinin sınıflandırılmasında biyokimyasal ve fizyolojik özellikler uzun yıllardır en faydalı özellikler arasında yer almaktadır (Moore *et al.* 2001). *Agrobacterium* cinsinde yer alan *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*), *R. vitis* (*A. vitis*) ve *R. rhizogenes* (*A. rhizogenes*) türlerinin ayrımında laktozdan 3-ketolaktoz en çok kullanılan testlerden biridir. Diğer kullanılan testler aynı cinse ait suşlar için farklı sonuçlar verebilmekte ve bazı durumlarda farklı taksonlara ait suşlar için aynı sonuçlar verebilmektedir (Puławska *et al.* 2016). Bunun en önemli nedeni ise, çoğunlukla farklı karbon kaynaklarının bakterinin metabolizmasında kullanmasından, yani opin metabolizmasından, kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu nedenle kök kanserine neden olan bakteriler için tek bir tanımlama sistemi olarak kullanılmaması gerektiği bildirilmiştir. Biyokimyasal ve fizyolojik özelliklerden alınan sonuçlar incelendiğinde *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*)'e ait beş farklı izolat arasında farklılıklar olduğu görülmüştür. *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*) izolatları laktozdan 3-ketolaktoz üretimi pozitif olarak (%80 ve üzeri pozitif) literatürde belirtilirken çalışmada kullanılan izolatlardan dördü (1A, 1B, 2A ve 2B) negatif olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.2). Araştırmacılar yaptıkları çalışmalarda *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*) izolatlarının 3-

ketolaktoz üretimi testinin negatif olabileceğini de belirtmişlerdir (De ley *et al.* 1966; Lippincott and Lippincott 1969a; Kerr 1969). Demir amonyum sitrat kullanımı ve sitrat kullanım testlerinin sonuçlarına göre de izolatlar arasında farklılıklar olduğu tespit edilmiştir. Referans sonuçlarla yapılan kıyaslamada %80 oranında pozitif sonuç verdiği bilirse de izolatlar arasında farklılık olabileceği belirtilmiştir (Moore *et al.* 2001). Peluso *et al.* (2003)'de *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*) biovarlarının biyokimyasal ve moleküler olarak incelendiği çalışmalarında bazı strainlerin biyokimyasal ve fizyolojik test sonuçlarından biovar ayırımına gidemediklerini, bu strainlerin ancak moleküler olarak kesin tanının yapılabileceğini tespit etmişlerdir. Pulawska (2010)'da bu farklılıkların ur veya saçak kök oluşturan *Agrobacterium* izolatları arasında yaygın görülen bir durum olduğunu bildirmiştir. Benzer durumdan Canik (2013)'de asmadan izole ettiği *R. vitis* izolatlarının biyokimyasal ve fizyolojik testlerden pek çoğunda farklı sonuçlar verdiğini ortaya koymuştur. Bu tez çalışması kapsamında yapılan moleküler tanı sonucu farklılık gösteren ve en virülen izolat olan 1B'nin *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*) olduğu doğrulanmıştır (Çizelge 4.11).

Tez çalışmasının ana hedeflerinden biri olan biyolojik mücadele, bitki hastalıkları ile mücadelede yetersiz kalınması sonucu ortaya çıkmış alternatif bir yöntem olması, çevre ve insan sağlığına olumsuz etkilerinin bulunmaması gibi yönleriyle büyük önem arz etmektedir. Mikroorganizma kültür koleksiyonundaki potansiyel biyoajan bakteriler ilk önce katı besiyerinde en virulent patojen izolat olan 1B'ye karşı test edilmiştir. Etkili olan biyoajan bakterilerin farklı mekanizmaları kullanarak patojenin gelişimini önleyebileceği bilinmektedir. Bu çalışmada potansiyel biyoajan bakterilerin antibiyozis ve hiperparazitizm özellikleri incelenmiştir. Etkili olan 106 adet biyoajan bakteri izolatının ait olduğu cinsler: *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Brevibacillus*, *Paenibacillus*, *Pantoea*, *Arthrobacter*, *Chrysobacterium*, *Alcaligenes*, *Aeromonas*, *Serratia*, *Yersinia*, *Brevibacterium*, *Curtobacterium*, *Vibrio*, *Pseudomalteromonas*, *Achromobacter*, *Kurthia*, *Plesiomonas*, *Variovorax*, *Duganella*, *Photorhabdus*, *Hafnia*, *Sphingomonas*, *Stenotrophomonas*, *Zobellia*'dır (Çizelge 4.4). Etkili olan izolatlardan 66 adedi antibiyozis, 40 adedi hiperparazitik etkiye sahip olduğu *in vitro* testler ile ortaya konulmuştur. Etkili olan izolatlar arasında aynı türün farklı izolatları arasında etki

mekanizması ve etkililik oranlarında farklılıklar gözlenmiştir. RK 593 (*B. cereus*) hiperparazitik etki gösterirken RK 834 (*B. cereus*) antibiyozis etki göstermiştir. RK 546 (*B. subtilis*) 16,5 mm zon oluştururken, RK 506 (*B. subtilis*) 6 mm zon oluşturduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.3). Bu durumun türlerin sahip olduğu biyokimyasal ve fizyolojik özelliklerinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Farklı araştırmacılar aynı türe ait bakteri izolatları arasında antagonistik ve bitki gelişimini uyarıcı aktiviteleri arasındaki farklılıklar olabileceğini ve bu durumun daha önce yapılan birçok benzer çalışmada da bildirildiği gibi antagonist bakteri izolatların epifitik veya endofitik oluşu, yetiştiği ortamlardaki bitki besin madde içeriği ve patojenlerinin bulunuş durumu gibi özelliklerin izolatların genetik çeşitliliğine etkide bulunmasından kaynaklanabileceğini bildirmişlerdir (Bernal *et al.* 2002; Araujo *et al.* 2005; Aktan 2018).

Kök kanseri hastalığına karşı *R. radiobacter* (*A. radiobacter*) K-84 ve K-1026 izolatları yaklaşık 40 yıldır etkili bir şekilde hastalıkla mücadelede kullanılmaktadır. Son yıllarda *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*)'e karşı *R. radiobacter* (*A. radiobacter*) K-84 dışında bakteriyel antagonistlerle biyolojik mücadele çalışmalarında başarılı sonuçlar elde edildiği görülmektedir (Dandurishvili *et al.* 2010; Gupta *et al.* 2010; Tolba and Soliman 2013). Etkili olan cinsler arasında *Bacillus*, *Curtobacterium*, *Pseudomonas* ve *Serratia* cislerine ait türler yer almaktadır. Etkili olan izolatlara bakıldığında en çok izolata sahip cinsin *Bacillus* cinsi olduğu görülmüştür. Bu durum *Bacillus* spp. her yerde bulunabilen, kolonizasyon yeteneği yüksek, endospor oluşturabilen, litik enzim-lipopeptid-antibiyotik üretmeleri, ticari olarak üretilen fermente gıdalarda kullanılabilmelerinden kaynaklanmaktadır (Jiang *et al.* 2001; Zhang and Dou 2002; Schallmeyer *et al.* 2004; Yang *et al.* 2006; Hardoim *et al.* 2008; Kotan *et al.* 2009; Arrebola *et al.* 2010; Tiwari and Thakur 2014). *In vitro* çalışmalarda en etkili hiperparazitik özellik gösteren RK 593 (*B. cereus*) izolatu domates öz nekrozuna karşı (*E. chrysanthemi* Ant 17a) karşı test edilmiş ve bu patojene karşıda bu biyoajanın hiperparazitik özellik gösterdiği belirlenmiştir (Aktaş 2015). Hassanein and El- Goorani (1991)'de yaptıkları çalışmada topraktan izole ettikleri beş adet *B. subtilis* izolatının *in vitro* olarak altı adet *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*) izolatına karşı antagonistik olduğunu bulmuşlar ve *in vivo* olarak Hint fasulyesinde yara yerlerine patojen ve biyoajanları uygulamışlar. Biyoajan

izolatların 50 gün sonunda kök kanserini kontrol edebildiğini tespit etmişlerdir. Denner and Gillanders (1996)'da ABD Gıda ve İlaç Dairesi'nin *B. subtilis*'i gıda işleme endüstrilerinde kullanımı için güvenli organizmalar arasında yer aldığını ve *B. subtilis*'in endosporik ve enzimatik ürünlerinin birçok fungal patojene karşı oldukça etkili olduğunu bildirmişlerdir. Dandurishvili *et al.* (2010)'da *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*) ve *R. vitis* (*A. vitis*) patojen izolatlarına karşı *S. plymuthica* IC1270, *P. fluorescens* Q8r1-96 ve *P. fluorescens* B-4117 biyoajan bakterilerini *in vitro* ve *in vivo* koşullarda domates bitkisinde test etmişler ve *in vitro* koşullarda antagonist etkiye sahip olup inhibisyon zonu oluşturduğunu, *in vivo* koşullarda ise domates bitkisinde ur oluşumunu engellediklerini tespit etmişlerdir. Araştırmacılar bu antagonistik etkinin biyoajan bakterilerin ürettiği oldukları geniş spektrumlu antibiyotiklerden (2,4-diacetylphloroglucinol, pyrrolnitrin) kaynaklandığını tespit etmişlerdir (Kalbe *et al.* 1996; Raaijmakers and Weller 2001; Ovadis *et al.* 2004). Aynı araştırmacılar bu antagonist mikroorganizmaları daha önce farklı bitki patojenlerine karşı test ettiklerini ve etkili sonuç aldıklarını da bildirmişlerdir. Kamoun *et al.* (2011)'de *B. thuringiensis*'den Bacthuricin F103 adlı yeni bir bakteriyosin izole etmişler ve domates ile bağlarda sorun oluşturan *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*)'e karşı (C58 ve B6) antimikrobiyal aktivitesi olup olmadığını test etmişler ve bulgulara göre Bacthuricin F103'ün kök kanserinin biyolojik kontrolünde kullanılabileceğini tespit etmişlerdir. Ghazal *et al.* (2013)'de *Rhizoctonia solani*, *F. solani* ve *S. rolfsii*, kök çürüklüğüne neden olan fungal patojenlere karşı *B. mycoides* ve *B. subtilis* izolatlarını biyoajan olarak kullanmışlar ve fungal patojenlerin gelişimini engellemişlerdir. Araştırmacılar bu izolatların ürettiği oldukları sekonder metabolitler (kitinaz, selüloz ve proteaz gibi) yardımıyla hastalıkların gelişimini engelleyerek biyokontrol ajan olabileceklerini ve bitki gelişimini uyaran moleküller (indol asetik asit, giberellik asit) salgılayarak biyofertilizer özelliklerinin olduğunu ortaya koymuşlardır. Çalışmamızın *in vitro* koşullarda biyoajan test sonuçlarıyla kıyaslandığında bu iki bakteri türünün farklı izolatlarının *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*)'ide engellediği görülmüş ve iyi bir biyoajan bakteri türü olabileceği düşünülmektedir. Limanska *et al.* (2015)'de *Lactobacillus* cinsine ait sekiz bakteri izolatını havuç bitkisinde test etmişler ve patojenin gelişimini %36,4-87,7 oranında engellediklerini tespit etmişlerdir. İnhibisyon etkisinin *Lactobacillus* türlerinin ürettiği organik asitlerin düşük pH değerinden

kaynaklandığını ortaya koymuşlardır. Murugi (2015)'de Kenya'da gül bitkisinde kök kanserine karşı *R. radiobacter* (*A. radiobacter*), mısır yağı ve bakır oksiklorür (Curavit), bakır hidroksit (Kocide) kullanmışlar ve hastalığın engellenme durumuna bakmışlardır. Kimyasal ilaç kullanımının kök kanserini tamamiyle engelleyemediğini, geçici bir tedavi yöntemi olduğunu, *R. radiobacter* (*A. radiobacter*)'in hastalığın gelişimini engellediği ve farklı konsantrasyonlar uygulanarak daha iyi sonuçlar alınabileceğini belirlemişlerdir. Sharma *et al.* (2016)'da üç farklı *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*) izolatına karşı K-84 ve UHFBA-218 (*A. radiobacter*) antagonistlerinin üretmiş oldukları bakteriyosini *in vitro* koşullarda farklı pH değerlerinde patojenin gelişimini engelleme yüzdelere bakılmış ve pH: 7 ve 25°C sıcaklıkta patojenin gelişimini engellediği belirlenmiştir. *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*) ile K-84 ve UHFBA-218 izolatlarını domates bitkisine yara yerlerine birlikte aynı anda verildiğinde ur oluşumunu azalttıkları da belirlenmiştir. Banerjee *et al.* (2018)'de *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*) ve *P. syringae*'ye karşı *B. cereus* IB311B' i arazi koşullarında yer fıstığı ve susam bitkilerinde direkt bakteriyi uygulamışlar ve hastalık düzeyini azaltmasının yanında bitki başına verimi sırasıyla %20 ile 26 oranlarında arttırdığını gözlemlemişlerdir. Soylu ve Bozkurt (2019)'da elmada *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*)'e karşı *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Serratia* ve *Bacillus* cinslerine ait izolatları kullanmışlar ve izolatların 5-27,3 mm çapında arasında değişen engelleme zonu oluşturduklarını tespit etmişlerdir. En etkili buldukları üç *P. putida* izolatını havuç dilimlerinde test etmişler ve ur oluşumunu önemli düzeyde engellediğini gözlemlemişlerdir. Yapılan literatür taramalarında kök kanseri hastalığına karşı *R. radiobacter* dışında farklı cinslere ait biyoajan bakterilerin gerek *in vitro* veya yarı *in vivo* gerekse *in vivo* denemelerde biyoajan bakterilerin önemli düzeyde hastalığı baskılayabildiği ve bu tez çalışması kapsamında kullanılan bakteri cinsleri ile benzerlik göstermesi ve bunlar arasından etkili biyoajanların olması elde ettiğimiz sonuçların paralellik gösterdiği ortaya konulmuştur (Çizelge 4.3).

Katı besiyerinde en etkili olan antibiyozis ve hiperparazitik etkiye sahip ilk beş izolat sıvı besi ortamında eşit sayı ve hacimde (10^8 kob/ml) karıştırılarak patojene karşı test edilmiştir. Antagonistik özellik gösteren (FDG 48, RK 1250, RK 1978, RK 1986)

izolatlarının patojene göre sayıca daha fazla olduğu, hiperparazitik özelliğe sahip (RK 593, FDG 105, FDG 137, RK 587) izolatların patojenle birlikte yaşamaya devam ettiği ortaya konulmuştur (Çizelge 4.5). Bakterilerin besi ortamında davranış şekilleri sahip oldukları özelliklerine göre değişmektedir. Biyoajan olabilecek bakterilerin sahip olması gereken bir takım özellikler vardır. Bunlar; gelişimi boyunca yüksek popülasyonda yaşamlarını devam ettirebilmeli, olumsuz koşullara dayanıklı olmalı, geniş spektrumlu olmalı, biyolojik mücadele mekanizmalarından bir veya birkaçını (antibiyozis, hiperparazitizm, yer ve besin için rekabet, uyarılmış dayanıklılık) kullanabilmelidir (Bora ve Özaktan 1998). Sıvı besiyerinde test edilen biyoajan bakterilerin ilk karıştırıldığı anda patojen ve biyoajan sayısının birbirinden farklı olduğu görülmüştür. Biyoajan bakterinin sıvı besiyerine adapte olup sayısını arttırmaya başladığı ve patojenin gelişimini baskılamaya başladığı beşinci gün sonunda görülmüştür. Bu çalışmada en etkili antibiyozis ve hiperparazitik etki gösteren izolatların *Bacillus* cinsine ait türlerden oluştuğu bilinmektedir. Bu cinse ait türler içinde; endospor oluşturabilen türlerin (özellikle *B. subtilis*, *B. mojavensis*, *B. megaterium*, *B. thuringiensis*, *B. pumilis*, *B. cereus*) toprak ve yaprak patojenlerine karşı yüksek düzeylerde antagonistik etkinlikler gösterdiği, antimikrobiyal bileşikler sentezleyebildiği, litik enzim sentezledikleri bilinmektedir (Huang and Chen 2004; Araujo *et al.* 2005; Chung *et al.* 2008; Singh *et al.* 2008; Chaiarn *et al.* 2008; Gupta *et al.* 2006; Xiao *et al.* 2009; Senthilkumar *et al.* 2009; Kumar *et al.* 2012). Ayrıca Verschuere *et al.* (2000)'de bitki patojenlerine karşı kullanılan en önemli grubun *Bacillus* cinsi olduğunu belirtmişlerdir. Bu durum *Bacillus* türlerinin hızlı çoğalmaları, yüksek rekabet yetenekleri, olumsuz şartlara karşı dayanıklı olmaları, geniş spektrumlu olmaları, toksin, enzim veya uçucu bileşikler gibi metabolitler sentezleyerek dayanıklılık sistemini aktifleştirebilmelerinden dolayıdır (Frandsen and Schnurer 1994; Parke and Gurian-Sherman 2001; Compant *et al.* 2005). Bakterilerin gelişim eğrisi düşünüldüğünde onuncu günün sonunda antibiyozis etki gösteren izolatların sayısı patojen sayısına göre fazla olduğu görülmüştür. Beşinci güne göre miktarlarının azaldığı bununda ortamda taze besiyerinin kalmaması, ortaya çıkan metabolit artıklarından ya da biyoajan bakterinin belli bir konsantrasyonun altında aktivitesinde azalmanın olabileceği düşünülmektedir. Bu test kapsamında on günlük bir sayım periyodu yapılmış ancak patojen ve biyoajan arasındaki

ilişkiyi anlayabilmek için daha uzun süreli, bir sayımın daha faydalı olabileceği düşünülmüştür (Şekil 4.5).

Biyoajan bakteriler (epifitik veya endofitik) bitki patojenlerinin gelişimini doğrudan engellemede; azot fikse etme, bitkinin alabileceği formlarda olmayan bitki besin elementlerinin bitkinin alabileceği formlara dönüştürme, siderofor üretimi, karbon kaynağı açısından rekabet ve bitkisel hormonların teşvik edilmesi gibi mekanizmaları kullanırlar. Bitki gelişimini uyarıcı bakteri türlerinin hastalık gelişimini dolaylı olarak engellemede ise; biyoajan bakteriler tarafından üretilen HCN, amonyak (NH_3), uçucu antimikrobiyal etkili bileşiklerin üretilmesi, litik enzimlerin (glukanaz, kitinaz, proteaz, selüloz) üretilmesi ve bitkilerde dayanıklılık genlerinin uyarılarak bitki patojenlerine karşı dayanıklılığın teşvik edilmesi gibi mekanizmaları kullandıkları farklı araştırmacılar tarafından belirlenmiştir (Weller 1988; Lugtenberg and Kamilova 2009; Tariq *et al.* 2014). Çalışma kapsamında 106 adet biyoajan bakteri izolatının azot fiksasyonu tespiti ve fosforu çözme yetenekleri araştırılmıştır. Fosfat çözme yetenekleri bakımından yetmişiki izolat NBRIP-BPB besiyerinde renk açılması meydana getirmiş, doksaniki izolat da kuvvetli ya da zayıf azot fikse etme yeteneğine sahip olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.4). Bu zamana kadar yapılan birçok çalışmada hem bitki gelişimini uyarıcı hem de biyolojik mücadele ajanı olarak hastalıkları önleyen bu kök bakterileri ile ilgili yapılan çalışmalar incelendiğinde bitki gelişimini uyarıcı kök bakterilerinin genelde: *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Paenibacillus*, *Arthobacter*, *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Comamonas*, *Hydrogenophaga*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes variovorax*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Klebsiella*, *Xanthomonas*, *Serratia*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azospirillum*, *Azotobacter* gibi cinslerde yer aldığı görülmektedir. N_2 atmosferin en önemli bileşenidir ve nükleik asit, protein gibi kimyasal bileşiklerin temel yapı taşıdır. Ancak N_2 biyolojik sistem tarafından direkt olarak kullanılamaz. Simbiyotik azot fiksasyonunda belli mikroorganizmalar ile bitki kökleri arasında simbiyotik (baklagiller ile nodül oluşturan *Rhizobium*) bir ilişki vardır. Simbiyotik olmayan biyolojik azot bağlama yeteneğine sahip toprakta serbest yaşayan *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Clostridium*, *Anabaena* cinslerine ait birçok mikroorganizma vardır. Bitki gelişimi için azottan sonra en önemli besin kaynaklarından biri fosfordur. Fosfor

topraklarda yeterince bulunmasına rağmen çözünmemiş formda bulunmasından dolayı az bir miktarı ($\sim 0,1$) bitkiler tarafından alınabilir formdadır. Bitkinin ihtiyaç duyduğu fosfat gübrelerle desteklense de bu işlemi toprakta bulunan bir kısım kök bakterileri sahip oldukları fosfataz enzimi ile topraktaki bu kullanılamayan fosforu çözerek bitkiler tarafından alınabilir forma dönüştürür. Bu şekilde de verimde artışlar meydana gelir. Kök bakterilerinin fosfor çözünürlülüğü üzerine olan etkileri daha çok toprak pH'sı üzerine olan etkilerinden kaynaklanmaktadır. Kök bakterilerinin salgılamış oldukları glukonik asit, sitrik asit gibi organik asitler ve H^+ pompalanması sonucu toprak pH'sı etkilenecek fosfor bitkiler tarafından alınabilir forma dönüşür (Seshadri *et al.* 2000; Antoun 2003). En iyi fosfat çözücü kök bakterileri arasında *Pseudomonas*, *Bacillus* ve *Rhizobium* cinsleri yer almaktadır (Antoun 2003). De Freitas *et al.* (1997) *B. megaterium*, *B. sphaericus* ve *B. polymyxa* uygulanarak yaptıkları çalışmalarda, bu bakterilerin ortamda bulunan fosfatı çözerek bitki boyu ve ağırlığının arttığını bildirmişlerdir. Gökce ve Kotan (2016)'da buğdayda patojen olan *Bipolaris sorokiniana*'ya karşı etkili *Bacillus* cinsine ait izolatları etkili bulmuşlar ve hastalığın gelişiminin baskılanmasının yanında buğday bitkisinde vejetatif aksamdaki elde edilen olumlu etkilerin bir kısmının bakterilerin hormonal aktivitenin yanısıra azot fiksasyonu ve fosfat çözebilme özelliklerinden kaynaklandığını bildirmişlerdir. Mohammadi (2018)'de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'e karşı *B. pumilus* ve *B. velezensis* izolatlarını etkili bulmuş ve domates bitkisinde farklı oranlarda büyümeyi teşvik ettiğini tespit etmiştir. *In vitro*'da etkili olan ve azot fikse etme ile fosfor çözme yeteneklerinin araştırıldığı bu çalışmada yer alan cinslerin benzer olduğu ve literatür ile benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir.

In vitro koşullarda antagonist mikroorganizma ile patojen direkt karşı karşıya kalıp farklı etki mekanizmalarını kullanarak patojeni baskılayabilirken, doğal koşullarda ise her zaman aynı etkiyi gösteremediği için biyolojik mücadele çalışmalarında birçok araştırmacı *in vitro*'da etkili olan izolatların *in vivo*'ya aktarılacak etkililik oranlarının belirlenmesinin önemli olduğunu vurgulamışlardır (Inam-ul-Haq *et al.* 2003; Horuz 2014). Tez çalışması kapsamında yarı *in vivo* (havuç dilimi ve kabak meyvesi) denemeler kurulmuş ve *in vitro*'da etkili 106 adet biyoajan bakteri test edilmiştir. Bu

biyoajan bakteri izolatları arasından 98 izolatın pektolitik aktiviteye sahip olduğu belirlenmiş ve 8 izolat (RK 1986, RK 570A, RK 957, RK 1074, RK 1086, RK 1224, RK 1364, RK 1786) ile çalışmaya devam edilmiştir. Buna göre, havuç dilimi ve kabak meyvesindeki çalışmaların sonucunda 1B+RK 1986 uygulamasının en etkili olduğu ve onu 1B+RK 570A'nın takip ettiği tespit edilmiştir (Çizelge 4.6). Sıvı besiyerinde antibiyozis etki gösteren FDG 48, RK 1977, RK 1978 ile yarı *in vivo* testlerde etkili olan RK 1986 ile RK 570A izolatları *in vivo* olarak GF 677 anacında test edilmişlerdir. Seçilen beş biyoajan bakteride litik enzim (kitinaz, fitaz, amilaz, proteaz, selüloz) ve sekonder metabolit (HCN, IAA, salisilik asit ve siderefor) üretimleri araştırılmıştır. (Çizelge 4.7). IAA; hücre bölünmesi, kök gelişimi, bitkinin besin elementlerini almada bitkiye yardımcı olması gibi etkileri ile bilinmektedir. Fallik *et al.* (1989) PGPR'lar tarafından üretilen başlıca hormonun indol-3-asetik asit olduğunu bildirmişlerdir. Toprakta izole edilen mikroorganizmaların %80'inin IAA sentezleyebildiği (Patten and Glick 2002) ve bitkilerde birçok büyüme ile ilgili işlevlerde rol oynadığı tespit edilmiştir. Ayrıca, IAA bazı mikroorganizmalarda gen ekspresyonunda sinyal molekülü görevini yüklenmiş ve böylece bitki-rizobakteri ilişkisinde çok önemli bir rolü olduğu ortaya konmuştur (Dias *et al.* 2009; Taghavi *et al.* 2009). Çalışma kapsamında izolatların hepsinin IAA üretimi yaptıkları belirlenmiş ve bitki kök parametreleri tez kapsamında yer almasada gözlemsel olarak köklenmede kontrol uygulamasına göre farklılıklar gözlenmiştir. En yüksek IAA üreten izolat olan RK 1978 (*B. subtilis*), köklenmeyi teşvik edip, bitkinin toprağa yerleşmesini ve çevresinde bulunan su/besinden daha fazla faydalanmasını sağlayacaktır. Amaresan *et al.* (2012)'de domates ve biberden izole ettikleri endofit bakterileri siderofor üretimi, fosfat indirgeme aktivitesi ve IAA enzimini üretebilme yeteneklerini araştırmışlar ve *Ralstonia solanacearum*'a karşı antagonistik aktivitesini incelenmişlerdir. Çalışma sonucunda, izole edilen endofit bakterilerin *R. solanacearum*'un gelişimini engellediği; tüm izolatların siderofor ve IAA üretebildiği ve fosfatı indirgediğini belirlenmişlerdir. Ahmad *et al.* (2018)'de yaptıkları çalışmada *B. subtilis* bakteri uygulamasının kontrol uygulamasına göre %12-34 arasında değişen farklılıklara neden olduğu ve bunu üretmiş olduğu IAA'dan dolayı olabileceği tespit edilmiştir. Yapılan literatür taramasında *B. subtilis*'in biyolojik preparat (Rhapsody and Serenade) olarak kullanıldığında bilinmektedir. Hassanein and El-Goorani (1991)'de *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*)'in

in vitro ve *in vivo* şartlarda biyolojik mücadelesinde *B. subtilis*'i kullanmışlar ve hastalığın gelişimini baskıladığını gözlemlemişlerdir. *B. subtilis*'in antibiyotik üretmesi, ısıya ve kurutmaya toleranslı endosporlar oluşturması ve bitki büyümesini teşvik etme kabiliyeti, aday biyokontrol ajan olmasına ait özelliklerden dolayı olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada da etkili bulunan RK 1978 izolatı sekans sonucu *B. subtilis* olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.11). Bir diğer önem arz eden metabolit olan HCN üretimi; FDG 48, RK 570A ve RK 1977'de gözlenmiştir. Bu metabolit bitki patojenleri ile biyolojik mücadelede endofitik bakterilerin kullandığı önemli mekanizmalardan biridir (Blumer and Haas 2000). Uçucu bir sekonder metabolit olan HCN, *Pseudomonas* cinsinde yer alan türlerin hastalıkları baskılamada rol oynadığı farklı araştırmacılar tarafından tespit edilmiştir (Bagnasco *et al.* 1998; Rodriguez and Fraga 1999; Siddiqui 2006). Nandhini *et al.* (2012)'de 4 farklı biyoajan bakterinin *Pseudomonas* cinsine ait olanların yüksek miktarda HCN, siderefor ve salisilik asit ürettiğini, *Bacillus* cinsine ait olanların ise yüksek miktarda IAA ürettiğini ortaya koymuşlardır. Karthikadevi (2004)'de yaptığı çalışmada 5 *P. fluorescens* izolatının IAA yüksek miktarda ürettiğini ve fungal patojen olan *Macrophomina phaseolina* ile *R. solani*'nin miselyal gelişimini engellediğini ortaya koymuştur. Shakeel *et al.* (2015)'de *B. cereus* türüne ait iki izolatın tuzlu topraktan çinko fosfat ve çinko karbonattan çinkoyu alınabilir forma dönüştürdüklerini ve *Fusarium moniliforme* ve *Pyricularia oryzae*'nin gelişimini *in vitro* koşullarda inhibe ederek biyolojik mücadele ajanı olabileceğini ortaya koymuşlardır. Bu çalışmada kullanılan RK 570A izolatının moleküler tanı sonucunda *B. cereus* olduğu, yüksek düzeyde HCN ürettiği ve IAA ürettiği belirlenmiştir (Çizelge 4.7). Abd El-Rahman *et al.* (2019)'da yaptıkları çalışmada HCN üretimi yapabilen *P. japonica* strain NBRC 103040, *B. megaterium* strain CtST3.5, *Pseudomonas* sp. strain Gamma-81, *P. tolaasii* strain ATCC 33618, *P. chlororaphis* strain Lzh-T5, and *P. mosselii* strain CV25 izolatlarının *A. tumefaciens*'in gelişimini baskılayabildiğini ortaya koymuşlardır. *P. fluorescens* CHA0 izolatının HCN üretmesi yoluyla *Thielaviopsis basicola* fungusunun neden olduğu tütünde siyah kök çürüklüğü hastalığının baskılanmasında önemli bir rol oynadığı tespit edilmiştir (Voisard *et al.* 1981). Kaspar *et al.* (2019)'da *B. subtilis* türünün biyoaktif sekonder metabolit üretme yeteneklerinin çok olduğunu ve bu aktif maddelerin bitki hastalıklarını önleme ve biyosüpfektan madde olarak kullanılabileceğini bildirmişlerdir. Yine *Bacillus* cinsine ait *B. velezensis* izolatlarının

önemli sekonder metabolitler ürettiği tespit edilmiş (Palazzini *et al.* 2016; Ma *et al.* 2017) ve bu metabolitlerin çoğunun antibakteriyel özelliğe sahip olduğu, bakterinin diğer bakterilere karşı mücadele de antibakteriyel olarak kullanabileceği tespit edilmiştir (Palazzini *et al.* 2016). *Aneurinibacillus migulanus*'ın bitki büyümesini teşvik eden özelliklere sahip çoklu antimikrobiyal peptitler ürettiği, biyo-yüzey aktif madde özelliği, kitinaz geninin varlığı, biyoplastik üretimi ve pestisitlerin biyodegradasyonu gibi yararlı özelliklere sahip olduğu farklı araştırmacılar tarafından belirlenmiştir (Seddon *et al.* 1997, 2000; Jackson *et al.* 2000; Edwards and Seddon 2001; Belbahri *et al.* 2015; Alenezi *et al.* 2016). Çalışmamızda RK 1977 (*A. migulanus*) izolatımızın da HCN ve IAA üretimi yapması hastalığı baskılamada mekanizma olarak kullanabileceği düşünülmektedir (Çizelge 4.7). Diğer önemli iki metabolit olan salisilik asit ve siderefor üretme yetenekleri incelenmiş ancak hiçbir izolatın bu iki metaboliti üretmedikleri böylece biyoajan bakterilerin etki mekanizması olarak bu iki yolu kullanmadıkları belirlenmiştir.

Biyoajan bakterilerin bitki hastalıklarını engellemede dolaylı olarak kullandıkları mekanizmalardan bir diğeri olan litik enzim üretimi önemli bir kriterdir. Enzimler, rizobakteriler ve bitkiler için önemli biyokimyasal reaksiyonları katalize eder, atıkları parçalayarak toprağı stabilize ederler ve besinlerin geri dönüşümüne aracılık ederler (Vaughan and Malcolm 1985). Toprakta bulunan mevcut enzimler bitkilerden, hayvanlardan veya mikroorganizmalardan (bakteri veya fungus) kaynaklıdır. Toprakta bulunan tipik majör role sahip enzimler dehidrojenazlar, hidrojenazlar, oksidazlar, katalazlar, peroksidazlar, lipaz, fosfataz, nükleaz, fitaz, amilaz, selüloz, ksilanaz, proteaz'dır. Toprağın besin kalitesini iyileştirmek adına farklı enzim üretimlerine sahip olan mikroorganizmalarla desteklenerek toprak iyileştirilmeye çalışılır. Proteaz aktivitesi gösteren bir bakteri toprağı uygulanarak topraktaki protein yapıları bozunarak azot açığı çıkar ve böylece bitkinin beslenmesini geliştirmesi beklenir (Turan *et al.* 2017). Önemli bir enzim olan fitaz enzimi, fitik asidi hidrolize ederek organik fosfor kaynağını kullanılabilir inorganik fosfora çevirebilen bir enzimdir. Bakteriyel olarak üretilen fitazlar; 3-fitaz, 4-fitaz ve protein-tirozin fosfatazdır (Mijakovic *et al.* 2005). Bir diğer önemli enzim olan selüloz ise; bakteriler, funguslar ve özellikle nekrofilik mikroorganizmalar tarafından doğal olarak üretilen bir enzimdir ve selülozdaki (1-4)-

beta-D-glukozidik bağlarını hidrolize etmekten sorumludur yani dünyadaki en bol polimerin bozunmasında anahtar rol oynayan bir enzimdir (Robson and Chambliss 1989). Çalışmanın sera kısmında kullanılan biyoajan bakteriler içinde kitinaz, fitaz, amilaz, proteaz, selülaz enzimlerine bakılmış ve bütün izolatların kitinaz, fitaz, proteaz ve selülaz enzimi ürettiği, amilaz enzimini ise RK 570A hariç bütün izolatların ürettiği tespit edilmiştir. Biyoajan bakterilerin ürettiği oldukları enzimler aracılığıyla *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*)'in gelişimini baskılayabildikleri düşünülmektedir. Antagonistik özellik gösteren bakteri izolatlarının (*Pseudomonas*, *Bacillus*, *Serratia*, *Pantoea* türleri) *in vitro* ve *in vivo* koşullarda göstermiş olduğu patojen gelişimini engellemede kullandıkları mekanizmalar üzerine farklı çalışmalar yapılmış bu mekanizmalardan başta proteaz, kitinaz, glukanaaz, selülaz gibi litik enzimler olmak üzere, antibiyotikler, fenolikler, siderofor, HCN, IAA gibi bileşiklerin sorumlu olduğu bildirilmiştir (Hallmann *et al.* 1997; Tabarraei *et al.* 2011). Yapılan literatür taramasında ülkemizde *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*)'in biyolojik mücadelesinde kullanılan ve etkili bulunan biyoajan bakterilerin patojenin gelişimini önlemede kullandıkları mekanizmalar konusunda yapılmış bir çalışma olmamasından dolayı bu çalışmanın ilk olduğu düşünülmektedir.

Bitkilerin dayanıklılık mekanizmaları sistemik kazanılmış dayanıklılık (SAR) veya uyarılmış sistemik dayanıklılık (ISR) olarak adlandırılır. SAR patojen enfeksiyonunu takiben üretilen ve tipik olarak pathogenesis ile ilgili (PR) proteinlerin ekspresiyon'una yol açan bir bileşik olan salisilik asit (SA) tarafından aracılık edilmektedir. PR proteinleri istila olmuş hücreleri eritmek için doğrudan iş görebilen, enfeksiyonlara dayanıklılık için hücre duvarlarını takviye eden veya lokal hücre ölümünü uyarabilen bazı enzimleri içerir. ISR ise önce uyarılmış sistemik dayanıklılık olarak açıklanmış, bazı patojenik olmayan rizobakterilerle uygulamayı takiben bitkilerde üretilen jasmonik asit (JA) veya etilen ile aracılık edilir. İlginç olan, SA ve JA'ya bağlı savunmalar mutual olarak antagonistik olabilir ve bazı bakteriyel patojenler SAR'ı yenmek için bu durumdan yararlanırlar (Bicici 2011). Birçok mikroorganizma farklı enzimler üretebilir ve bu enzimlerin ekspresyonu salgılanması doğrudan bitki patojenlerinin aktivitelerin baskılanması ile sonuçlanabilir. Kitin, fitopatogenik fungusların hücre duvarında

bulunmaktadır. Kitinolitik bakterilerin, antifungal özelliklerinin kitinaz β -1-3-glukanaz ve proteaz gibi litik enzimlerle beraber etkili olduğu yapılan çalışmada tespit edilmiştir (De Boer *et al.* 1999). Son yıllarda yapılan çalışmalarda da kitinaz ve protein içeren organik maddelerin kullanımının toprak mikroflorasını uyarıcı şekilde etki yaparak kök-ur nematodlarına karşı antagonistik etkiyi arttırdığı saptanmıştır (Siddiqui 2004). *P. lilacinus*'un kitinaz enzimine maruz bırakılması sonucu, *Meloidogyne* yumurtalarının larva çıkışında %60 azalma tespit edilmiştir (Khan *et al.* 2004). Khan and Tarannum (1999)'da *B. subtilis*, *B. thuringiensis*, *P. stutzeri* ve *P. lilacius*'un toprağa uygulanması ile *M. incognita* ile inokule edilmiş bitkilerde önemli derecede ürün artışı sağlandığını ve en çok ürün artışının *B. subtilis* uygulaması ile elde edildiğini tespit etmişlerdir. Ayrıca denemeler sonucunda *M. incognita* üremesi ve kökteki gal oluşumunun azaldığını gözlemlemişlerdir. Idris *et al.* (2002)'de toprak kökenli olan *B. amyloliquefaciens*'in hücre dışı bileşik fitatın biyolojik olarak parçalanmasına neden olabileceğini bildirmişlerdir. *B. amyloliquefaciens* FZB45 izolatının kültür filtratından maksimum fitaz aktivitesi elde edilmiş ve bu izolat mısır fidesinin büyümesini teşvik ettiği belirlenmiştir. *B. subtilis*, bir takım önemli yaprak, kök enfeksiyonu veya hasat sonrası fungal hastalıkların mücadelesinde antibiyotik ve antifungal enzimler üretmesinden dolayı etkili bir biyolojik kontrol ajanı olma potansiyeline sahiptir (Cawoy *et al.* 2011). *B. mojavensis*'in proteaz, selülaz, kitin N-asetil- β -hekzosaminidaz, kitosanaz, ksilanaz, pektinaz ve amilaz enzimlerini üretebildiği farklı araştırmacılar tarafından belirlenmiştir (Haddar *et al.* 2012; Youcef-Ali *et al.* 2014; Ghazala *et al.* 2016; Liaqat *et al.* 2018). Tez çalışmasında etkili olan izolatlardan RK 1986 izolatı moleküler tanı sonucu *B. mojavensis* olarak tanılanmış ve elde edilen bulguların örtüştüğü görülmüştür. Liu *et al.* (2011)'de *B. subtilis* SL-13 izolatının kitinaz enziminin *R. solani*'ye, Şenol (2014)'de *B. subtilis* (TV 125A) ve *P. fluorecens* (MF 1) biyoajan bakterilerinin *F. culmorum*'a karşı antifungal aktiviteye sahip olduklarını ve yüksek düzeyde kitinaz enzim aktivitesi gösterdiklerini belirlemiştir.

Sera denemesi sonucunda kök ve gövde uygulamaları sonucu 1B+RK 1978 uygulamasının biyopestisit olarak kullanılan Nogall uygulamasından sonra en etkili uygulama olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.9). Kullanılan GF 677 hassas bir anaçtır.

Lopez (1978)'de yaptıkları çalışmada en duyarlı meyve ağacı türlerinin; şeftali, badem, kiraz, elma ve zeytin olduğunu bildirmiştir. Ayrıca bazı şeftali, kiraz, elma ve armut anaçlarının kök kanserine duyarlılığı konusunda önemli farklılıklar görüldüğünü tespit etmişlerdir. Şeftali anaçları Missouri, GF 305 ve GF 677 ur oluşumuna bademden daha duyarlı olduğunu ve İspanya ile Fransa'da GF 305 ve GF 677 anaçlarının duyarlı olduğunu daha önce bildirmiştir. Rhouma *et al.* (2005)'de sert ve yumuşak çekirdekli meyve anaçlarının kök kanseri hastalığına karşı duyarlılık reaksiyonlarını belirlemek üzere üç yıldan daha fazla bir süre test etmişler ve *P. dulcis* ve *P. persica* genotiplerinin (bitter almond, Fasciuneddu, GF 677, GF 557) çok fazla hassas olduğunu tespit etmişlerdir. Benzer sonuçları birçok araştırmacı daha öncede tespit etmişlerdir (Zoina and Simeone 1989; Pierronnet and Salesses 1996; Zoina and Raio 1999). Horuz (2018)'de ülkemizde yaygın olarak kullanılan Garnem, Myrobolan, GF 677 anaçlarının kök kanserine karşı hassasiyetleri araştırılmış ve bütün anaçların hassas oldukları ancak duyarlılık düzeylerinde farklılıklar gözlemlendiklerini bildirmişlerdir. Çalışmamızda kullanılan GF 677 anacında hassas olduğu görülmüş ve diğer yapılan çalışmalarla benzer olduğu görülmüştür.

Bitkiler stressiz koşullar altında reaktif oksijen türleri (ROS) üretimi ve detoksifikasyonu arasındaki dengeyi kontrol etmek zorundadırlar (Apel and Hirt 2004). Düşük seviyelerde ROS; gelişme, abiyotik stres faktörlerine, patojenlere ve hücre ölümüne yanıt mekanizmalarında sinyal olarak görev alır (Miller *et al.* 2010). Optimal koşullar altında bile birçok metabolik yolda ROS üretilir. Bitkiler kendilerini oksidatif reaksiyonların olumsuz etkilerinden koruyan ve ROS süpürmede etkili sistemlere sahiptirler. Bu sistemin bir parçası olan antioksidan enzimler savunma mekanizmasının anahtar bir parçasıdır (Zhu *et al.* 2007). Bitkilerde stres faktörlerinin neden olduğu zarar; bitkinin türüne, tolerans ve adaptasyon kabiliyetine bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Madhova *et al.* 2005; Dubey 1994; Kadioğlu 2004). Bitkiler, biyotik streslere cevap veren bir dizi aktif savunma mekanizmasına sahiptir. Savunma sisteminde rol oynayan enzimler patojenisitede rol oynayan proteinleri uyararak dayanıklılığı teşvik edip hastalıkları baskı altına aldığı tespit edilmiştir (Rajendran *et al.* 2006). Enzim miktarlarındaki farklılıkların kullanılan biyoajan bakterinin savunma

sistemini aktifleştirmesinin zayıf veya güçlü olmasına bağlı olarak değişebileceği, *in vitro* ile *in vivo* uygulamalardaki başarıya bağlı olarak değişebilmesi ve bitkinin tüm aksamındaki enzim üretiminin aynı olamayacağından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bitkiler abiyotik ve biyotik faktörlerden kaynaklı stres koşullarında savunma sisteminde rol oynayan enzim miktarlarında farklılıklar olacağı farklı araştırmacılar tarafından belirlenmiştir (Dashtipour *et al.* 2017; Shams 2019). Kök ve gövde uygulamalarında kontrole göre SOD aktivitesinin genelde arttığı görülmektedir. Bu bitkinin strese bir cevabı olarak değerlendirilebilir. *B. cinerea* ile enfekte edilmiş domates bitkisinin yaprak peroksizomlarında reaktif oksijen türevlerinin meydana geldiği ve bunların antioksidan aktivite değişimleri ile detoksifiye edildiği saptanmıştır. Yapılan araştırmalar sonucunda SOD enzim aktivitesinde artış olduğu belirlenmiştir (Kuzniak and Sklodowska 2005). *F. oxysporium* f. sp. *ciceris* ile enfekteli nohut bitkisinin gövdelerinde patojen enfeksiyonundan sonra SOD enzim aktivitesinde artış belirlenmiştir (Limonas *et al.* 2002). Kang (2008) yaptığı çalışmada, *Sphaerotheca fuliginea pollacci* ile enfekte edilen hıyar fidelerinin yapraklarında inokulasyon süresindeki artışa bağlı olarak hastalanma şiddetinin de artmasıyla SOD aktivitesinin arttığını belirtmiştir. Başka bir çalışmada ise *E. amylovora* ile enfekte olmuş elma çeşitlerinde (Breaburn, Gala, Golden, Skarlet) kontrol ile kıyaslandığında zamana bağlı olarak SOD aktivitesinde azalma olduğu belirtilmiştir (Karacif 2012). SOD enziminin streslerin tipine ve derecesine göre bir davranış sergilediği görülmektedir. Çalışmamızda elde edilen bulgulara göre süpersoksit radikalının süpürülerek SOD enzim miktarında artışlar gözlemlenmiş ve literatürdeki bilgilerle sonuçların örtüştüğü belirlenmiştir (Çizelge 4.10). H₂O₂, kloroplastlardaki peroksidazlar (POD) tarafından substrat olarak kullanılır ve POD'larla hücrelerden süpürülür. Peroksidazların bu süpürücü görevinin dışında büyüme gelişme ve lignifikasyonda da görevi vardır (Asada and Takashi 1987). POD aktivitesi üzerine yapılan çalışmalarda stres şartlarındaki bitkilerde genelde aktivitenin arttığı rapor edilmiştir. Bu çalışmada H₂O₂ içeriği araştırılmamış ancak POD aktivitesinde görülen artışın hücrelerde H₂O₂ seviyesinin içsel değişiminde de artışa sebep olduğu düşünülmektedir. Tkalec *et al.* (2012)'de *K. daigremontiana* bitkisinin yapraklarını *A. tumefaciens* ile enfekte etmiş ve G-POD, P-POD, CAT enzim düzeylerinde önemli miktarda artışlar olduğunu tespit etmiştir. Ur dokusunda artan POD aktivitesinin büyüme ve hücre duvarı oluşumundaki rollerinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Ayrıca, hücre duvarında POD aracılı çapraz bağlama reaksiyonları hücre duvarlarının güçlendirilmesine yol açabilir, böylece patojenin daha fazla yayılmasını önlemeye yardımcı olabilir (De Gara *et al.* 2003; Ralph *et al.* 2004). Jang *et al.* (2004) *Pectobacterium chrysanthemi* ile enfeksiyondan sonra POD aktivitesini ve tatlı patates içindeki POD genlerinin ekspresyonunu incelemişlerdir. Bakteriyel enfeksiyondan sonra artan POD aktivitesi ve birkaç POD geninin indüksiyonu ortaya çıkarmışlar. CAT, bitkide stres nedeniyle ortaya çıkan H_2O_2 'in süpürülmesinde görevli diğer antioksidan enzimlerden biridir (Antunes *et al.* 2002). Oksidatif stres toleransında diğer antioksidan enzimlerle birlikte anahtar rol oynar (Apel and Hirt 2004). H_2O_2 'yi de substrat olarak kullanır. Biyolojik stres koşullarında CAT aktivitesinde artış ve azalışlar olabileceği ile ilgili çalışmalar vardır (Małolepsza and Urbanek 2000; Kuzniak and Slodowska 2005; Patykowski 2006). Çalışmamızda kontrol uygulamasına göre CAT aktivitesinde artışlar gözlemlenmiştir (Çizelge 4.10). Elde ettiğimiz bulgularla benzer sonuçlar literatür ile desteklenmiştir. CAT enziminin farklı stres koşulları ve farklı bitkilerde değişik düzeylerde koruma sağladığı bilinmektedir. Kuzniak ve Slodowska (2005)'de yapılan çalışmada *B. cinerea* ile enfekte edilen domates bitkisinin yapraklarında CAT aktivitesinin kontrollere göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Mohammadi (2018)'de *C. michiganensis* subsp *michiganensis* POD, polifenol oksidaz (PPO), SOD ve CAT aktivitelerinin araştırılmış ve bakterilerin inokülasyonundan sonra yükseldiği tespit edilmiştir. Bir diğer önemli bir enzim olan APX bitkinin kloroplastında meydana gelen H_2O_2 'nin süpürülmesini ve kloroplastın oksidatif hasara karşı korunmasını sağlar. APX, askorbatı elektron vericisi olarak kullanarak H_2O_2 'i suya indirger (Demiral 2003). Çalışmamızda patojen ve patojen+biyoajan uygulamalarında APX aktivitesi kontrole göre önemli seviyede artırmıştır. Sadece patojen uygulaması ile patojen+biyoajan uygulaması kıyaslandığında farklılıklar gözlemlenmiştir (Çizelge 4.10). Bunun sebebinin ise APX ile benzer işlev gören CAT ve POD enzimlerinin çok fazla aktifleştirilmesi nedeniyle APX'in aktivitesinin yükselmesine ihtiyaç duyulmamış olabilir. Bu varsayım, Scebba *et al.* (1999) tarafından da desteklenmektedir. Ayrıca stres altında APX aktivitesinin, birçok bitki türü ve hatta aynı türün iki çeşidi arasında bile oldukça değişkenlik olabileceğini göstermektedir. Tepkinin derecesi, stresin yoğunluğuna ve süresine bağlı olduğu kadar bitki türüne, gelişim dönemine ve metabolik durumuna bağlı da olabilmektedir (Karakuş 2016). Ayrıca bitkinin farklı

dokularında farklı miktarda antioksidan enzim bulunduğunu göstermiştir. Çalışmamızda kök ve gövde uygulamaları arasında enzim miktarları ve düzeylerinde farklılıklar gözlemlenmiştir (Çizelge 4.10). Rais *et al.* (2017)'de yaptıkları çalışmada genç yapraktaki antioksidan enzim miktarının bitki kökündeki enzim miktarına göre daha fazla olduğunu belirlemişlerdir.

Bu tez çalışması kapsamında patojen izolatının gelişimini baskılayan biyoajan bakteri izolatlarının tanılarını moleküler olarak desteklemek amacıyla yapılan sekans sonucu RK 1986 *B. mojavensis*; FDG 48 *B. amyloliquefaciens*; RK 570A *B. cereus*; RK 1977 *A. migulanus*; RK 1978 *B. subtilis*; 1B *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*) olarak tanımlanmıştır. Çalışmanın moleküler tanı sonuçlarında MIS tanıları verilen izolatlarda; RK 570A *K. gibsonii*, FDG 48 *B. sphaericus* olarak tanımlanırken; moleküler olarak tanıları RK 570A *B. cereus*, FDG 48 ise *B. amyloliquefaciens*, RK 1977 *A. migulanus*, RK 1978 *B. subtilis*, RK 1986 *B. mojavensis* olarak tanımlanmıştır. RK 570A cins ve FDG 48 tür düzeyinde farklılık göstermiştir. MIS tanı sonucu ile moleküler tanı sonucunun her zaman birbirini destekler nitelikte olamayacağı araştırmacılar tarafından tespit edilmiştir. Sandle (2016)'da mikroorganizmaların tanısında biyokimyasal reaksiyonlara ve karbon kullanım (fenotipik karakterler) alışkanlıklarına güvenmenin, kesin tanılamamanın elde edilmesinde bazı dezavantajlar getirdiğini, genotipik tanı yöntemlerinin ise, mikroorganizmanın izolasyon ortamına veya büyüme özelliklerine bağlı olmadığını bildirmiştir. Yağ asiti metil ester analizinin de fenotipik karakterlerden biri olmasından dolayı kesin tanı olarak kabul edilemeyebileceği bilinmektedir. Bu çalışmada 16S rDNA gen bölgesine göre moleküler tanılama yapılmıştır. 16S rDNA bölgesi; bütün bakterilerde bulunması, fonksiyonel olarak korunmuş bir bölge olması, uygun büyüklükte (~1550 bp) ve üzerinde iyi korunmuş bölgeler içermesi, PZR primerleri oluşturulabilmesi, cins/tür düzeyinde ayırım sağlaması ve veritabanlarında yeterli sayıda bilgi olmasından dolayı kullanılmıştır. Ancak sadece bu bölgeye göre yapılan moleküler tanı sonucu da kesin bilgi olarak kullanılamamaktadır. 16S rDNA analizi; standart identifikasyon yöntemlerine alternatif olarak değil, fenotipik ve genotipik tanılama birlikte kullanılarak cins ve tür düzeyinde tanımlamalar yapılmalıdır. ABD Çevre Koruma Dairesi ticari olarak biyokontrol ajan olarak kullanılabilecek sekiz tür belirlemiştir. Bunlar; *B. subtilis* (Mishagi and Donndelinger 1990), *B. insolitus*, *B.*

pumilus (McInroy and Kloepper 1995), *P. polymyxa* (Shishido *et al.* 1999), *B. amyloliquefaciens* (Reva *et al.* 2002), *B. cereus* (Pleban *et al.* 1997), *B. megaterium* (McInroy and Kloepper 1995), and *B. licheniformis* (Cook *et al.* 1996). Çalışmada en etkili bulunan izolatlardan bazıları (RK 1978, FDG 48, RK 570A)'nın bu türlerden bazılarını içerdiği ve ileriki çalışmalarda ticari biyopreparat olarak ürüne dönüştürülebilme potansiyellerinin olabileceği düşünülmektedir.

R. radiobacter (*A. tumefaciens*)'in biyolojik mücadelesinde yeni biyoajan bakteriler bulmayı hedefleyen ve bu biyoajanların sahip olduğu önemli özellikleri ortaya çıkarmayı amaçlayan bu tez çalışmasında, elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

1. Çalışmaya tek bir patojen üzerinden devam edilebilmesi için elimizde bulunan beş farklı *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*) arasından en virülant olanın belirlenmesi amacıyla patojenite testleri yapılmış ve en virülant izolatın 1B olduğu bulunmuştur. Patojenite test sonucunda 1B izolatının havuç dilimi, kabak meyvesi ve GF 677 fidan anacında patojen olduğu, domates ve ayçiçeği fideleri, kalonşe yaprağında ve M9 ile MM106 elma anaçlarında patojen olmadığı görülmüştür.

2. Elimizdeki beş farklı potansiyel patojen izolatın tanılarını biyokimyasal ve fizyolojik testler ile destekleme amacıyla yapılan testler sonucu RK 473 izolatının referans sonuçlar ile benzer sonuçlar verdiği ancak diğer izolatların farklı testlerde referans sonuçlarla aynı veya farklı sonuçlar verdiği belirlenmiştir.

3. Kök kanseri hastalığı ile mücadelede kültürel ve kimyasal kullanımının etkisinin yetersiz kalması, uzun zamandır kullanılan ticari bir preparat olan Nogall kullanımında bazen etkili bir sonucun alınamaması alternatif biyoajan bakterilerin bulunmasını gündeme getirmiştir. Bu çalışmada hastalığın potansiyel biyoajan bakteriler ile mücadele olanakları *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar ile araştırılmıştır. *In vitro* çalışmalarda toplam 2012 adet izolat test edilerek sadece 106 izolatın antibiyozis ve hiperparazitik etkiye sahip olduğu belirlenmiştir.

4. Katı besi ortamında etkili olan antibiyozis ve hiperparazitik etkiye sahip ilk beş izolat patojene karşı sıvı besi ortamında da test edilmiş ve 5'er gün aralıklar ile 10. güne kadar bakteri sayımı yapılmıştır. Hiperparazitik etkiye sahip biyoajan bakteriler patojenle gelişmeye devam ederken antibiyozis etkiye sahip biyoajan bakterilerin sayısı patojene göre daha fazla sayıda olduğu görülmüştür. Bu sebeple antibiyozis etkiye sahip FDG 48, RK 1977, RK 1978, RK 1986 izolatları sera denemesinde seçilmiştir.

5. Etkili bulunan 106 adet biyoajan bakterinin biyokimyasal ve fizyolojik özelliklerini belirlemek amacıyla yapılan testler sonucu 98 izolatın pektolitik aktiviteye sahip olması yarı *in vivo* denemelerde sadece 8 izolatın kullanılabileceği görülmüştür. Bu izolatlar RK 570A, RK 957, RK 1074, RK 1086, RK 1224, RK 1364, RK 1786 ve RK 1986'dır.

6. Yarı *in vivo* denemelerde (havuç dilimi ve kabak meyvesi testi) en etkili olan izolat RK 1986 olurken onu RK 570A ve RK 1074 takip etmiştir. Sera denemesinde kullanılmak üzere RK 1986 ve RK 570A izolatlarında seçilmiştir. Serada kullanılacak bakteriler; FDG 48, RK 570A, RK 1977, RK 1978, RK 1986'dır.

7. Sera denemesinde kullanılacak bakterilerin hastalığı nasıl önleyebildiğini veya baskı altına alabildiğini açıklayabilmek amacıyla enzim ve sekonder metabolit üretip üretmediklerine bakılmıştır. Bütün izolatların kitinaz, fitaz, selüloz enzim aktivitelerinin olduğu, RK 570A'nın amilaz enzimi üretmediği, RK 1977'nin ise proteaz enzimi üretmediği ortaya konulmuştur. Sekonder metabolit olarak bütün izolatların az veya çok oranda IAA ürettiği, RK 1986 izolatı hariç bütün bakterilerin farklı düzeylerde HCN ürettiği ve hiçbir izolatın salisilik asit ve siderefor üretmediği belirlenmiştir.

8. Sera denemesinin sonucuna göre en etkili biyoajan izolat RK 1978 olmuştur.

9. Deneme tamamlandıktan sonra uygulama yapılan kök ve gövde örneklerinin antioksidan enzim (CAT, POD, SOD, APX) miktarlarına bakılmıştır. Kök ve gövde uygulamalarının enzim miktarlarında artışlar gözlenmiştir. Kök ve gövdedeki enzim miktarlarında farklılıklar olduğu belirlenmiştir.

10. Çalışmanın sera aşamasında kullanılan patojen ve biyoajan bakteriler sekansa gönderilmiş ve FDG 48 *B. amyloliquefaciens*; RK 570A *B. cereus*; RK 1977 *A. migulanus*; RK 1978 *B. subtilis*; RK 1986 *B. mojavensis*; 1B *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*) olarak tanımlanmıştır. Yapılan literatür taramasına göre bu iki izolatın [RK 1977 (*A. migulanus*) ve RK 1986 (*B. mojavensis*)] daha önce *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*)'e karşı kullanılmadığı, bu nedenle hem Dünyada hemde Türkiye'de bu çalışmanın ilk olduğu düşünülmektedir.

Bu çalışma kapsamında yukarıda özetlenen sonuçlar elde edilmiştir. Bu etmenle yapılacak diğer çalışmalara yol göstermesi amacıyla bundan sonra araştırılması önerilen başlıca konular ise aşağıda özetlenmiştir.

1. Yurt dışında yapılan bazı çalışmalarda etmenin, bazı familyaya ait bitkilerin bir çeşidinde ur oluşturduğu, bir diğer bitki çeşidinde ise hiç ur oluşumu gözlenmediği veya urların büyümediği saptanmıştır. Bu bilgilerden yola çıkılarak, ülkemiz için *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*)'e dayanıklı veya tolerant çeşitlerin geliştirilmesi çalışmaları yapılabilir.

2. Etkili bulunan biyoajan bakterilerin farklı anaçlarda test edilerek anaçlar arasındaki farklılıklar ortaya konulabilir.

3. Etkili bulunan bakteriler ile farklı kombinasyonlar oluşturulup hastalığı baskılamada daha etkili olup olmadığına bakılabilir.

4. Bu çalışmada etkili olan biyoajanların farklı anaçlarda da başarılı olması durumunda izolatların formülasyon haline getirilerek üretici koşullarında kullanım olanakları, rizosferde kök kolonizasyonu ve hayatta kalma kabiliyetlerinin belirlenmeleri gibi çalışmalar araştırılabilir. Bu izolatların doğrudan kullanılmasının yanı sıra hastalığı engellemede rol oynayan bileşiklerinin benzer amaç doğrultusunda kullanılmak üzere potansiyel yeni biyoaktif metabolit kaynakları olarak da değerlendirilebilir.

KAYNAKLAR

- Abd El-Rahman, A.F., Shaheen, A. H., Abd El-Aziz, R.M. and Ibrahim D.S.S., 2019. Influence of hydrogen cyanide-producing rhizobacteria in controlling the crown gall and root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. Egyptian Journal of Biological Pest Control, 229(41), 1-11.
- Abdallah, B.D., Tounsi, S., Gharsallah, H., Hammami A. and Gargouri, F.O., 2018. Lipopeptides from *Bacillus amyloliquefaciens* strain 32a as promising biocontrol compounds against the plant pathogen *Agrobacterium tumefaciens*. Environmental Science and Pollution Research, 25, 36518-36529.
- Abdellatif, E., Valentini, F., Janse, J.D., Bouri, M., Rhouma, A., Chebil, S. and D'Onghia, A.M., 2013. Occurrence of crown gall of the grapevine in Tunisia and characterization of Tunisian *Agrobacterium vitis* and *A. tumefaciens* strains. Journal of Plant Pathology, 95(1), 115-126.
- Aebi, H., 1984. Catalase *in vitro*. Method Enzymology, 105, 121-126.
- Agrios, G.N., 1997. Plant Pathology. 4th ed., Academic Press, Department of Plant Pathology University of Florida, Academic Press, 635p, USA.
- Ağaoğlu, Y.S., Çelik, H., Çelik, M., Fidan, Y., Gülşen, Y., Günay, A., Halloran, N., Köksal, A.İ., ve Yanmaz, R., 1997. Genel Bahçe Bitkileri, 4, T.C. A.Ü.Z.F. Eğitim, Araştırma ve Geliştirme Vakfı Yayınları, Ankara.
- Ahmad, M., Ahmad, I., Hilger, T.H., Nadeem, S.M., Akhtar, M.F., Jamil, M., Hussain, A. and Zahi, Z.A., 2018. Preliminary study on phosphate solubilizing *Bacillus subtilis* strain Q3 and *Paenibacillus* sp. strain Q6 for improving cotton growth under alkaline conditions. PeerJ 6:e5122. <https://doi.org/10.7717/peerj.5122>.
- Aktan, Z.C. 2018. Badem Ağaçlarında Sorun Olan Toprak Kökenli Fungal Patojenlerine Karşı Antagonist ve Bitki Gelişimini Teşvik Eden Bakterilerin *In Vitro* Etkinliklerinin Belirlenmesi. Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Yüksek lisans Tezi, 102s.
- 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, Erzurum, 61s.
- Albert, W., Bakker, A.W. and Schippers, B., 1987. Microbial cyanide production in the rhizosphere in relation to potato yield reduction and *Pseudomonas* mediated plant growth stimulation. Soil Biology and Biochemistry, 19(4), 451-457.
- Alconero, R., 1980. Crown gall of peaches from Maryland, South Carolina and Tennessee and problems with biological control. Plant Disease, 64, 835-838.
- Alenezi, F.N., Rekik, I., Bełka, M., Ibrahim, A.F., Luptakova, L., Jaspars, M., Woodward, S. and Belbahri, L., 2016. Strain-level diversity of secondary metabolism in the biocontrol species *Aneurinibacillus migulanus*. Microbiology Research, 182, 116-124.
- Ali, A.A. and Alqurainy, F., 2006. Activities of antioxidants in plants under environmental stress. In the Lutein-Prevention and Treatment for Age-related Diseases, Noboru Motohashi. Transworld Research Network, India, 187-256.
- Alippi, A.M., Lopez, A.C. and Wolcan, S.M., 2006. Germalton wax as a new host for *Agrobacterium tumefaciens* in Argentina. Plant Disease, 827-830.

- Alvarez-Martinez, C.E. and Christie, P.J., 2000. Biological diversity of prokaryotic type IV secretion systems. *Microbiology and Molecular Biology Review*, 73, 775-808.
- Amaresan, N., Jayakumar, V., Kumar, K. and Thajuddin, N., 2012. Endophytic bacteria from tomato and chilli, their diversity and antagonistic potential against *Ralstonia solanacearum*. *Phytopathology Plant Protection*, 45, 344-355.
- Amberg, H.O., 1991. Crown galls and winter injury. *Journal of American Wine Society* 23, 127-128.
- Anand, V.K. and Heberlein, G.T., 1977. Crown gall tumorigenesis in potato tuber tissue. *American Journal of Botany*, 64(2), 153-158.
- Anderson, A.R., 1977. Taxonomy and Host Specificity of The Genus *Agrobacterium*. Ph.D. Thesis, Oregon State University, USA, 58p.
- Anderson, A.R. and Moore, M., 1979. Host spesificity in the genus *Agrobacterium*. *The American Phytopathogenic Society*, 69(4), 320-323.
- Andrea, P. and Heribert, H., 2010. New insights into an old story: *Agrobacterium*-induced tumor formation in plants by plant transformation. *The EMBO Journal*, 29(6), 1021-1103.
- Anonim, 2008. Zirai mücadele teknik talimatları. Zirai Mücadele Araştırma Enstitüsü, Ankara, 4, 63-68.
- Anonim, 2009. T.C. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı zirai karantina yönetmeliği.
- Anonymous, 2000. Commercial biocontrol products for use against soilborne crop disease. On-Line: www.barc.usda.gov (10.05.2018).
- Antoun, H., 2003. Field and greenhouse trials performed with phosphate solubilizing bacteria and fungi. <http://www.webcd.usal.es/web/psm/abstracts/antoun.htm> (10.01.2019).
- Antunes, F., Han, D. and Cadenas, E., 2002. Relative contributions of heart mitochondria glutathione peroxidase and catalase to H₂O₂ detoxification in *in vivo* conditions. *Free Radical Biology and Medical*, 33, 1260.
- Apel, K., and Hirt H., 2004. Reactive oxygen species; metabolism, oxidative stress, and signal transduction, *Annual Reviews Plant Biology*, 55, 373-399.
- Araujo, F.F., Henning, A.A. and Hungria, M., 2005. Phytohormones and antibiotics produced by *Bacillus subtilis* and their effects on seed pathogenic fungi and on soybean root development. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(8-9), 1639-1645.
- Argun, N., 2001. Orta Anadolu Bağlarında Taç Uru'na neden olan *Agrobacterium vitis*' in Bölgesel Dağılımı ve Bazı Biyolojik Özellikleri Üzerine Araştırmalar. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 84s.
- Ark, P.A. and Bingham, D.J., 1958. Response of pear and cherry rootstocks to streptomycin and tetracycline when applied to control crown gall. *Plant Disease Reporter*, 42, 673-674.
- Ark, P.A. and Schroth, M.N., 1958. Use of slices of carrot and other fleshy roots to detect crown gall bacteria in soil. *Plant Disease Reporter*, 42, 1279-1281.
- Ark, P.A., 1941. Chemical eradication of crown gall on almond trees. *Phytopathology*, 31, 556-579.
- Ark, P.A., 1942. Control of crown gall of peach in the nursery. *Phytopathology*, 32, 826.

- Arrebola, E., Jacobs, R. and Korsten, L., 2010. IturinA is the principal inhibitor in the biocontrol activity of *Bacillus amyloliquefaciens* PPCB004 against postharvest fungal pathogens. *Journal of Applied Microbiology*, 108, 386-395.
- Asada, K. and Takahashi, M., 1987. Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis, Amsterdam: Elsevier/North Holland, Hotoinhibition, 227-287.
- Asghar, H.N., Zahir, Z.A., Arshad, M. and Khaliq, A., 2002. Relationship between *in vitro* production of auxins by rhizobacteria and their growth promoting activities in *Brassica juncea* L. *Biology and Fertility of Soils*, 35, 231-237.
- Atlas, R.M., 1995. *Handbook of Microbiological Media*. CRC Press, 1706p, Boca Raton.
- Aysan, Y. and Şahin, F., 2003. An outbreak of crown gall disease on rose caused by *Agrobacterium tumefaciens* in Turkey. *Plant Pathology*, 52(6), 780-783.
- Aysan, Y. and Şahin, F., Mirik, M., Dönmez, M.F. and Tekman, H., 2003. First report of crown gall of apricot (*Prunus armeniaca*) caused by *Agrobacterium tumefaciens* in Turkey. *Plant Pathology*, 52(6), 793-795.
- Baek, S.H., Hartsock, A. and Shple, J.P., 2008. *Agrobacterium tumefaciens* C58 uses ActR and FnrN to control nirK and nor expression. *Journal Bacteriology*, 190, 78-86.
- Bagnasco, P., De La Fuente, L., Gaultieri, G., Noya, F. and Arias, A. 1998. Fluorescent *Pseudomonas* spp. as biocontrol agents against forage legume root pathogenic fungi. *Soil Biology and Biochemistry*, 30, 1317-1323.
- Banci, L., 1997. Structural properties of peroxidase. *Johor Biotechnology and Biodiversity Corporation*, 53, 253-263.
- Banerjee, G., Gorthi, S. and Chattopadhyay, P., 2018. Beneficial effects of biocontrolling agent *Bacillus cereus* IB311 on the agricultural crop production and its biomass optimization through response surface methodology. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*, 90(2), 2149-2159.
- Banfield, W.M., 1934. Life history of crown gall organism in relation to its pathogenesis on the red raspberry. *Journal of Agricultural Research*, 48, 761.
- Bargabus, R.L., Zidack, N.K., Sherwood, J.E. and Jacobsen, B.J., 2002. Characterisation of systematic resistance in sugarbeet elicited by non-pathogenic, phyllosphere colonizing *Bacillus mycoides*, biological control. *Physiology and Molecular Plant Pathology*, 61, 289-298.
- Bazzi, C. and Mazzucchi, U., 1978. Biological control of crown gall in cherry, myrobalan and peach rootstocks in Italy. *Proceedings of Vth International Conference on Plant Pathogenic Bacteria*, Angers, France.
- Beijersbergen, A., Smith, S.J. and Hooykaas, P.J.J., 1994. Localization and topology of VirB proteins of *Agrobacterium tumefaciens*. *Plasmid*, 32, 212-218.
- Belbahri, L., Alenezi, F.N., Luptakova, L., Rateb, M.E. and Woodward, S., 2015. Complete genome sequence of *Aneurinibacillus migulanus* E1, a gramicidin S- and D-phenylalanyl-L-propyl diketopiperazine-deficient mutant. *Genome Announcement*, 3, 441-415.
- Benjama, A., Redwane, A., Gadda, M., Edraoui, L., Ouzrit, M. Boussad, L. Eoard, R. and Nesme, X., 2002. First results on biological control with strains K84 and K1026 of *Agrobacterium radiobacter* var. *tumefaciens* causing crown gall on fruit trees and rose in Morocco. *Bulletin OEPP*, 32(3), 309-314.

- Benjama, A., Redwane, A., Nesme, X., El-Gadda, M., El-Medraoui, L., Mourabit, K., Aaglane, A. and Al-Mai, S., 2001. Simple and rapid biochemical tests to characterize *Agrobacterium* causing crown gall of stone fruits and rose. *Al-Awamia*, 103, 83-90.
- Bergey, D.H., Harrison, F.C., Breed, R.S., Hammer, B.W. and Huntoon, F.M., 1923. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 1st Edn., Baltimore, MD: Williams and Wilkins, Co.
- 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), 11.
- Beveridge, T.J., 2001. Use of the gram stain in microbiology. *Biotechnic and Histochemistry*, 76(3), 111-118.
- Bicici, M., 2011. Bitki hastalık etmenleri ile biyolojik mücadelenin başarısını arttırmada mikoriza'nın rolü. *Türkiye Biyolojik Mücadele Dergisi*, 2(2), 139-174.
- Blanchard, F.A., 1951. Aueromycin chemotherapy of crown gall in tomatoes. *Phytopathology*, 41, 954-958.
- Bora, T. ve Özaktan, H., 1998. Bitki Hastalıklarıyla Biyolojik Savaş. Prizma Matbaası, 205 s İzmir.
- Bouzar, H., Daouzli, N., Krimi, Z., Alim, A. and Khemici, E., 1991. Crown gall incidence in plant nurseries of Algeria characteristics of *Agrobacterium tumefaciens* strains, and biological control of strains sensitive and resistant to agrocin 84. *Agronomie EDP Sciences*, 11(10), 901-908.
- Bouzar, H., Moore, L.W. and Schaad, N.W., 1983. Crown gall of pecan: a survey of *Agrobacterium* strains and potential for biological control in Georgia. *Plant Disease*, 67(3), 310-312.
- Bozkurt I.A. and 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), 349-361.
- Bozkurt, I.A. ve Soylu, S., 2011. Hatay ili elma bahçelerinde *Agrobacterium tumefaciens*'in neden olduğu kök kanseri hastalığının belirlenmesi. *Türkiye 4. Bitki Koruma Kongresi*, Kahramanmaraş.
- Braun, A.C. and Laskaris, T., 1942. Tumour formation by attenuated crown gall bacteria in the presence of gall promoting substances. *Proceeding of National Academic Science*, 28, 468-477.
- Braun, A.C. and Mandle, R.J., 1948. Studies on inactivation of the tumour inducing principle in crown gall. *Growth*, 12, 255-269.
- Braun, A.C., 1958. A physiological basis for autonomous growth of the crown-gall tumor cell. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 44, 344-349.
- Braun, A.C., 1982. A history of the crown gall problem. In: Kahl and Schell JS (eds) *Molecular Biology of Plant Tumors*. Academic Press, 155-210p, New York.
- Bremer, H., 1948. *Türkiye Fitopatolojisi*. Tarım Bakanlığı Neşriyat Müdürlüğü I, 657, Ankara.
- Bremer, H., 1954. *Türkiye fitopatolojisi*. Bahçe Kùltürleri Hastalıkları. Ziraat Vekâleti Neşriyat ve Haberleşme Müdürlüğü, T15, Ankara.

- Buchanan, R.E., Holt, J.G. and Lessel, E.F, 1966. Index Bergeyana-an annotated alphabetical listing of names of taxa of the bacteria. Baltimore: Williams and Wilkins.
- Bullard, G.K., 1988. Biocare Technology Pty Ltd., Somersby, Australia, Pers, Comm.
- Bunkelmann, J.R. and Trelease, R.N., 1996. Ascorbate peroxidase :A prominent membrane protein in oilseed glyoxysomes. *Plant Physiology*, 110, 589-598.
- Burr, T.J. and Katz, B.H., 1983. Isolation of *Agrobacterium tumefaciens* Biovar 3 from Grapevine Galls and Sap and from Vineyard Soil. *Ecology and Epidemiology*, 73(2), 163-165.
- Burr, T.J., 2004. Grape crown gall biology and strategies control, New York State Agricultural Experiment Station, Cornell University, Foundation Plant Science FPS Grape Program Newsletter.
- Burr, T.J., Bazzi, C., Sule, S. and Otten, L., 1998. Crown gall of grape: biology of *Agrobacterium vitis* and the development of disease control strategies. *Plant Disease*, 82, 1288-1297.
- Burr, T.J., Reid, C.L., Tagliatti, E., Bazzi, C., 1995. Survival and tumorigenicity of *Agrobacterium vitis* in living and decaying grape roots and canes in soil. *Plant Disease*, 79, 677-682.
- Campillo, T., Lavire¹, C., Shams, M., Pothier J.F. and Pulawska, J., 2012. Detection and identification methods and new tests as developed and used in the framework of cost873 for bacteria pathogenic to stone fruits and nuts tumorigenic *Agrobacterium* spp. *Journal of Plant Pathology*, 94, 97-104.
- Canik Orel, D., 2013. Türkiye Bağ Alanlarında *Rhizobium vitis*'in Varlığı ve Bazı Genetik Özelliklerinin Belirlenmesi. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara, 104s.
- Carter, A., 1989. Decision Document: Order-Eubacteriales family-Enterobacteriaceae *Agrobacterium radiobacter* (Beijerinck and van Delden) Conn., 17.
- Cavara, F., 1897a. Eziologia di alcune malattie di piante cultivate. Le Stazioni Sperimentale Agraric Itliana, 30, 482-509.
- Cavara, F., 1897b. Tuberculosi della vite intorno alla eziologia di alcune malattie di piante cultivate. Le Stazioni Sperimentale Agraric Itliana, 30, 483-487.
- Caverzan, A., Passaia, G., Rosa,S.B., Ribeiro, C.W., Lazzarotto, F. and Margis-Pinheiro, M., 2012. Plant responses to stresses: Role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection. *Genetics and Molecular Biology*, 35(4), 1011-1019.
- Cawoy, H., Bettiol, W., Fickers, P. and Ongena, M., 2011. *Bacillus*-based biological control of plant diseases. In: Stoytcheva M (ed) Pesticides in the modern world-pesticides use and management. InTech, Rijeka, 274-302.
- Cazelles, O., Epard, S. and Simon, J.L., 1991. The effect of disinfection with oxyquinoline sulfate of the Berl. X Rip. 5C rootstock on the expression of crown gall in grape propagation. *Revue Suisse de Viticulture d'Arboricet d'Horticulture*, 23, 285-288.
- Chaiharn, M., Chunhaleuchanon, 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.
- Chaudiere, J. and Iliou, R.F., 1999. Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. *Food and Chemical Toxicology*, 37, 949-962.

- Chen, F., Guo, Y.B., Wang, J.H., Li, J.Y. and Wang, H.M., 2007. Biological control of grape crown gall by *Rahnella aquatilis* HX2. *Plant Disease*, 91, 957-963.
- Chet, I., Barak, Z. and Oppenheim, A., 1993. Genetic engineering of microorganisms for improved biocontrol activity. *Biotechnology in plant disease control*. John Wiley (ed), New York, USA.
- Chilton, M.D., Drummond, M.H., Merio, D.J., Sciaky, D., Montoya, A.L., Gordon, M.P. and Nester, E.W., 1977. Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis. *Cell*, 11, 263-271.
- Christie, P.J. and Gordon, J.E., 2014. The *Agrobacterium* Ti Plasmids. *Microbiology Spectrum*, 2(6), doi:10.1128/microbiolspec.
- 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.
- Clare, B.G., Kerr, A. and Jones, D.A., 1990. Characteristics of the nopaline catabolic plasmid in *Agrobacterium* strains K84 and K1026 used for biological control of crown gall disease. *Plasmid*, 23, 126-137.
- Clark, A.G., 1969. A selective medium for the isolation of *Agrobacterium* species. *Journal of Applied Bacteriology*, 32, 348-351.
- Collins, H. A., 2001. *Agrobacterium tumefaciens*. www.cals.ncsu.edu (13.05.2019).
- Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., and Barka, E.A., 2005. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied Environmental Microbiology*, 71, 4951-4959.
- Conn, H.J., 1942. Validity of the genus *Alcaligenes*. *Journal of Bacteriology*, 44, 353-360.
- Conner, A.J. and Dommissie, E.M., 1992. Monocotyledonous plants as hosts for *Agrobacterium*. *International Journal of Plant Science*, 153, 550-555.
- Cook, M.T., 1923. Early stages of crown gall. *Phytopathology*, 13, 476-482.
- Cook, R.J. and Baker, K.F., 1983. The nature and practice of biological control of plant pathogens. *APS Journals*, 539.
- Cook, R.J., Bruckart, W.L., Coulson, J.R., Goettel, M.S., Humber, R.A., Lumsden, R.D., Maddox, J.V., McManus, M.L., Moore, L., Meyer, S.F., Quimby, P.C. Jr, Stack, J.P. and Vaughn, J.L. 1996. Safety of microorganisms intended for pest and plant disease control: a framework for scientific evaluation. *Biological Control*, 7, 333-351.
- Cooksey, D.A. and Moore, L.W., 1980. Biological control of crown gall with fungal and bacterial antagonists. *Phytopathology*, 70(6), 506-509.
- Cooksey, D.A. and Moore, L.W., 1982. Biological control of crown gall with an agrocin mutant of *Agrobacterium radiobacter*. *Phytopathology*, 72, 919-921.
- Costechareyre, D., Rhouma, A., Lavire, P., Chapuliot D., Bertolla, F., Boubaker, A., Dassaux, Y. and Nesme, X., 2010. Rapid and efficient identification of *Agrobacterium* species by rec A allele analysis. *Microbial Ecology*, 60(4), 862-872.
- Crosse, J.E., Garrett, C.M.E., Martins, J.M.S. and Billing, E., 1976. Bacterial diseases. In: *Plant Pathology*, Crosse J E (ed), East Mailing Research Station Report, 107-110.

- Cubero, J., Vander Wolf, J., Van Beckhoven, J. and Lopez, M.M., 2002. An internal control for the diagnosis of crown gall by PCR. *Journal of Microbiological Methods*, 51, 387-392.
- Dandurishvili, N., Toklikishvili, N., Ovadis, M., Eliashvili, P., Giorgobiani, N., Keshelava, R., Tediashvili, M., Vainstein, A., Khmel, I., Szegedi, E. and Chernin, L., 2010. Broad-range antagonistic rhizobacteria *Pseudomonas fluorescens* and *Serratia plymuthica* suppress *Agrobacterium* crown gall tumours on tomato plants. *Journal of Applied Microbiology*, 110, 341-352.
- Dashtipour, S., Sahebani, N. and Aminian, H., 2017. Induction of resistance and changes of phenol and peroxidase in tomato plants treated with *Bacillus subtilis* and salicylic acid against *Fusarium* wilt and root-knot diseases. *Research in Plant Pathology*, 5(1), 47-58.
- Davies, J., 1994. Inactivation of antibiotics and dissemination of resistance genes. *Science*, 264, 375-382.
- De Boer, W., Gerards, S., Klein Gunnewiek, P.J.A. and Modderman, R., 1999. Response of the chitinolytic microbial community to chitin amendments of dune soils. 29, 170-177.
- De Cleene, D.M. and De Ley, J., 1976. The host range of crown gall. *The Botanical Review*, 42, 389-466.
- De Cleene, M., 1979. Crown gall: economic importance and control. *Zbl. Bakt. II. Abt.*, 134, 551-554.
- De Freitas, J.R., Banerjee, M.R., Germida, J.J., 1997. Phosphate solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola (*Brassica napus* L). *Biology and Fertility of Soils*, 24, 358-364.
- De Gara, L., De Pinto, M.C. and Tommasi, F., 2003. The antioxidant systems vis-à-vis reactive oxygen species during plant-pathogen interaction. *Plant Physiology and Biochemistry*, 41, 863-870.
- Deep, I.W. and Young, R.A., 1965. The role of pre-planting treatments with chemicals in increasing the incidence of crown gall. *Phytopathology*, 55, 212-216.
- Deep, I.W., 1958a. Crown gall chemotherapy with terramycin. *Plant Disease Reporter*, 42, 1210-1213.
- Deep, I.W., 1958b. Reduction in incidence of crown gall of Mazzard cherry following antibiotic treatments. *Plant Disease Reporter*, 42, 476-480.
- Deep, I.W., Ray, A., McNeilan, A. and Mac Swan, I.C., 1968. Soil fumigants tested for the control of crown gall. *Plant Disease Reporter*, 52, 102-105.
- Demiral, T., 2003. Genç Piriñ Fiderine Dışarıdan Glisin Betain Uygulamasıyla, Tuza Toleransının Arttırılmasında Antioksidant Enzim Aktivitelerinin Rolünün Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, İzmir, 72s.
- Deng, W. and Nester E.W., 1998. Determinants of host specificity of *Agrobacterium* and their function. Springer, 321-338.
- Denner, W. and Gillanders, T., 1996. The legislative aspects of the use of industrial enzymes in the manufacture of food and food ingredients. In: Godfrey T, Reichelt J, editors. *Industrial Enzymology*, 397-412, Stockton Press, New York.
- Dhanvantari, B.N., 1978. Characterization of *Agrobacterium* isolates from stone fruits in Ontario. *Canadian Journal of Botany*, 56(18), 2309-2311.
- Dhanvantari, B.N., 1976. Biological control of crown gall of peach in Southwestern Ontario. *Plant Disease Reporter*, 60(7), 549-551.

- Dias, A., Costa, F., Andreote, F., Lacava, P., Teixeira, M. and Assumpcao, L., 2009. Isolation of micropropagated strawberry endophytic bacteria and assessment of their potential for plant growth promotion. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 25, 189-195.
- Dickey, R.S., 1962. Efficacy of five fumigants for the control of *Agrobacterium tumefaciens* at various depths in the soil. *Plant Disease Reporter*, 46(2), 73-76.
- Donner, S.C., Jones, D.A., McClure, N.C., Rosewarne, G.M., Tate, M.E., Kerr, A., Fajardo, N.N. and Clare, B.G., 1993. Agrocin 434, a new plasmid encoded agrocin from the biocontrol *Agrobacterium* strains K-84 and K-1026, which inhibit biovar 2 *Agrobacteria*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 42, 185-194.
- Dubey, R.S., 1994. *Handbook of Plant and Crop Stress*. New York: Marcel Dekker, 227.
- Duggar, B.M., 1909. *Fungous diseases of plants*, Ginn and Co. Boston.
- Duman, Y., Karakus Yüzügüllü, Y., Sertel, A. and Polat, F., 2016. Production, purification, and characterization of a thermo-alkali stable and metal-tolerant carboxymethylcellulase from newly isolated *Bacillus methylotrophicus* Y37. *Turkish Journal of Chemistry*, 40, 802-815.
- Durgapal, J.C., 1971. A preliminary note on bacterial disease of temperate plants in India. *Indian Phytopathology*, 24, 379-382.
- Dye, D.W., 1968. A taxonomic study of the genus *Erwinia*. I. The *amylovora* group. *New Zealand Journal of Science*, 11, 590-607.
- Eastwell, K.C., Sholberg, P.L. and Sayler, R.J., 2006. Characterizing bacterial biocontrol agents for suppression of *Rhizobium vitis*, a casual agent crown gall disease grapevines. *Crop Protection*, 25, 1191-1200.
- Edwards, S.G. and Seddon, B., 2001. Mode of antagonism of *Brevibacillus brevis* against *Botrytis cinerea* *in vitro*. *Journal of Applied Microbiology*, 91, 652-659.
- El-Fiki, F. and Giles, K.L., 1981. *Agrobacterium tumefaciens* in agriculture and research. In: Giles KL and Atherley AG (eds) *Biology of the Rhizobiaceae* *International Review of Cytology*, 13, 47-58.
- Elliot, C., 1951. *Manual of Bacterial Plant Pathogens*. 2.Ed., Chronica Botanica Company, Valthan, Mass.
- Emmert, E.A. and Handelsman, J., 1999. Biocontrol of plant disease: a (gram-positive) perspective. *FEMS Microbiology Letters*, 171, 1-9.
- EPPO, 2019. European and Mediterranean Plant Protection Organization, www.eppo.org (13.05.2019).
- Erman, M., Kotan, R., Çakmakçı, R., Çığ, F., Karagöz, K. and Sezen, M., 2010. Effect of nitrogen fixing and phosphate-solubilizing *Rhizobacteria* isolated from Van Lake Basin on the growth and quality properties in wheat and sugar beet. IV. Organic Farming Symposium, Erzurum, Turkey.
- Escobar, M.A. and Dandekar, A.M., 2003. *Agrobacterium* as an agent of disease. *Trends Plant Science*, 8, 380-386.
- Essghaier, B., Fardeau, M.L., Cayol, J.L., Hajlaoui, M.R., Boudabous, A., Jijakli, H. and Sadfi-Zouaoui, N., 2009. Biological control of grey mould in strawberry fruits by halophilic bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 106, 833-846.
- Fabre, E. and Dunal, F., 1853. Observations sur les maladies régnantes de la vigne. *Bull. Soc. Cent. Agri. Dept. Hérault*. 40, 46.

- Faivre Amiot, A., Rouk, J. and Faivre, M.L., 1979. Biological control trial against crown gall using a non-pathogenic *Agrobacterium* strain: *Agrobacterium radiobacter* var. *radiobacter* (Kerr's strain 84). *Phytiatrie Phytopharmacie*, 28(4), 203-214.
- Falahian, F., Oraghi Ardebili, Z. and Fahimi, H., 2007. Effect of mycorrhizal fungi on some defence enzymes against *Gaeumannomyces graminis* in Wheat. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10(14), 2257-2266.
- Fallik, E., Okon, Y., Epistien, E., Goldman, A. and Fisher, M., 1989. Identification and quantification of IAA and IBA in *Azospirillum brasilense* inoculated maize roots. *Soil Biology and Biochemistry*, 21, 147-153.
- Farkas, E. and Haas, J.H., 1985. Biological control of crown gall in rose nursery stock. *Phytoparasitica*, 13, 121-127.
- Farrand, S.K. and Wang, C., 1992. Do we really understand crown gall control by *Agrobacterium radiobacter* strain K84? In: *Biological control of plant diseases*, Tjamos E S *et al.*(eds.), 287-293, Plenum Press, New York.
- Firmin, J.L. and Fenwick, R.G., 1978. Agropine: a major new plasmid determined metabolite in crown gall tumours. *Nature*, 276, 842-844.
- Fletcher, J., 1890. Black-knot of the grape. *Can. Ag. Exp. Farms*, 10, 87.
- Food and Agriculture Organization of the United States (FAO), www.faostat.org (13.05.2017).
- Foster, R.C., Rovira, A.D. and Cock, T.W., 1983. Ultrastructure of the root-soil interface. *American Phytopathology Society*, 157.
- Frandsberg, E. and Schnurer, J., 1994. Chitinolytic properties of *Bacillus pabuli* KI. *Journal of Applied Bacteriology*, 76(4), 361-367.
- Fridlender, M., Inbar, J. and Chet I., 1993. Biological control of soilborne plant pathogens by a β -1,3 glucanase producing *Pseudomonas cepacia*. *Soil Biology and Biochemistry*, 25, 1211-1221.
- Frugoli, J.A., McPeck, M.A., Thomas, T.L. and McClung, C.R., 1998. Intron loss and gain during evolution of the catalase gene family in angiosperms. *Genetics*, 149, 355-365.
- Garrett, C.M.E., 1987a. The effect of crown gall on growth of cherry trees. *Plant Pathology*, 36, 339-345.
- Garrett, C.M.E., 1987b. Problems of *Agrobacterium tumefaciens* in planting material and its control. *OEPP*, 17, 263-268.
- Garrett, C.M.E., Fletcher, D.A. and Trowell, S.D., 1984. Crown gall (*Agrobacterium tumefaciens*). In: *Report of East Mailing Research Station for 1983*. Maidstone, 95p, Kent, UK.
- Gechev, T.S., Breusegem, F.V., Stone, J.M., Denev, I. and Laloi, C., 2006. Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. *BioEssays*, 28, 1091-1101.
- Gelvin, S.B., 2000. *Agrobacterium* and plant genes involved in TDNA transfer and integration. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 51, 223-256.
- Gelvin, S.B., 2003. *Agrobacterium* mediated plant transformation: The biology behind the gene jockeying toll. *Microbiology and Molecular Biology Review*, 67, 16-37.

- Ghazal, F.M., Moussa, A.L., Fayed, A.S. and Mostfa A.A., 2013. The use of *Bacillus mycoides* and *Bacillus subtilis* as biocontrol agents for the fungi causing root rot disease in common bean. *Egyptian Journal of Biotechnology*, 44, 37-50.
- Ghazala, I., Haddar, A., Romdhane, M.B. and Ellouz-Chaanouni, S., 2016. Screening and molecular identification of new microbial strains for production of enzymes of biotechnological interest. *Brazilian Archea Biology Technology*, 59, 1-12.
- Gheysen, G., Villarroel, R. and Van Montagu, M., 1991. Illegitimate recombination in plants: a model for T-DNA integration. *Genes and Development*, 5, 287-297.
- Gill, S.S. and Tuteja, N., 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48, 909-930.
- Gloyer, W.O., 1934. Crown gall and hairy root of apples in nursery and orchard. New York Agricultural Experiment Station Bulletin, 638.
- Goldberg, N.P., 2000. Apple disease control. www.cahe.nmsu.edu, (05.05.2017)
- Goodman, R.N., Grimm, R. and Frank, M., 1993. The influence of grape rootstocks on the crown gall infection process and on tumor development, *American Journal of Enology and Viticulture*, 44, 22-26.
- Gorden, S.A. and Paleg, L.G., 1957. Quantitative measurement of indole acetic acid. *Physiological Plant Pathology*, 10, 347-348.
- Gökce, 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(1), 49-75.
- Göksel, N., 1953. Kök uru hastalığı ve mücadelesi. *Tarım Vekâleti Yayınları*, 16s.
- Grimm, R., 1987. Control of crown gall in Swiss apple nurseries. *OEPP*, 17(2), 269-272.
- Guemouri, L., Artur, Y., Herbeth, B., Jeandel, C., Cuny, G. and Siest, G., 1991. Biological variability of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase in blood. *Clinical Chemistry*, 37(11), 1932-1937.
- Gupta, A.K. and Kamal, B., 2006. Pre-planting application of soil sterilents and herbicides for management of crown gall disease on 'colt' cherry rootstock. *Indian Journal Agricultural Science*, 76, 426-429.
- Gupta, A.K. and Khosla, K. 2007. Integration of soil solarization and potential native antagonist for biological control of crown gall on cherry rootstock colt. *Scientia Horticulture*, 112, 51-57.
- Gupta, A.K., Kamal, B. and Khosla, K., 2005a. Effect of fertilizers, soil amendments and antibacterial compounds on the incidence of crown gall on cherry rootstock colt. *Journal of Mycology and Plant Pathology*, 35(2), 286-288.
- Gupta, A.K., Kamal, B. and Kumar, S., 2005b. Biovar characterization of *Agrobacterium tumefaciens* isolates from stone fruits and effect of crown gall disease on growth parameters on peach and cherry rootstock-Colt. *Indian Phytopathology*, 58(4), 486-488.
- Gupta, A.K., Khosla, K. and Bhardwaj, S.S., 2007. Biological control of crown gall of stone fruits. *Indian Phytopathology*, 61, 385.

- Gupta, A.K., Khosla, K., Bhardwaj, S.S., Thakur, A., Devi, S., Jarial, R.S., Sharma, C., Singh, K.P., Srivastava, D.K. and La, R., 2010. Biological control of crown gall on peach and cherry rootstock Colt by native *Agrobacterium radiobacter* isolates. *The Open Horticulture Journal*, 3, 1-10.
- Haas, J., H., Moore, L.W., Ream, W. and Manulis, S., 1995. Universal PCR primers for detection of phytopathogenic *Agrobacterium* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 2879-2884.
- Haddar, A., Etis, N. and Nasri, M., 2012. Novel complex organic substrates for cultivation of bacteria like *Bacillus mojavensis* A21, *African Journal of Microbiology Research*, 6(47), 7377-7382.
- Hallmann, J., Quadt-Hallmann, A., Mahaffee, W.F. and Kloepper, J.W., 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology*, 43, 895-914.
- Hamed, K., 2004. Response of some stone fruit rootstocks to crown gall disease in Jordan. *Dirasat-Agricultural Sciences*, 31(3), 289-295.
- Hamed, R.R., Maharem, T.M., Fatah, M.M.A and Ataya, F.S., 1998. Purification of peroxidase isoenzymes from turnip roots. *Phytochemistry*, 48(8), 1291-1294.
- Hammami, I., Rhouma, A., Jaouadi, B., Rebai, A. and Nesme, X., 2008. Optimization and biochemical characterization of a bacteriocin from a newly isolated *Bacillus subtilis* strain 14B for biocontrol of *Agrobacterium* spp. Strains. *Letters in Applied Microbiology*, 48, 253-260.
- Hammond-Kosack, K.E and Jones, J.D.G., 1996. Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell*, 8, 1773-1791.
- Hampton, J.E., 1948. Cure of crown gall with antibiotics. *Phytopathology*, 38, 11-12.
- Handelsam, J. and Stabb, E.V., 1996. Biocontrol of soilborne plant pathogens. *Plant Cell*, 8, 1855-1869.
- Hardoim, P.R., Van Overbeek, L.S. and Van Elsas, J.D., 2008. Properties bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends Microbiology*, 16, 463-471.
- Hassanein, F.M. and El- Goorani, M.A., 1991. The Effect of *Bacillus subtilis* on *in vitro* growth and pathogenicity of *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Phytopathology*, 133(3), 239-246.
- Hayman, G.T. and Farrand, S.K., 1988. Characterization and mapping of the agrocin opine agrocin84 locus on the nopaline Ti plasmid pTiC58. *Journal of Bacteriology*, 170, 1759- 1767.
- Hayward, A.C., 1964. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. *Journal of Applied Bacteriology*, 21, 265-277.
- Heath, J.D., Trevor, C., Eugene, C. and Nester, W., 1995. Ti plasmid and chromosomally encoded two-component systems important in plant cell transformation by *Agrobacterium* species. *American Society for Microbiology*, 23p, Washington.
- Hedgcock, G.G., 1910. Field studies of the crown gall of the grape. Washington, DC: U.S. Dept. Agr. Bureau of Plant Industry Bull., 183.
- Hendrickson, A.A., Baldwin, I.L. and Riker, A.J. 1934. Studies on certain physiological characters of *Phytomonas tumefaciens*, *Phytomonas rhizogenes* and *Phytomonas radiobacter*. *Journal of Bacteriology*, 28, 597-618.

- Hernandez; J.A., Olmos, E., Corpas, F.J., Sevilla, F. and Del-Rio, L.A., 1995. Salt induced oxidative stres in cloroplasts of pea plants. *Plant Science*, 105, 151-167.
- Horowitz, M. and Regev, Y., 1980. Mulching with plasstic sheets as a method of weed control, *Hassadeh*, 60, 395-399.
- Horuz, S., 2014. Karpuzda Bakteriyel Meyve Lekesi Hastalığı Etmeni *Acidovorax citrulli*'nin Tanısı, Moleküler Karakterizasyonu ve Bakteriyel Antagonistlerle Biyolojik Mücadelesi. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana, 203s.
- Horuz, S., Çağlar, K.B., Küsek, M. and Aysan, Y., 2018. Crown gall disease susceptibility of some stone fruit rootstocks in Turkey. *Journal of Agricultural Sciences*, 24, 439-444.
- Howell, A., Kalt, W., Duy, J.C., Forney, C.F. and McDonald, J.E., 2001. Horticultural factors affecting antioxidant capacity of blueberries and other small fruit. *Hort. Technology*, 11(4), 523-528.
- Hoykaas, P.J.J., Klapwijk, P.M., Nuti, M.P. and Schilperoort, A.R., 1977. Transfer of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid to avirulent *Agrobacteria* and to *Rhizobium ex planta*. *Journal of General Microbiology*, 98, 477-484.
- Htay, K. and Kerr, A., 1974. Biological control of crown gall: Seed and root inoculation. *Journal of Applied Bacteriology*, 37(4), 525-530.
- 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.
- Idris, E.E., Makarewicz, O., Farouk, A., Rosner, K., Greiner, R., Bochow, H., Richter, T. and Borriss, R., 2002. Extracellular phytase activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 contributes to its plant-growth-promoting effect. *Microbiology*, 148, 2097-2109.
- Inam-ul-Haq, M., Javed, M., Ahmad, R. and Rehman, A., 2003. Evaluation of different strains of *Pseudomonas fluorescens* for the biocontrol of *Fusarium* wilt of chickpea. *Pakistan Journal of Plant Pathology*, 2, 65-74.
- Ishizaki, K., Chiyoda, S., Yamato, K. and Kohchi, T., 2008. *Agrobacterium*-mediated transformation of the haploid liverwort *Marchantia polymorpha* L., an emerging model for plant biology. *Plant and Cell Physiology*, 49(7), 1084-1091.
- Islam, S. M., Akter, M., Atikur Rahman, M., Mostafizur Rahman, M., Maluda, M. A. and Firoz Alam, M., 2010. Isolation of *Agrobacterium tumefaciens* strains from crown gall sample of dicot plants in Bangladesh. *Current Research in Bacteriology*, 3(1), 27-36.
- Isufi, E. and Myrta, A., 1996. The defence of fruit trees in Albania: Problems and Prospects. *Informator Fitopatologico*, 46, 33-36.
- İyriboz, N., 1938. Bağ- hastalıkları. *Ziraat Vekâleti Neşriyatı*, 323, Ankara.
- Jackson, T.J., Burgess, T., Colquhoun, I. and Hardy, G.S., 2000. Action of the fungicide phosphite on *Eucalyptus marginata* inoculated with *Phytophthora cinnamomi*. *Plant Pathology*, 49, 147-154.
- Jaeger, R.J., 1974. Factors affecting a bioassay for *Agrobacterium tumefaciens* in natural soil. 37p., Oregon State University.
- Jang, I.C., Park, S.Y., Kim, K.Y., Kwons, Y., Kimj, G. and Kwak, S.S., 2004. Differential expression of 10 sweet potato peroxidase genes in response to bacterial pathogen *Pectobacterium chrysanthemi*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 42, 451-455.

- Jarchow, E., Grimsley, N.H. and Hohn, B., 1991. Vir F, the host range determining virulence gene of *Agrobacterium tumefaciens*, affects T-DNA transfer to *Zea mays*. Proc. Natl Acad. Sci. USA, 88, 10426-10430.
- JeongHo., R., Haekeun, Y., KyungRan, D., Y.H., Kyosun, P. and YounJung, C., 2005. Histochemical changes by *Agrobacterium vitis* infection in grapevines. Journal of the Korean Society for Horticultural Science, 46(4), 260-263.
- Jiang, Y.M., Zhu, X.R. and Li, Y.B., 2001. Postharvest control of litchi fruit rot by *Bacillus subtilis*. Lebensmittel-Wissenschaft Und-Technologie-Food Science and Technology, 34(7), 430-436.
- Jindal, K.K. and Sharma, R.C., 1988. Occurrence of biovar 1 of *Agrobacterium tumefaciens* on almond in India. Indian Phytopathology, 41(4), 614-615.
- Jindal, K.K., Ram, V. and Gupta, G.K., 1990. Occurrence of crown gall on pecan nut plants. Plant Disease Research 5(2), 216-217.
- Johnson, T.M. and Das, A., 1998. Organization and regulation of expression of the *Agrobacterium* genes. In: Spaink H P, Condorosi A and Hooykass P J J (Eds.), Rhizobiaceae. Kluwer Academic Publishers, 566p, London.
- Jones, D.A. and Kerr, A., 1989. *Agrobacterium radiobacter* strain K1026, a genetically engineered deviative of strain K84 for biological control of crown gall. Plant Disease, 73(1), 15-18.
- Jones, D.A., Ryder, M.H., Clare, B.G., Farrand, S. and Kerr, A., 1991. Biological control of crown gall using *Agrobacterium* strains K84 and K1026. In: Komada H, Kiritani K, Bay- Petersen J (Eds.), The Biological control of plant diseases, Food and Fertilizer Technology Center for the Asian and Pacific Region, Taipei, Taiwan, 161-170.
- Jones, D.A., Ryder, M.H., Clare, B.G., Farrand, S.K. and Kerr, A., 1988. Construction of a tra'deletion mutant of pAgK84 to safeguard the biological control of crown gall. Molecular General Genetics, 212, 207-214.
- Jones, J.B. and Raju, B.C., 1988. Systemic movement of *Agrobacterium tumefaciens* symptomless stem tissue of *Chrysanthemum morifolium*. Plant Disease, 72, 51-54.
- Jones, J.P., Overman A.G. and Geraldson C.M., 1966. Effect of fumigants and plastic films on the control of several soil borne pathogens of tomato. Phytopathology, 56, 929-932.
- Kadioğlu, A., 2004. Bitki fizyolojisi. Trabzon: Lokman Yayın, 453.
- Kado, C.I. and Crossa, J.H., 1994. Molecular mechanisms of bacterial virulence. Springer Science Business Media, California, 587p.
- Kado, C.I., 2010. Plant Bacteriology. APS Press, St.Paul. Minosota.
- Kado, C.I., 2014. Historical account on gaining insights on the mechanism of crown gall tumorigenesis induced by *Agrobacterium tumefaciens*. Frontiers in Microbiology, 5(340), doi: 10.3389/fmicb.2014.00340.
- Kado, C.L. and Heskett, M.G., 1970. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. Phytopathology, 60, 969-976.
- Kado, I.K., 2010. Hyperplastic overgrowth diseases. Plant Bacteriology. 169-220. APS Press. Minosota, USA.

- Kaena, P.J., Kerr, A. and New, P.B., 1970. Crown gall of stone fruit II. identification and nomenclature of *Agrobacterium* isolates. Australian Journal of Biological Science, 23, 585-595.
- Kahla, Y., Zouari-Bouassida, K., Rezgui, F., Trigui, M. and Tounsi, S., 2017. Efficacy of *Eucalyptus cinerea* as a source of bioactive compounds for curative biocontrol of crown gall caused by *Agrobacterium tumefaciens* Strain B6. BioMed Research International, <https://doi.org/10.1155/2017/9308063>.
- Kalbe, C., Marten, P. and Berg, G., 1996. Strains of the genus *Serratia* as beneficial rhizobacteria of oilseed rape. Microbiological Research, 151, 4400-4433.
- Kamal, B., 2004. Studies on Crown Gall of Cherry and Its management. PhD. Thesis, Parmar University of Horticulture and Forestry, Nauni, 90p.
- Kamoun, F., Ines Ben Fguira, B.I., Ben Hassen, N.B., Mejdoub, H., Lereclus, D. and Jaoua, S., 2011. Purification and Characterization of a new *Bacillus thuringiensis* bacteriocin active against *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Agrobacterium tumefaciens*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 165, 300-314.
- Kang, N.M., 2008. Inhibition of powdery mildew development and activation of antioxidant enzymes by induction of oxidative stress with foliar application of a mixture of riboflavin and methionine in cucumber. Scientia Horticulturae, 118(3), 181.
- Kapshuk, A.A., 1933. Bacteriological study of crown gall of fruit trees. In Russian English Summary, Bull. N. Caucasian Inst, for Plant Protection, Rostoff-on Do 2, 69-78.
- Karaca, I., 1977. Fitobakteriyoloji ve Bakteriyel Hastalıklar. Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Yayınları, 294.
- Karacif, E., 2012. *Erwinia amylovora* Enfeksiyonundan Sonra Elma ve Armut Çeşitlerindeki Bazı Antioksidatif Enzim Seviyelerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi, Konya, 63s.
- Karagöz, K., 2009. Bazı PGPR Bakterilerin Marulun Gelişimi ve Marul Yaprak Leke Hastalığı Üzerine Etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Erzurum, 95s.
- Karakuş, S., 2016. Üzüm Bağlarında Hastalık Etmeni Kurşuni Küfün (*Botrytis cinerea*) Biyolojik Mücadelesinde *Nepeta meyeri* (Benth.) Bitki Ekstraktlarının Kullanılması. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Erzurum, 127s.
- Karami, O., Esna-Ashari, M., Kurdistani, K.G. and Aghavaishi, B., 2009. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of plants: the role of the host. Biologia Plantarum, 53(2), 201-212.
- Karthikadevi, T.P.N., 2004. Status of Secondary Metabolites of *Pseudomonas fluorescens* Isolates and Their Impact on Soil Borne Fungal Pathogens *M. phaseolina* and *R. solani*. Master of Science Thesis, Avinashilingam University, 49p.
- Kaspar, F., Neubauer, P. and Gimpel, M., 2019. Bioactive secondary metabolites from *Bacillus subtilis*: A comprehensive review. Journal of Natural Products, 82, 2038-2053.
- Katan, J., 1981. Solar heating (solarization) of soil for control of soil borne pests. Annual Review of Phytopathology, 19, 211-236.

- Kawaguchi A., 2009. Studies on the diagnosis and biological control of grapevine crown gall and phylogenetic analysis of tumorigenic *Rhizobium vitis*. Journal of General Plant Pathology, 75, 462-463.
- Kawaguchi, A., 2013. Biological control of crown gall on grapevine and root colonization by nonpathogenic *Rhizobium vitis* strain ARK-1. Microbes and Environments, 28, 306-311.
- Keane, P.J., Kerr, A. and New, P.B., 1970. Crown gall of stone fruit II. Identification and nomenclature of *Agrobacterium* isolates. Australian Journal of Biological Science, 23, 585-595.
- Keck, M., 1988. Investigations on the biological control of crown gall (*Agrobacterium tumefaciens*) on chrysanthemums. Pflanzenschutzberichte, 49, 32-36.
- Kennedy, B. W. and Alcorn, S.M., 1980. Estimates of US crop losses to prokaryotic plant pathogens. Plant Disease, 64, 674-676.
- Kerr, A. and Htay, K., 1974. Biological control of crown gall through bacteriocin production. Physiological Plant Pathology, 4, 37-44.
- Kerr, A. and Panagopoulos, C.G., 1977. Biotypes of *Agrobacterium radiobacter* var. *tumefaciens* and their biological control. Phytopathology, 90, 172-179.
- Kerr, A. and Tate, M.E., 1984. Agrocins and the biological control of crown gall. Microbiological Sciences, 1, 1-4.
- Kerr, A., 1969. Crown gall of stone fruit. 1. Isolation of *Agrobacterium tumefaciens* and related species. Australian Journal of Biological Science, 22, 111-116.
- Kerr, A., 1972. Biological control of crown gall seed inoculation. Journal of Applied Bacteriology, 35(3), 493-497.
- Kerr, A., 1980. Biological control of crown gall through production of Agrocin 84. Plant Disease, 64, 25-40.
- Kerr, A., 1991. The genus *Agrobacterium*. In: Balows A, Trüper HG, Dworkin M, HarderWand Schleifer KH (eds) The Prokaryotes 2nd ed. Springer-Verlag, New York, Vol. III, 2214-2235.
- Khan, A., Williams, K.L. and Nevalainen, H.K.M., 2004. Effects of *Paecilomyces lilacinus* protease and chitinase on the eggshell structures and hatching of *Meloidogyne javanica* juveniles. Biological Control, 31, 346-352.
- Khan, M.R. and Tarannum, Z., 1999. Effects of field application of various micro-organisms on *Meloidogyne incognita* on tomato. Nematologia Mediterranea, 27, 233-238.
- Khmel, I.A., Sorokina, T.A., Lemanova, N.B., Lipasova, V.A., Metlitski, O.Z., Burdeinaya, T.V. and Chernin, L.S., 1998. Biological control of crown gall in grapevine and raspberry by two *Pseudomonas* spp. with a wide spectrum of antagonistic activity. Biocontrol Science and Technology, 8(1), 45-57.
- Kim, C.Y., Lee, S.H., Park, H.C., Bae, C.G., Cheong, Y.H., Choi, Y.J., Han, C., Lee, S.Y., Lim, C.O. and Cho, M.J., 2000. Identification of rice blast fungal elicitor-responsive genes by differential display analysis. Molecular Plant-Microbe Interactions Journal, 13(4), 470-474.
- Kim, S. H., Lim, Y. S., Chot, S. Y., Kim, D. G., Choi, S. K. and Yoon, J.T., 2005. Epidemiology of the crown gall on persimmon tree. Agricultural Technology Administration, 19, 227-230.

- Klee, H., Montoya, A., Horodyski, F., Lichtenstein, C., Garfinkel, D., Fuller, S., Flores, C., Peschon, J., Nester, E. and Gordon, M., 1984. Nucleotide sequence of the tms genes of the pTiA6NC octopine Ti plasmid: two gene products involved in plant tumorigenesis. *Proceedings of National Academy of Sciences*, 81, 1728-1732.
- Klement, Z., Mavridis, A., Rudolph, K., Vidaver, A., Perombelon, M.C. and Moore, L.W., 1990. Inoculation of plant tissues. In: Z Klement, K Rudolph and D C Sands (Eds), *Methods in Phytobacteriology*, Akademiai Kiado, Budapest, Hungary.
- Knauf, V.C., Panagopoulos, C.G. and Nester, E.W., 1982. Genetic factors controlling the host range of *Agrobacterium tumefaciens*. *Phytopathology*, 72, 1545-1549.
- Kohli, A., Twyman, R.M., Abranches, R., Wegel, E., Stoger, E. and Christou, P., 2003. Transgene integration, organization and interaction in plants. *Plant Molecular Biology*, 52, 247-258.
- Kotan, R., 1998. Biber ve Domatesteki Bakteriyel Leke Hastalığı (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Doidge) Dye)'nın Biyolojik ve Kimyasal Kontrolü. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Erzurum, 37s.
- Kotan, R., 2002. Doğu Anadolu Bölgesi'nde Yetiştirilen Yumuşak Çekirdekli Meyve Ağaçlarından İzole Edilen Patojen ve Saprofitik Bakteriyel Organizmaların Klasik ve Moleküler Metotlar ile Tanısı ve Biyolojik Mücadele İmkânlarının Araştırılması. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Erzurum, 217s.
- Kotan, R., Dikbaş, N. and Bostan, H., 2009. Biological control of post harvest disease caused by *Aspergillus flavus* on stored lemon fruits. *African Journal of Biotechnology*, 8(2), 209-214.
- Kotan, R., Şahin, F., Demirci, E. ve Eken, C., 2002. Patates (*Solanum tuberosum* L.)'te kuru çürüklüğe sebep olan fungal patojenlerden *Fusarium solani*'ye karşı potansiyel bakteriyel etmenler kullanılarak biyolojik mücadele imkanlarının araştırılması. Türkiye V. Biyolojik Mücadele Kongresi, Erzurum.
- Kovacs, N., 1956. Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. *Nature*, London, 170-173.
- Krimi, Z., Raio, A., Petit, A., Nesme, X. and Dessaux, Y., 2006. *Euocalyptus occidentalis* plant tests a naturally infected by pathogenic *Agrobacterium tumefaciens*. *European Journal of Plant Pathology*, 116(3), 237-246.
- Krispin, D.F., Wolf, S.G., Abeck, S., Unger, T., Peleg, Y., Jacobovitch, J., Michael, Y., Daube, S., Sharon, M., Robison, C. S., Svergan, D. I., Fass, D., Tzfira, T. and Erlbaum, M., 2007. Plant transformation by *Agrobacterium tumefaciens* modulation of single stranded DNA-vir EZ complex assembly by Vir El. *The Journal of Biological Chemistry*, 282, 3458-3464.
- Kuldau, G.A., De Vos, G., Owen, J., McCaffrey, G. and Zambryski, P., 1990. The virB operon of *Agrobacterium tumefaciens* pTiC58 encodes 11 open reading frames. *Molecular Gene and Genetics*, 221, 256-266.
- Kumar, P., Dubey, R.C. and Maheshwari, D.K., 2012. *Bacillus* strains isolated from rhizosphere showed plant growth promoting and antagonistic activity against phytopathogens. *Microbiological Research*, 167, 493-499.
- Kumashiro, K. and Yamamoto, H., 1992. Replant failure in five apple rootstocks. *Journal of the Faculty of Agriculture Shinshu University*, 29(1), 9-12.
- Kuntay, S., 1942. Fitopatoloji Dersleri. Ziraat Vekâleti Neşriyatı, 930, Ankara.

- Kuzniak, E. and Sklodowska, M., 2005. Fungal pathogen-induced changes in the antioxidant systems of leaf peroxisomes from infected tomato plants. *Planta*, 222(1), 192-200.
- Küsek, M., 2007. Asmada (*Vitis vinifera* L.) Ura Neden Olan *Agrobacterium vitis*'in Tanılanması ve Mücadele Olanaklarının Araştırılması. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana, 103s.
- Lee, L.Y. and Gelvin, S.B., 2008. T-DNA binary vectors and systems. *Plant Physiology*, 146, 325-332.
- Lee, T.M. and Lin, Y.H., 1996. Peroxidation activity in relation to ethylene induced rice (*Oryza sativa* L.) coleoptile elongation. *Botanical Bulletin-Academia Sinica Taipei*, 37(4), 239-245.
- Lehoczky, J., 1968. Spread of *Agrobacterium tumefaciens* in vessels of the grapevine, after naturel infection. *Phytopathology*, 63, 239-246.
- Lelliot, R.A. and Stead, D.E., 1987. Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. Black Well Scientific Puplication, 157, Oxford, USA.
- Lemoine, J. and Michelesi, J., 1993. Agronomic behavior of pears: incidence of crown gall. *Arboriculture Fruitiere*, 465, 23-27.
- Leong, J., 1986. Siderophores: their biochemistry and possible role in the biocontrol of plant pathogens. *Annual Review Phytopathology*, 77, 882-886.
- Levine, M., 1919. Studies on plant cancers-I. The mechanism of the formation of the leafy crown gall. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 46, 447-452.
- Liang, C., Liu, T., Zhao, Y., FengY., WanT. and Cai, Y., 2019. Defense responses of cherry rootstock gisela 6 elicited by *Agrobacterium tumefaciens* infection. *Journal of Plant Growth Regulation*, <https://doi.org/10.1007/s00344-019-09915>.
- Liaqat, F., Bahadır, S.P., Elibol, M. and Eltem, R., 2018. Optimization of chitosanase production by *Bacillus mojavensis* EGE-B-5.2i. *Journal of Basic Microbiology*, 58, 836-847.
- Lieske, R., 1928. Untersuchungen über die krebs-krankheit bei pflanzen, tieren und menschen. *Zentrabl. Bakteriöl. Parasitenk Infektionskr. Hyg. Abt. Orig.* 108, 118-146.
- Limanska, N., Korotaeva, N., Biscola, V., Ivanytsia, T. and Merlich, A., 2015. Study of the potential application of lactic acid bacteria in the control of infection caused by *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Plant Pathology and Microbiology*, 6, 292.
- Limones, C.G., Hervas, A., Cortes, J.A.N., Diaz, R.M.J. and Tena, M., 2002. Induction of antioxidant enzyme system and other oxidative stress markers associated with compatible and incompatible interactions chickpea and *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 61, 325-337.
- Lindstrom, K. and Young, J.P., 2011. International Committee on Systematics of Prokaryotes. Subcommittee on the taxonomy of *Agrobacterium* and *Rhizobium*: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiolology*, 61(12), 308-309.
- Lipincott, J.A., Lipincott, B.B. and Starr, M.P., 1981. The genus *Agrobacterium*. *Phytopathogenic Bacteria*, Springer, 842-855.
- Lippincott, B.B. and Lippincott, J.A., 1969. Bacterial attachment to a specific wound site as an essential stage in tumour initiation by *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Bacteriology*, 97, 620-628.

- Lipp-Nissinen, K.H., 1993. Molecular and cellular mechanisms of *Agrobacterium* mediated plant transformation. *Ciencia e Cultura*, 45, 104-111.
- Liu, Y., Tao, J., Yan, Y.J., Li, B., Li, H. and Li, C. 2011. Biocontrol efficiency of *Bacillus subtilis* SL-13 and characterization of an antifungal chitinase. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 19(1), 128-134.
- Lopez, M.M., 1978, Characteristics of French isolates of *Agrobacterium*. Proc 4th Int Conference Plant Pathogen Bacteria Angers, 233-237, France.
- Lopez, M.M., Gorris, M.T., Salcedo, C.I., Montojo, A.M. and Miro, M., 1989. Evidence of biological control of *Agrobacterium tumefaciens* strains sensitive and resistant to agrocin 84 by different *Agrobacterium radiobacter* strains on stone fruit trees. *Applied and Environmental Microbiology*, 5, 741-746.
- Lopez, M.M., Gorris, M.T., Temprano, F.J. and Drive, R.J., 1987. Results of seven years of biological control of *Agrobacterium tumefaciens* in Spain. *Bulletin OEPP*, 273-279.
- Lopez, M.M., Iglesia, A. and Salcedo, C., 1982a. Identification of *Agrobacterium tumefaciens* biotype 3 on grapevine in Spain. In I Congreso Nacional de Fitopatología, Granada.
- Lopez, M.M., Miro, M., Orive, R. and Poli, M., 1982b. Biological control of crown gall on rose in Spain. In Proceedings of the Vth International Conference on Plant Pathogenic Bacteria, 538- 548p, CIAT, California.
- Lopez, M.M., Miro, M., Gorris, M.T., Salcedo, C.I., Temprano, F. and Orive, R.J., 1982c. comparative efficiency of inoculation treatments with *Agrobacterium radiobacter* pv. *radiobacter* K84 against sensitive and resistant agrocin 84 strains of *Agrobacterium radiobacter* pv. *tumefaciens*. I. International Workshop on Crown Gall, Swiss Federal Agricultural Research Station, Wädenswil.
- Lugtenberg, B. and Kamilova, F., 2009. Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annual Reviews Microbiology*, 63, 541-556.
- Ma, J., Liu, H., Liu, K., Wang, C., Li, Y., Hou, Q., Yao, L., Cui, Y., Zhang, T., Wang, H., Wang, B., Wang, Y., Ge, R., Xu, B., Yao, G., Xu, W., Fan, L., Ding, Y. and Du, B., 2017. Complete genome sequence of *Bacillus velezensis* GQJK49, a plant growth-promoting rhizobacterium with antifungal activity. *Genome Announcement*, Prokaryotes, 5(35), 1-2.
- Macfayden, A., 1967. Thermal energy as a factor biology of soils, in a terminology, A.H. Rose, Academic Press, 653p. New York.
- Madhava Rao, K.V., Raghavendra, A.S. and Janardhan Reddy, K., 2005. Physiology and molecular biology of stress tolerance in plants. Springer, 345p, Netherlands.
- Magori, S. and Citovsky, V., 2012. The role of the ubiquitin-proteasome system in *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of plants. *Plant Physiology*, 160, 65-71.
- Małolepsza, U. and Urbanek, H., 2000. The oxidants and antioxidant enzymes in tomato leaves treated with o-hydroxyethylrutin and infected with *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology*, 106, 657-665.
- Manigault, P. and Kurkdjian, A., 1967. Influence de la lumière sur le développement des tumeurs de la plantule de Pois, *Pisum sativum* L., induites par *Agrobacterium tumefaciens* (Smith and Town) Conn. C.R. Académie des Sciences, 264, 2304-2306.

- Marti, R., Cubero, J., Daza, A., Piquer, J., Salcedo, C.I., Morente, C. and Lopez, M.M., 1999. Evidence of migration and endophytic presence of *Agrobacterium tumefaciens* in rose plants. *European Journal of Plant Pathology*, 105, 39-50.
- Matthee, F.N., Thomas, A.C. and Plessis, H.J., 1977. Biological control of crown gall. *Deciduous Fruit Grower*, 27(9), 303-307.
- Mattos, L., 1986. Crown gall of raspberry (*Rubus* sp.). *Fitopatologia*, 21, 86-89.
- Mcclung, C.R., 1997. Regulation of catalases in *Arabidopsis*. *Free Radical Biology and Medicine*, 23(3), 489-496.
- Mcclure, N.C., Ahmadi, A.R. and Clare, B.G., 1998. Construction of a range of derivatives of the biological control strain *Agrobacterium rhizogenes* K84 a study of factors involved in biological control of crown gall disease. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(10), 3977-3982.
- McInroy, J.A. and Kloepper, J.W. 1995. Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. *Plant Soil*, 173, 337-342.
- Meyer, J.M. and Abdallah, M.A., 1978. The Fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens*: biosynthesis, purification and physicochemical properties. *Journal of General Microbiology*, 107, 319-328.
- Michel, M.F., Brasileiro, A.C., Depierreux, C., Otten, L., Delmotte, F. and Jouanin, L., 1990. Identification of different *Agrobacterium* strains isolated from the same forest nursery. *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 3537-3545.
- Mijakovic, I., Musumeci, L., Tautz, L., Petranovic, D., Edwards, R.A., Jensen, P.R., Mustelin, T., Deutscher, J. and Bottini, N., 2005. *In vitro* characterization of the *Bacillus subtilis* protein tyrosine phosphatase YwqE. *Journal of Bacteriology*, 187, 3384-3390.
- Miller, H.N., 1975. Leaf, stem, crown, and root galls induced in chrysanthemum by *Agrobacterium tumefaciens*. *Phytopathology*, 65, 805-811.
- Min P.O., 2014. Comparison of two selective media for The isolation of *Agrobacterium tumefaciens* from the soil. Bachelor of Science Biotechnology, Faculty of Science, Universiti Tunku Abdul Rahman, 79p.
- Minibaeva, F.V. and Gordon, L.K., 2003. Superoxide production and the activity of extracellular peroxidase in plant tissues under stress conditions. *Russian Journal of Plant Physiology*, 50(3), 411-416.
- Minnemeyer, S., Lighrfoot, L. and Matthyse, A.G., 1991. A semiquantitative bioassay for relative virulence of *Agrobacterium tumefaciens* strains on *Bryophyllum daigorumontiana*. *Journal of Bacteriology*, 173, 7723-7724.
- Mishagi, I.J. and Donndelinger, C.R. 1990. Endophytic bacteria in symptom free cotton plants. *Phytopathology*, 9, 808-811.
- Mohammadi, P., 2018. Domates Bakteriyel Solgunluk ve Kanser Hastalığı Etmeni (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis *et al.*)'nin Biyoajan Bakteriler Kullanılarak Mücadele İmkânlarının Araştırılması. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Erzurum, 112s.
- Montesinos, E., 2003. Development, registration and commercialization of microbial pesticides for plant protection. *International Microbiology*, 6, 245-252.
- Montesinos, E., Bonaterra, A., Badosa, E., France's, J., Alemany, J., Llorente, I. and Moragrega, C., 2002. Plant-microbe interactions and the new biotechnological methods of plant disease control. *International Microbiology*, 5, 169-175.

- Moore, E.R.B., Kruger, A.S., Haben, L., Seal, S.E., De Boer, R., Timmis, K.N. and Swings, J., 1997. 16S rRNA gene sequence analyses and Inter and intergenic relationship of *Xanthomonas* species and *Stenotrphomonas maltophilia*. FEMS Microbiology Letters, 151, 145-153.
- Moore, L.W. 1988. Use of *Agrobacterium radiobacter* in agricultural ecosystems. Microbiological Science, 5, 92-95.
- Moore, L.W. and Canfield, M., 1996. Biology of *Agrobacterium* and management of crown gall disease. In: Hall R (ed) Principles and Practice of Managing Soilborne Plant Pathogens, 151-191.
- Moore, L.W., 1976. Research findings of crown gall and its control. American Nurseryman, 144(10), 68-69.
- Moore, L.W., 1977. Prevention of crown gall on *Prunus* roots by bacterial antagonists. Phytopathology, 61(1), 139-144.
- Moore, L.W., 1979. Practical use and success of *Agrobacterium radiobacter* strain K84 of crown gall control. In: Soil-Borne Plant Pathogens (Schippers B, Gams W, eds) 553-568, Academic Press, NY.
- Moore, L.W., Anderson, A. and Kado, C.I., 1980. Gram negative bacteria *Agrobacterium*. In: Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria, N. W. Schaad (ed). The American Phytopathological Society, 17-25p, St. Paul, Minnesota.
- Moore, L.W., Bouzar, H. and Burr, T.J., 2001. *Agrobacterium*. In: Schaad N W, Jones J B and Chun W (Eds.), Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. American Phytopathological Society Press, 17-33p, St. Paul, Minnesota.
- Moore, L.W., Chilton, W.S. and Canfield, M.L., 1997. Diversity of opines and opine-catabolizing bacteria isolated from naturally occurring crown gall tumors. Applied and Environmental Microbiology, 63, 201-207.
- Moore, L.W. and Cooksey, D.A., 1981. Biology of *Agrobacterium tumefaciens*: plant interactions. International Review of Cytology, 13, 15-46.
- Murugesan, S., Manoharan, C., Vijayakumar, R. and Panneerselvam, A., 2010. Isolation and characterization of *Agrobacterium rhizogenes* from the root nodules of some leguminous plants. International Journal of Microbiology Research, 1, 92-96.
- Murugi, J.G., 2015. Management of Crown Gall Disease of Roses Using *Agrobacterium radiobacter*, Corn Oil and Copper Hydroxide and Oxychloride in Kenya. Master of Science Thesis, Kenyatta University, Kenya, 69p.
- Mysore, K.S., Nam, J. and Gelvin, S.B., 2000. An *Arabidopsis histone H2A* mutant is deficient in *Agrobacterium* T-DNA integration. PNAS, 97, 948-953.
- Nakano, Y. and Asada, K., 1987. Purification of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts; its inactivation in ascorbate-depleted medium and reactivation by monodehydroascorbate radical. Plant and Cell Physiology, 28(1), 131-140.
- Nandhini, S., Sendhilvel V. and Babu, S., 2012. Endophytic bacteria from tomato and their efficacy against *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, the wilt pathogen. Journal of Biopesticides, 5(2), 178-185.
- Nautiyal, C.S., 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. FEMS Microbiology Letters, 170, 65-270.

- Nester, E.W., 2015. *Agrobacterium*: nature's genetic engineer. *Frontiers In Plant Science*, 5, 730.
- New, P.B. and Kerr, A., 1971. A selective medium for *Agrobacterium radiobacter* Biotype 2. *Journal of Applied Bacteriology*, 34, 233-236.
- New, P.B. and Kerr, A., 1972. Biological control of crown gall field: measurements and glasshouse experiments. *Journal of Applied Bacteriology*, 35(2), 279-287.
- Nikaido, H., 1994. Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. *Science*, 264(5157), 382-388.
- Nimchuk, Z., Eulgem, T., Holt, III.B.F. and Dangl, J.L., 2003. Recognition and response in the plant immune system. *Annual Reviews of Genetics*, 37, 579-609.
- Noctor, G. and Foyer, C.H., 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49, 249-279.
- Ogg, A.G. and Graf G.T., 1974. Effect of herbicides in fruit tree nursery stock. Circular, College of Agriculture Research Centre, Washington State University.
- Ophel, K. and Kerr, A., 1990. *Agrobacterium vitis* sp. nov. for strains of *Agrobacterium* biovar-3 from grapevines. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 40, 236-241.
- Otten L., Burr T. and Szegedi E., 2008. *Agrobacterium*: a diseasecausing bacterium. In: Tzfira T., Citovsky V. (eds). *Agrobacterium*, From Biology to Biotechnology, 222-241, Berlin, Germany.
- Ovadis, M., Liu, X., Gavriel, S., Ismailov, Z., Chet, I. and Chernin, L.S. 2004. The global regulator genes from biocontrol strain *Serratia plymuthica* IC1270: cloning, sequencing, and functional studies. *Journal of Bacteriology*, 186, 4986-4993.
- Owens, L.D. and Cress, D.E., 1985. Genotypic variability of soybean response to *Agrobacterium* Strains Harboring the Ti or Ri Plasmids. *Plant Physiology*, 77, 87-94.
- Öden, S., 1991. İzmir ve İstanbul İllerinde Önemli Süs Bitkilerinde Görülen Bakteriyel Hastalıklar ve Etmenlerin Saptanması Üzerine Araştırmalar. Doktora Tezi, Ege Üniversitesi, İzmir, 84s.
- Öktem, Y.E., 1972. Kök uru etmeni (*Agrobacterium tumefaciens* (Smith and Townsend) Conn.)'nin topraktan izolasyonu ve indikatör bitkiler yardımıyla teşhisi üzerinde çalışmalar. *Bitki Koruma Bülteni*, 12(3), 187-196.
- Özyiğit, İ.İ., 2012. *Agrobacterium tumefaciens* and its use in plant biotechnology. In book: *Crop Production for Agricultural Improvement*: Edt: Ashraf, M., Öztürk, M., Aqeel Ahmad, M.S., Aksoy, A. Springer.
- Palazzini, J.M., Dunalp, C.A., Bowman, M.J. and Chulze, S.N., 2016. *Bacillus velezensis* RC 218 as a biocontrol agent to reduce *Fusarium* head blight and deoxynivalenol accumulation: Genome sequencing and secondary metabolite cluster profiles. *Microbiological Research*, 192, 30-36.
- Panagopoulos, C.G., Psallidas, P.G. and Alivizatos, A.S., 1979. Evidence of a breakdown in the effectiveness of biological control of crown gall. In: *Soil Borne Plant Pathogens*, Schippers B and Gams W (eds), Academic Press, 569-578, London.

- Parke, J.L., and Gurian-Sherman, D., 2001. Diversity of the *Burkholderia cepacia* complex and implications for risk assessment of biological control strains. *Annual Reviews Phytopathology*, 39, 225-258.
- Patel, M.K., 1926. An improved method of isolating *Pseudomonas tumefaciens* Smith and Townsend. *Phytopathology*, 16, 577.
- Patten, C.L. and Glick, B.R., 2002. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system, *Applied Environmental Microbiology*, 68, 3795-3801.
- Patykowski, J., 2006. Role of hydrogen peroxide and apoplastic peroxidase in tomato *Botrytis cinerea* interaction. *Acta Physiologiae Plantarum*, 6(28), 589-598.
- Paulitz, T.C. 1991. Effect of *Pseudomonas putida* on the stimulation of *Pythium ultimum* by seed volatiles of pea and soybean. *Phytopathology*, 81, 1282-1287.
- Peluso, R., Raio, A., Morra, F. and Zoina, A., 2003. Physiological, biochemical and molecular analyses of Italian collection of *Agrobacterium tumefaciens* strain *European Journal of Plant Pathology*, 109, 291-300.
- Penyalver, R., Oger, P., Lopez, M.M. and Farrand, S.K., 2000a. Iron-binding compounds in *Agrobacterium* spp.: the biological control strain K84 produces a hydroxamate siderophore. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(2), 654-664.
- Penyalver, R., Vicedo, B. and Lopez, M.M., 2000b. Use of genetically engineered *Agrobacterium* strain K1026 for biological control of crown gall. *European Journal of Plant Pathology*, 106, 801-810.
- Pierronnet, A. and Eyquard, J.P., 1993. *Prunus* rootstocks and crown gall. *Arboriculture-Fruitiere*, 466, 37-41.
- Pierronnet, A. and Saleuses, G., 1996. Behaviour of *Prunus* cultivars and hybrids towards *Agrobacterium tumefaciens* estimated from hardwood cuttings. *Agronomie, EDP Sciences*, 16(4), 247-256.
- Pinkerton, J.N., Ivors, K.L., Miller M.L. and Moore L.W., 2000. Effect of soil solarization and cover crops on populations of selected soil borne plant pathogens in western Oregon. *Plant Disease*, 84, 952-960.
- Pleban, S., Chernin, L. and Chet, I., 1997. Chitinolytic activity of an endophytic strain of *Bacillus cereus*. *Letters of Applied Microbiology*, 25, 284-288.
- Popova, I., 1972. The effect of crown galls, caused by *Agrobacterium tumefaciens* (Smith and Townsend) Conn. on the growth and development of apple. *Gradinarska-i-Lozarska-Nauka*, 9(5), 57-68.
- Popova, I., 1973. The effect of tumours caused by *Agrobacterium tumefaciens* on the growth and development of plum trees in orchard. *Gradinarska-i-Lozarska-Nauka*, 10(5), 41-50.
- Psallidas, P.G. and Panagopoulos, C.G., 1968. A new bacterial disease of almond. *Annual Institute Phytopathology*, 8(3), 85-87.
- Pulawska, J., 2010. Crown gall of stone fruits and nuts, economic significance and diversity of its causal agents: tumorigenic *Agrobacterium* spp. *Journal of Plant Pathology*, 92(1), 87-98.
- Puławska, J., Warabieda, W. and Ismail, E., 2016. Identification and characterization of bacteria isolated from crown galls on stone fruits in Poland. *Plant Pathology*, 65, 1034-1043.

- Putnam, M., 2006. Protocol for isolation of *Agrobacterium* from herbaceous plant material. www.science.oregonstate.edu, (13.05.2019).
- Raaijmakers, J.M. and Weller, D.M. 2001. Exploiting genotypic diversity of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas* spp. characterization of superior root-colonizing *P. fluorescens* strain Q8r1-96. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 2545-2554.
- Raio, A., Zonia, A. and Moore, L.W., 1997. The effect of solar heating on natural and inoculated *Agrobacteria*. *Plant Pathology*, 46, 320-328.
- Rais, A., Jabeen, Z., Shair, F., Yusuf Hafeez, F. and Hassan, M.N., 2017. *Bacillus* spp., a bio-control agent enhances the activity of antioxidant defense enzymes in rice against *Pyricularia oryzae*. *PlosOne*, 12(11): e0187412. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187412>.
- Rajendran, L., Sarvanakumar, D., Raguchander, T. and Samiyappan, R., 2006. Endophytic bacterial induction of defence enzymes against bacterial blight of cotton. *Phytopathologia Mediterranea*, 45, 203-214.
- Ralph, J., Bunzel, M., Marita J.M., Hatfield, R.D., Lu, F., Kim, H., Schatz, P.F., Grabber, J.H. and Steinhart, H., 2004. Peroxidase-dependent cross-linking reactions of p-hydroxycinnamates in plant cell walls. *Phytochemistry Reviews*, 3, 79-96.
- Ranieri, A., Castagna, A., Baldan, B. and Soldatini, G.F., 2001. Iron deficiency differently affects peroxidase isoform in sunflower. *Journal of Experimental Botany*, 52(352), 25-35.
- Rao, M.V., Paliyath, C. and Ormrod, D.P., 1996. Ultraviolet-B and ozone induced biochemical changes in antioxidant enzymes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, 110, 125-136.
- Reva, O., Smirnov, V.V., Petterson, B. and Priest, F.G., 2002. *Bacillus endophyticus* sp. nov., isolated from the inner tissues of cotton plants (*Gossypium* sp.). *International Journal of Systematics Evolution Microbiology*, 52, 101-107.
- Rezmer, C., Schlichting, R. and Wachter, R., 1999. Identification and localization of transformed cells in *Agrobacterium tumefaciens*-induced plant tumors. *Planta*, 209, 399-405.
- Rhouma, A., Boubaker, A., Nesme, X. and Dessaux, Y., 2005. Susceptibility of some stone and pome rootstocks to crown gall. *Phytopathologia Mediterranea*, 44, 275-284.
- Rhouma, A., Ferchichi, H., Hofsa, M. and Boubaker, A., 2004. Efficacy of the non pathogenic *Agrobacterium* strains K84 and K1026 against crown gall in Tunisia. *Phytopathologia Mediterranea*, 43(2), 167-176.
- Riker, A.J. and Keitt, G.W., 1926. Studies on crown gall and wound overgrowth on apple nursery stock. *Phytopathology*, 16, 765-808.
- Riker, A.J., 1923. Some morphological responses of the host tissue to the crown gall organism. *Journal of Agriculture Research*, 26, 425-436.
- Roach, T., 2009. Extracellular Production of Reactive Oxygen Species in Response to Abiotic Stress in Seeds. Ph.D Thesis, University College, London, 154p.
- Robson, L.M. and Chambliss, G.H., 1989. Cellulases of bacterial origin, *Enzyme Microbial Technology*, 11, 626-644.
- Rodriguez, H. and Fraga, R., 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*, 17, 319-339.

- Romanenko, V.M. and Perepnikhatka, V.I., 1984. Flagellae of *Agrobacterium tumefaciens* cells. Mikrobiologicheskii Zhurnal, 46, 66-68.
- Ross, A.F., 1961. Localized acquired resistance to plant virus infection in hypersensitive hosts. Virology, 14, 329-339.
- Ross, M.N., Sanborn, R., O'reily, H.J. and Thompson, J.P., 1970. Reducing loss from crown gall disease. Cal. Agric. Exp. Sta. Bull., 845-854.
- Ryder M.H. and Jones, D.A., 1990. Biological control of crown gall, in Biological control of plant pathogens, CAB International, 45-63 p, Oxon, UK.
- Sahin, U., Ekinci, M., Ors, S., Turan, M., Yıldız, S. and Yıldırım, E., 2018. Effects of individual and combined effects of salinity and drought on physiological, nutritional and biochemical properties of cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*). Scientia Horticulturae, 240, 196-204.
- Sandle, T., 2016. Microbial identification. Pharmaceutical Microbiology, 103-113. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100022-9.00009-8>.
- Saroop, S., Chanda, S.V. and Singh, Y.D., 2002. Changes in soluble and ionically bound peroxidase activities during *Brassica juncea* seed development. Bulgarian Journal of Plant Physiology, 28(34), 26-34.
- Sawada, H., Ieki, H., Oyaizu, H., and Matsumoto, S., 1993. Proposal for rejection of *Agrobacterium tumefaciens* and revised descriptions for the genus *Agrobacterium* and for *Agrobacterium radiobacter* and *Agrobacterium rhizogenes*. International Journal of Systematic Cteriology, 694-702.
- Saygılı, H., Şahin, F. ve Aysan, Y., 2008. Bitki Bakteri Hastalıkları. Meta Basım Matbaacılık, 317, İzmir, Türkiye.
- Scebba, F., Sebastiani, L. and Vitagliano, C., 1999. Protective enzymes against activated oxygen species in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings: Responses to cold acclimation. Journal of Plant Physiology, 155, 762-768.
- Schallmey, M., Singh, A. and Ward, O.P., 2004. Developments in the use of Bacillus species for industrial production. Canadian Journal of Microbiology, 50, 1-17.
- Scheer, H.V., Dieren, J.P.A. and Wondergem, H.J., 1978. Research on root galls of fruit trees caused by *Agrobacterium tumefaciens*. Frutteeit, 68(8), 246-248.
- Schrammeijer, B., Dulk-Ras, A., Vergunst, A.C., Jurado Jacome, E. and Hooykaas, P.J.J., 2003. Analysis of Vir protein translocation from *Agrobacterium tumefaciens* using *Saccharomyces cerevisiae* as a model: evidence for transport of a novel effector protein VirE3. Nucleic Acids Research, 31, 860-868.
- Schroth, M.N. and Moller, W.J., 1976. Crown gall control in the field with non pathogenic bacterium. Plant Disease Reporter, 60(4), 275-278.
- Schroth, M.N., Mc Chain, A.H., Foott, J.H. and Huisman, O.C., 1958. Reduction in yield and vigor of grapewine caused by crown gall disease. Plant Disease, 72, 241-246.
- Schroth, M.N., Thompson, J.P. and Hildebrand, D.C., 1965. Isolation of *Agrobacterium tumefaciens*-A. *radiobacter* group from soil. Phytopathology, 55, 645-647.
- Schroth, M.N., Weinhold, A.R., McCain, A.H., Hildebrand, D.C. and Ross, N., 1971. Biology and control of *Agrobacterium tumefaciens*. Hilgardia, 40, 537-552.
- Schwyn, B. and Neilands, J.B., 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. Analytical Biochemistry, 160, 47-56.

- Seddon, B., Edwards, S. G., Markellou, E., and Malathrakis, N.E., 1997. Bacterial antagonist-fungal pathogen interactions on the plant aerial surface. In *Multitrophic Interactions Interrestrial Systems*, eds A.C. Grange and V.K. Brown (Oxford: Blackwell Science Ltd).
- Senol, M., 2014. *P. fluorescens* ve *B. subtilis* Bakterilerinin *F. culmorum*'a Karşı Antifungal Etkinliği, Bakterilerden Elde Edilen Kitinaz Enziminin Kısmi Saflaştırılması ve Bazı Kinetik Özelliklerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Erzurum, 64s.
- 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.
- Seshadri, S., Muthukumarasamy, R., Lakshminarasimhan, C. and Lgnacimuthu, S., 2000. Solubilization of inorganic phosphates by *Azospirillum halopraeferans*. *Current science*, 79(5), 565-567.
- Shaad, N.W., Jones, J.B. and Chun, W., 2001. II. Gram negative bacteria. *Agrobacterium*. *Plant Pathogenic Bacteria*, 17-34.
- Shakeel, M., Rais, A., Hassan, M.N. and Hafeez, F.Y., 2015. Root associated *Bacillus* sp. improves growth, yield and zinc translocation for basmati rice (*Oryza sativa*) varieties. *Front Microbiology*, 18(6), 1-12.
- Shams, M., 2019, Tuz Stresinin Biberde Bitki Gelişimi, Fizyolojik ve Biokimyasal Özellikler, Dna Metilasyonu ile Tohum Çimlenmesi Üzerine Etkisi. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Erzurum, 139s.
- Shams, M., Campillo, T., Lavire, C., Muller, D., Nesme, X. and Vial, L., 2012. Rapid and efficient methods to isolate, type strains and determine species of *Agrobacterium* spp. in pure culture and complex environments. *Biochemical Testing*, InTech.
- Sharma, A., Gupta, A.K., Singh, D., Khosla, K. and Mahajan, R., 2016. Biological control of crown gall disease in peach and cherry nursery plants by white stone powder based formulation (SolGall) of *Brevibacillus* spp. *Indian Phytopathology*, 69(3), 231-236.
- Sharma, R.C., Kamal, B. and Gupta, A.K., 2004. Occurrence of crown gall of stone fruits in warmer areas of India and its management. *Acta Horticulture*, doi:10.17660/ActaHortic.2004.662.62.
- Shirasu, K., Morel, P. and Kado, C.I., 1990. Characterization of the virB operon of an *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid: nucleotide sequence and protein analysis. *Molecular Microbiology*, 4, 1153-1163.
- Shishido, M., Breuil, C. and Chanway, C.P., 1999. Endophytic colonization of spruce by plant growth promoting rhizobacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, 29,191-196.
- Shoda, M., 2000. Bacterial control of plant diseases. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 89, 515-521.
- Shulaev, V., Leon, J. and Raskin, I., 1995. Is salicylic acid a translocated signal of systemic acquired resistance in tobacco. *The Plant Cell*, 7, 161-1701.
- Siddiqui, Z.A. 2006. PGPR: Prospective biocontrol agents of plant pathogens, pp. 111-142. In: Siddiqui, Z. A. (Ed.), *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*, Springer, The Netherlands.

- Siddiqui, Z.A., 2004. Effect of plant growth promoting bacteria and composed organic fertilizers on the reproduction of *Meloidogyne incognita* and tomato growth. *Bioresource Technology*, 95, 223-227.
- Siegler, F.A. and Bowman, J.J., 1940. Crown gall of peach in the nursery. *Phytopathology*, 30, 417-26.
- Silva, H.S.A. and Romerio, R.S., 2001. Isolation and selection of actinomycetes antagonistic to *Agrobacterium tumefaciens*. *Revista Ceres*, 48(277), 285-291.
- 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, J. and Dhiman, J.S., 2004. Peach replant problem: assessments and investigation. *Acta Horticulturae*, 662, 419-422.
- Slater, S.C., Barry, S.G., Goodner, B., Setubal, J.C., Farrand, S.K., Nester, E.W., Burr, J., Banta, L., Dickerman, A.W., Paulsen, I., Otten, L., Suen, G., Welch, R., Almeida, E., Godsy, E. and Heisel, S., 2009. Genome sequences of three *Agrobacterium* biovars help elucidate the evolution of multichromosome genomes in bacteria. *Journal of Bacteriology*, 191(8), 2501-2511.
- Slinkard, K. and Singleton, V.L., 1977. Total phenol analyses: automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28, 49-55.
- Slota, J.E. and Farrand, S.K., 1982. Genetic isolation and physical characterization of pAgK84, the plasmid responsible for agrocin 84 production. *Plasmid*, 8, 175-186.
- Smith, C.O., 1939. Susceptibility of species of Cupressaceae to crown gall as determined by artificial inoculation. *Journal of Agricultural Research*, 12, 919-925.
- Smith, E.F. and Townsend, C.O., 1907. A plant tumor of bacterial origin. *Science*, 25, 671-673.
- Smith, E.F., 1911. Crown gall of plants. *Phytopathology*, 1, 7-11.
- Smith, R.H. and Hood, E.E., 1995. *Agrobacterium tumefaciens* transformation of monocotyledons. *Crop Science*, 35, 301-309.
- Spiers, A.G., 1979. Isolation and characterization of *Agrobacterium* strains. *Journal of Agricultural Research*, 22, 631-636.
- Stabb, W.V., Jacobson, L.M. and Handelsman, J., 1994. Zwittermicin A producing strains of *Bacillus cereus* from diverse soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 4404-4412.
- Stanojkovic, A., Pivic, R. and Josic, D., 2009. The possibility of using plant extracts in control of *Agrobacterium tumefaciens* (Schmit and Townsend) Conn. 4th International Symposium on Agriculture, Croatian.
- Stapp, C. and Bortels, H., 1931. Der Pflanzenkrebs und sein Erreger, *Pseudomonas tumefaciens*. I. Mitteilung: Konstitution und Tumorbildung der Wirtspflanze. *Z. Parasitenk*, 3, 654-663.
- Staskawicz, B.J., Ausubel, F.M., Baker, B.J., Ellis, J.G. and Jones, J.D., 1995. Molecular genetics of plant disease resistance. *Science*, 268, 661-667.

- Steel, C.C. and Greer, L.A., 2005. Catalase activity and susceptibility of grapevine callus culture (cv. *Cabernet Sauvignon*) to *Botrytis cinerea* infection: Effects of UV-B exposure. *Vitis*, 44(3), 149-150.
- Sule, S., 1978a. Biotypes of *Agrobacterium tumefaciens* in Hungary. *Journal of Applied Bacteriology*, 44, 207-213.
- Sule, S., 1978b. Biological control of crown gall with peat cultured antagonist. *Phytopathologische Zeitschrift*, 91, 273-275.
- Sule, S., 1994. Biological control of *Agrobacterium* caused root crown gall of stone fruits, *Novenyvedelem*, 30, 568.
- Sung, N., Keun, K. and Sung, H.C., 1993. Isolation of soil bacteria secreting raw-starch digesting enzyme and the enzyme production. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 3, 99-107.
- Surekha, C.H., Neelapu, N.R.R., Kamala, G., Siva Prasad, B. and Sankar Ganesh, P., 2013. Efficacy of *Trichoderma viride* to induce disease resistance and antioxidant responses in legume vigna mungo infested by *Fusarium oxysporum* and *Alternaria alternata*. *International Journal of Agricultural Science and Research*, 3(2), 285-294.
- Suzuki, K.Y., Hattori, M., Uraji, N., Ohta, N., Iwata, K. and Murata, K., 2001. Complete nucleotide sequence of plant tumor inducing plasmid. *Gene*, 242, 331-336.
- Tabarraei, M., Amini, J. and Harighi, B., 2011. Effects of fluorescent *Pseudomonads* for control of damping-off disease of cantaloupe caused by *Phytophthora drechsleri*. *Australian Journal of Crop Science*, 5, 1427-1433.
- Taghavi, S., Garafola, C., Monchy, S., Newman, L., Hoffman, A. and Weyens, N., 2009. Genome survey and characterization of endophytic bacteria exhibiting a beneficial effect on growth and development of poplar trees. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 748-757.
- Tarbah, F.A. and Goodman, R.N., 1987. Systemic spread of *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3 in the vascular system of grapes. *Phytopathology*, 77, 915-920.
- Tariq, M., Hameed, S., Yasmeen, T. and Zahid, M., 2014. Molecular characterization and identification of plant growth promoting endophytic bacteria isolated from the root nodules of pea (*Pisum sativum* L.). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30, 719-725.
- Taşğın, E., Atıcı, Ö., Nalbantoğlu, B. and Popova, L.V., 2006. Effects of salicylic acid and cold treatments on protein levels and on the activities of antioxidant enzymes in the apoplast of winter wheat leaves. *Phytochemistry*, 67, 710-715.
- Tawfik, A.E., 1990. Comparison of biological and chemical soil treatments for controlling crown gall in peach. *Agricultural Research Review*, 68, 555-561.
- Thomidis, T., Exadaktylou, E. and Tsipouridis, C., 2005. Susceptibility of five *Prunus* rootstocks to *Agrobacterium tumefaciens*. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 33, 343-345.
- Thompson, D.V., Melchers, L.S., Idler, K.B., Schilperoort, R.A. and Hooykaas, P.J., 1988. Analysis of the complete nucleotide sequence of the *Agrobacterium tumefaciens* virB operon. *Nucleic Acids Research*, 16, 4621-4636.
- Thomson, J.A. 1986. The potential for biological control of crown gall disease on grapevines. *Trends in Biotechnology*, 4, 219-224.

- Tiwari, K. and Thakur, H.K., 2014. Diversity and molecular characterization of dominant *Bacillus amyloliquefaciens* (JNU-001) endophytic bacterial strains isolated from native Neem varieties of Sanganer region of Rajasthan. *Journal of Biodiversity, Bioprospecting and Development*, 1, 115.
- Tjamos, E.C. and Paplomatas, E.J. 1988. Long term effect of soil solarization in controlling *Verticillium* wilt of globe artichokes in Greece. *Plant Pathology*, 37, 507-515.
- Tkalec, M., Car, D., Gospocic, J., Krizaic I., Duz, K. and Vidakovic Cifrek, Z., 2012. Response of *Kalanchoe daigremontiana* to wounding and infection with *Agrobacterium tumefaciens*. 114(1), 83-90.
- Tolba, I.H. and Soliman, M.A., 2013. Efficacy of native antagonistic bacterial isolates in biological control of crown gall disease in Egypt. *Annals of Agricultural Science*, 58(19), 43-49.
- Tolba, I.H. and Soliman, M.A., 2014. Phenotypic and Molecular Characterization of Tumorigenic *Agrobacterium tumefaciens* Strains Isolated from Rose Plant in Egypt, *Middle East Journal of Agriculture Research*, 3(4), 1002-1014.
- Turan, M., Nikerel, E., Kaya, K., Kitir, N., Gunes, A., Pour Mokhtari, N.E., Tüfenkçi, Ş., Karaman M.R. and Çimrin, M.K., 2017. Enzyme dynamic in plant nutrition uptake and plant nutrition. <http://dx.doi.org/10.5772/66938>.
- Türkan, İ., Bor, M., Özdemir, F. and Koca, H., 2005. Differential responses of lipid peroxidation and antioxidants in the leaves of drought-tolerant *P. acutifolius* gray and drought-sensitive *P. vulgaris* L. subjected to polyethylene glycol mediated water stres. *Plant Science*, 168, 223-231.
- Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK), www.tuik.gov.tr, (13.05.2018).
- Tzfira, T. and Citovsky, V., 2007. *Agrobacterium*-mediated transformation of plants: Biology and Biotechnology, *Current Opinion in Biotechnology*, 17, 147-154.
- Tzfira, T., Jianxiong, Li., Lacroix, B. and Citovsky, V., 2004. *Agrobacterium* T-DNA integration: molecules and models (Trends in Genetics). Department of Biochemistry and Cell Biology, State University of New York, Stony Brook, NY, 20(8), 375-383, USA.
- Utkhede, R.S. and Smith, E.M., 1990. Effect of fumigants and *Agrobacterium radiobacter* strain 84 in controlling crown gall of apple seedlings. *Journal of Phytopathology*, 128, 265-270.
- Utkhede, R.S. and Smith, E.M., 1993 Evaluation of biological and chemical treatments for control of crown gall on young apple trees in the Kootenay valley of British Columbia. *Journal of Phytopathology*, 137, 265-271.
- Vaughan, D. and Malcolm, R.E., 1985. Soil organic matter and biological activity, developments in plant and soil sciences, Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk, Springer, Netherlands, 16, ISBN 978-94-009-5105-1.
- Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P. and Verstraete, W., 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(4), 655-671.
- Vicedo, B., Penlaver, R., Asins, M.J. and Lopez, M.M., 1993. Biological control of *Agrobacterium tumefaciens* colonization and pAgK84 transfer of the Ti plasmid of *Agrobacterium radiobacter* K84 and Tra-mutant strain K1026. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 309-315.

- Voisard, C., Keel, C., Haas, D. and Defago, G. 1981. Cyanide production in *Pseudomonas fluorescens* helps suppress black root rot of tobacco under gnotobiotic conditions. *EMBO Journal*, 8, 351-358.
- Vrain, T.C. and Copeman, R.J., 1987. Interactions between *Agrobacterium tumefaciens* and *Pratylenchus penetrans* in the roots of two red raspberry cultivars. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 9, 236-240.
- Wang, H., Wang, H.M., Wang, J.H. and Hg, T.B., 2000. The pathogen of crown gall disease on flowering cherry and its sensitivity to strain K1026. *European Journal of Plant Pathology*, 106, 475-479.
- Wang, H.M., Liang, Y.J., Yun, T. and Di, Y.B., 1991. Biological control of crown gall with introduced K84 in China. I. Investigation and identification of *Agrobacterium tumefaciens*. *Acta Agriculturae Universitatis Pekinensis*, 17, 91-94.
- Wang, P., Yin, L., Liang, D., Li, C., Ma, F. and Yue, Z., 2012. Delayed senescence of apple leaves by exogenous melatonin treatment: toward regulating the ascorbate-glutathione cycle. *Journal of Pineal Research*, 53, 11-20.
- Ward, D.V., Draper, O., Zupan, J.R. and Zambryski, P.C., 2002. Peptide linkage mapping of the *Agrobacterium tumefaciens* vir-encoded type IV secretion system reveals protein subassemblies. *PNAS*, 99, 11493-11500.
- Ward, J.E., Akiyoshi, D.E., Regier, D., Datta, A., Gordon, M.P. and Nester E.W., 1988. Characterization of the virB operon from an *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid. *Journal of Biology and Chemistry*, 263, 5804-5814.
- Watson, B., Currier, T.C., Gordon, M.P., Chilton, M.D. and Nester, E.W., 1975. Plasmid required for virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Bacteriology*, 123, 255-264.
- Wazir, F.K., Meladul, K., Qureshi, J.A, Barech, A.R. and Kakar, K.M., 2002. Effect of physical and biological control measures on colt rootstock of cherry grown on crown gall infested soil. *Sarhad Journal of Agriculture*, 16(1), 49-51.
- Weller, D.M., 1988. Biocontrol of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annual Review Phytopathology*, 26, 379-407.
- Whipps, J.M., 2001. Microbial interaction and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, 52, 487-511.
- White, L.O., 1972. The taxonomy of crown gall organism *Agrobacterium tumefaciens* and its relationship to *Rhizobia* and the other *Agrobacterium*. *Journal of General Microbiology*, 77, 565-574.
- Wicks, T.J., Haque, M.I. and Doolan, D.W., 1993. Crown gall on stone fruits in the Northern areas of Pakistan. *Plant Protection Bulletin*, 41(1), 23-28.
- Willems, A. and Collins, M.D., 1993. Phylogenetic analysis of *Rhizobia* and *Agrobacteria* based on 16S rRNA gene sequences. *International Journal of Systematically Bacteriology*, 43, 305-313.
- Wilson, M., 1997. Bio-control of aerial plant diseases in agriculture and horticulture: current approaches and future prospects. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 19, 188-191.
- Winterbourn, C.C., Hawkins, R.E., Brian, M. and Carrell, R.W., 1975. The estimation of red cell superoxide dismutase activity. *Journal of Laboratory Clinical Medicine*, 85, 337-341.

- Xiao, L., Xie, C.C., Cai, J., Lin, Z.J. and Cheun, Y.H., 2009. Identification and characterization of a chitinase producing *Bacillus* showing significant antifungal activity. *Current Microbiology*, 58(5), 528.
- Yadav, N.S., Vanderleyden, J., Bennet, D.R., Barnes, W.M. and Chilton, M.D., 1982. Short direct repeats flank T-DNA on a nopaline Ti plasmid. *PNAS*, 79, 6322-6326.
- Yakabe, L.E., Parker, S.R. and Klupphel, D.A., 2012. Role of systemic *Agrobacterium tumefaciens* populations in crown gall incidence on walnut hybrid rootstock Parodox. *Plant Diseases*, 96(10), 1415-1421.
- Yamankaradeniz, R., 1981. Beslenme ve sağlık yönünden meyvelerin önemi. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 12(1), 183-193.
- Yang, D.M., Bi, Y., Chen, X.R., Ge, Y.H. and Zho, J., 2006. Biological control of postharvest diseases with *Bacillus subtilis* (B1 strain) on musk melon (*Cucumis melo* cv. Yindi). *Acta Horticulture*, 712, 735-740.
- Yangui, T., Rhouma, A., Gargouri, K., Triki, M.A. and Bouzi, J., 2008. Efficacy of olive mill waste water and its derivatives in the suppression of crown gall disease of bitter almond. *European Journal of Plant Pathology*, 122, 495-504.
- Yıldızıtugay, E., Konakçı, C.Ö. and Küçükök, M., 2014. Exogenous nitric oxide (as sodium nitroprusside) ameliorates polyethylene glycol-induced osmotic stress in hydroponically grown maize roots. *Journal of Plant Growth Regulation*, 33, 683-696.
- You, J.F., Xie, X.M., Chen, P.M., Ma, D.Q. and Xiang, W.N., 1986. The incidence of crown gall disease of grapevine in China and its chemical control. *Acta Phytophylactica Sinica*, 13, 145-150.
- Youcef-Ali, M., Kacem Chaouche, N., Dehimat, L., Bataiche, I., Kara Ali, M., Cawoy, H. and Thonart, P., 2014. Antifungal activity and bioactive compounds produced by *Bacillus mojavensis* and *Bacillus subtilis*. *African Journal of Microbiology Research*, 8(6), 476-484.
- Young, J.M., Kuykendall, L., Martinez, D., Romero, E., Kerr, A. and Sawda, H., 2001. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51, 89-103.
- Yüzbaşıoğlu-Geylani, E., 2014. Farklı Konukçu Bitkilerden İzole Edilen *Agrobacterium tumefaciens* İzolatlarının Fenotipik ve Genotipik Karakterizasyonu. *Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana*, 104s.
- Zaenen, I., Van Larebeke, N., Teuchy, H., Van Montagu, M. and Schell, J., 1974. Supercoiled circular DNA in crown gall inducing *Agrobacterium* strains. *Journal of Molecular Biology*, 86, 109-127.
- Zhang, C.M., Lu, S.H., Wei, C.M. and Zhao, J.H., 1991. Bacterium strain 1-1-4 *Pseudomonas fluorescens* for biocontrol of peach crown gall disease. *Acta Agriculturae Shanghai*, 7(4), 65-69.
- Zhang, J. and Dou, H., 2002. Evaluation of *Bacillus subtilis* as potential biocontrol agent for postharvest green mold control on Valencia orange. *Proc. Fla. State Horticulture Society*, 115, 60-64.
- Zhu, J. and Oger, P.M., Schrammeijer, B., Hooykaas, P.J., Farrand, S.K. and Winans, S.C., 2000. The bases of crown gall tumorigenesis. *Journal of Bacteriology*, 182, 3885-3895.

- Zhu, J., Dong, CH. and Zhu, J., 2007. Interplay between coldresponsive gene regulation, metabolism and RNA processing during plant cold acclimation. *Current Opinion in Plant Biology*, 10(3), 290-295.
- Zoina, A. and Raio, A., 1999. Susceptibility of some peach rootstocks to crown gall. *Journal of Plant Pathology*, 81(3), 181-187.
- Zoina, A. and Simeone, A.M., 1989. Sensitivity to crown gall in micropropagated peaches. *Acta Horticulturae*, 254, 25-28.
- Zupan, J.R. and Zambryski, P., 1995. Transfer of T-DNA from *Agrobacterium* to the plant cell. *Plant Physiology*, 107, 1041-1047.



ÖZGEÇMİŞ

31 Ekim 1985 Yılında Ankara’da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Ankara’da tamamladı. 2005 Yılında Gazi Üniversitesi, Kırşehir Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü’nde Lisans eğitime başladı. 2009 Yılında Ahi Evran Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans eğitime başladı ve ders aşamasını tamamladıktan sonra çalışmalarını yapmak üzere ODTÜ’de bulundu. 2013 Yılında yüksek lisans eğitimi tamamlayarak Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilim Dalı’nda Doktora eğitime başladı. 2015 Yılında Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü’ne Araştırma Görevlisi olarak atandı ve Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Bölümü’nde Doktora eğitime devam etti. Halen aynı birimdeki görevine devam etmektedir.