



T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FASULYE HALE YANIKLIĞI HASTALIĞININ (*Pseudomonas syringae* pv.
phaseolicola) BİYOLOJİK MÜCADELESİNDE ENDOFİT
BAKTERİLERİN ETKİNLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Kamil DUMAN

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

**HATAY
OCAK-2020**



T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FASULYE HALE YANIKLIĞI HASTALIĞININ (*Pseudomonas syringae* pv.
phaseolicola) BİYOLOJİK MÜCADELESİNDE ENDOFİT
BAKTERİLERİN ETKİNLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Kamil DUMAN

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

**HATAY
OCAK-2020**

T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FASULYE HALE YANIKLIĞI HASTALIĞININ (*Pseudomonas syringae* pv.
phaseolicola) BİYOLOJİK MÜCADELESİNDE ENDOFİT BAKTERİLERİN
ETKİNLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Kamil DUMAN

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

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

Prof. Dr. Soner SOYLU
Başkan

Prof.Dr. Şener KURT
Üye

Prof.Dr. Mustafa MİRİK
Üye

Doç.Dr. D. Soner AKGÜL
Üye

Dr.Öğr. Üyesi İ. Adem BOZKURT
Üye

Kod No: 105

Doç. Dr. Cengiz KARACA
Enstitü Müdürü

Proje No: Metin girmek için burayı tıklatın.

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

24.01.2020

TEZ BİLDİRİMİ

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

Kamil DUMAN

ÖZET

FASULYE HALE YANIKLIĞI HASTALIĞININ (*Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*) BİYOLOJİK MÜCADELESİNDE ENDOFİT BAKTERİLERİN ETKİNLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L) içerdiği önemli protein ve besin maddeleri açısından insan beslenmesinde büyük öneme sahip önemli bir baklagil bitkisidir. Son yıllarda yaşanan anormal iklim koşulları ve düzensiz yağışlar nedeni ile hastalık sıklıkla karşılaşılabilecek hale gelmiştir. Fasulye Hale Yanıklığı, tohum kaynaklı bir patojen *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (*Psp*) etmeninin neden olduğu, ülkemiz ve Dünya fasulye üretimi için büyük tehdit oluşturan bir hastalıktır. Bu çalışmanın amacı; (1) fasulye üretiminin yoğun olarak yapıldığı alanlardan elde edilen bitki gelişimini teşvik eden endofit bakterilerin (endofit) izolasyonu ve tanımlanması; (2) endofitlerin hastalık etmenine *in vitro* ve *in vivo* koşullarda oluşturdukları antagonistik etkinin ortaya konulması; (3) siderofor, proteaz, amonyum üretimi, indole-3 acetic acid (IAA) üretimi ve fosforu çözme özellikleri gibi antagonistik ve bitki gelişimini teşvik edici (PGP) mekanizmaların kalitatif ve kantitatif olarak tespit etmektir.

Niğde, Konya, Eskişehir, Burdur ve Ankara illerinden toplanan sağlıklı fasulye bitki örneklerinden toplam 343 farklı endofit bakteri (EB) izole edilmiştir. İzole edildiği bölge, bitki aksamı, morfolojik ve biyokimyasal özellikleri, patojenisite testleri ve MALDI-TOF analizleri sonucunda 56 farklı EB izolatı temsili olarak seçilmiş ve ikili kültür testleri ile hastalık etmeni *Psp*'ya karşı *in vitro* antagonistik etkinlikleri belirlenmiştir. EB izolatlarının ikili kültür testlerinde antagonistik etkinlikleri 1.22-4.85 indeks değerleri arasında değişiklik göstermiştir. Test edilen 56 EB izolatı arasında, 14 izolat yüksek engelleme etkisi [Antagonistik indeks değeri>3.0], 20 izolat orta düzeyde engelleme etkisi [Antagonistik indeks 2.0-3.0], 22 izolat ise düşük engelleme etkisi [Antagonistik indeks<2.0] göstermiştir. EB izolatları arasında en yüksek antagonistik etkiyi 4.85 antagonistik indeks değeri ile *Pseudomonas gessardii* N35.1 izolatınca gösterilmiş olup bu izolatı sırası ile *Arthrobacter ilicis* N11.3, *Stenotrophomonas* sp B6.6, *Achromobacter spanius* B1.1, *Pseudomonas putida* K15.1 ve *Arthrobacter gandavensis* N19.1 izolatları takip etmişlerdir. Testlenen 56 EB izolatından, 54 EB izolatı siderofor üretimi, 23 EB proteaz üretimi ve 12 EB farklı değerlerde fosforu çözme etkinliği göstermiştir. Tüm izolatlar farklı konsantrasyonlarda IAA üretmiştir. 56 izolat arasından seçilen 32 antagonist EB izolatı koparılmış meyve testi ve saksı testlerinden oluşan *in vivo* testlemelere alınmıştır. Seçilen izolatlar arasından *Pseudomonas gessardii* N35.1, *Arthrobacter nicotinovorans* B11.2, *Stenotrophomonas* sp B6.6, *Arthrobacter ilicis* N11.3, *Achromobacter spanius* B1.1, *Pseudomonas putida* K15.1 ve *Arthrobacter gandavensis* N19.1 izolatları *Psp* etmeninin meyvelerde ve yapraklarda oluşturduğu hastalık belirtilerini baskılamada değişen değerlerde olmakla beraber yüksek etkinlik göstermişlerdir. *Stenotrophomonas* sp E13.1, *Pseudomonas gessardii* N35.1 ve *Arthrobacter nicotinovorans* B11.2 izolatları kaplama yapıldıkları tohumlarda bitki gelişimini önemli ölçüde teşvik etmişlerdir.

Bu çalışma ile EB izolatları arasında yer alan *Pseudomonas gessardii* N35.1, *Arthrobacter nicotinovorans* B11.2, *Stenotrophomonas* sp B6.6, *Arthrobacter ilicis* N11.3, *Achromobacter spanius* B1.1, *Pseudomonas putida* K15.1 ve *Arthrobacter gandavensis* N19.1 izolatları göstermiş oldukları yüksek biyo-kontrol ve bitki gelişimini teşvik özellikleri ile fasulye hale yanıklığı hastalığı ile mücadelede biyo-kontrol etmeni olarak kullanılabilme potansiyeline sahip izolatlar olarak değerlendirilmiştir.

2020, 129 sayfa

Anahtar Kelimeler: Fasulye, biyolojik mücadele, *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, endofit bakteri, antagonist

ABSTRACT

INVESTIGATION OF EFFICACIES OF ENDOPHYTIC BACTERIA IN THE BIOLOGICAL CONTROL OF HALO BLIGHT DISEASE OF BEAN (*Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*)

The common bean (*Phaseolus vulgaris* L) is one of the most important legumes in the human diet and serves as a significant source of proteins. In recent years, bacterial disease incidences were frequently reported in major bean production areas due to abnormal rainfall and high fluctuating temperature and constitute serious constraints in bean crops. Bacterial halo blight of bean, caused by seed-borne *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (*Psp*), is a serious threat for bean production not only in Turkey but also worldwide. The present study was conducted to (1) isolate and identify diversity of endophytic plant growth promoting bacterial isolates (EB) from healthy bean plants grown in different major bean producing provinces; (2) to screen antagonistic potentials of EB on bacterial growth and disease incidence *in vitro* and *in vivo* conditions; (3) to determine antagonistic and plant growth promoting (PGP) traits such as siderophore, protease, ammonium, indole-3-acetic acid (IAA) production and phosphate solubilisation by EB qualitatively and quantitatively.

A total of 343 putative EB were obtained from different parts of healthy bean plant growing in Niğde, Konya, Eskişehir, Burdur and Ankara provinces. Fifty-six representatives putative EB were selected based on regions, biochemical and pathogenicity tests and identified in species level by morphological characterization and MALDI-TOF analyses. By using dual culture test, EB isolates were screened to inhibit *Psp* *in vitro* conditions. The results from the dual culture test, inhibition of *Psp* growth by EB, varied widely and significantly among isolates, with antagonistic index values ranging from 1.22 to 4.85. Among the 56 antagonist EB isolates, 14 isolates showed strong inhibition (inhibition indices >3.0), 20 isolates moderate inhibition (inhibition indices between 2.0-3.0), 22 isolates weak inhibition (inhibition indices >2). The highest antagonistic activities were displayed by EB isolates *Pseudomonas gessardii* N35.1 (4.85 inhibition index) followed by *Arthrobacter ilicis* N11.3, *Stenotrophomonas* sp B6.6, *Achromobacter spanius* B1.1, *Pseudomonas putida* K15.1 and *Arthrobacter gandavensis* N19.1, respectively. Among the screened EB, 54 isolates were positive for the production of siderophore, 23 isolates positive for protease production and 12 isolates solubilised phosphate in varying degree. All selected EB isolates produced IAA and ammonia in relatively varying concentrations. The 32 antagonist EB isolates were further evaluated for their biocontrol efficacy on bean pods and leaves *in vivo* experiment. Although all isolates suppressed bacterial disease incidence varying ratios, isolates of *Pseudomonas gessardii* N35.1, *Arthrobacter nicotinovorans* B11.2, *Stenotrophomonas* sp B6.6, *Arthrobacter ilicis* N11.3, *Achromobacter spanius* B1.1 ve *Pseudomonas putida* K15.1 and *Arthrobacter gandavensis* N19.1 showed significant biocontrol activities against disease caused by *Psp* on bean pods and leaves. Seed coating by EB isolates *Stenotrophomonas* sp E13.1, *Pseudomonas gessardii* N35.1, *Arthrobacter nicotinovorans* B11.2 promoted seedling growth and development significantly.

The biocontrol and plant growth promoting and activities displayed by *Pseudomonas gessardii* N35.1, *Arthrobacter nicotinovorans* B11.2, *Stenotrophomonas* sp B6.6, *Arthrobacter ilicis* N11.3, *Achromobacter spanius* B1.1 ve *Pseudomonas putida* K15.1 and *Arthrobacter gandavensis* N19.1 isolates identified in this study highlight their potential suitability as a biocontrol bacterial agents against halo blight disease of bean.

2020, 129 pages

Key Words: Bean, biological control, *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, endophytic bacteria, seed

TEŞEKKÜR

Mesleki ve akademik hayatımda önemli kararlar almam gerektiğinde sürekli yanımda olan ve varlığı ile benim için önemli bir rol model oluşturan, gerek doktora tez konumunun belirlenmesinde gerek araştırılması ve yazımı sırasında sahip olduğu bilgi birikimi ve tecrübesi ile çalışmalarına ışık tutan ve yardımını esirgemeyen **saygıdeğer danışman hocam** Prof. Dr. Soner SOYLU'ya sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez konusumun belirlenmesi ve çalışmaların takibinde profesyonel yaklaşımları ve öngörülerini ile doktora çalışmalarımı zenginleştiren ve yardımlarını esirgemeyen Tez İzleme Komitesi üyesi **değerli büyüklerim** Prof. Dr. Yeşim AYSAN ve Dr. Öğr. Üyesi İ. Adem BOZKURT'a, tez çalışmalarım sırasında tüm bölüm olanaklarından yararlanmamı sağlayan Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi (HMKÜ) Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölüm Başkanlığı'na ve HMKÜ Bitki Sağlığı Kliniği Uygulama ve Araştırma Merkezi Müdürlüğüne, Zirai Mücadele Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü (ZMMAE)'ne ve ZMMAE Bitki Hastalıkları Bölüm Başkanlığı ve **değerli bölüm başkanım** Dr. Aynur KARAHAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım süresince, tüm laboratuvar çalışmalarında yapmış oldukları katkı ve yardımları nedeniyle **değerli kardeşlerim** Ar.Gör. Merve KARA ve Öğr.Gör. Dr. Aysun UYSAL'a ve **değerli ablam** Leyla EDEK'e, çalışmalarım esnasında elde ettiğim verilerin istatistiki değerlendirmelerini yapabilmem için istatistik konularında bilgilerini benimle paylaşan **kıymetli kardeşim** Dr. Mustafa ALKAN'a çok teşekkür ederim.

Çalışmalarım süresince birlikte hareket ettiğim, fikir alışverişi yaptığım, tecrübelerimi paylaştığım, bilgi ve önerilerinden faydalandığım değerli **yol arkadaşım ve meslektaşım** Zir. Yük. Müh. Melike Serap SÜLÜ'ye katkılarından dolayı çok teşekkür ederim.

Eğitim ve meslek hayatım boyunca beni maddi ve manevi olarak destekleyen, güvenen ve daima yanımda olan **canım aileme**; manevi desteği, ilgisi, güveni, sonsuz sabrı, anlayışı ile daima yanımda olan **biricik hanımım** Dr. Tuba DUMAN'a ve varlığı ile etrafına neşe ve pozitif enerji saçan **oğlum** Muhammed'e, sonsuz minnet ve şükranlarımı sunarım. **İyi ki varsınız.**

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VII
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	X
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	XI
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	14
2.1. Hastalık Etmeni <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> 'nın Tespiti ve Tanısı.....	14
2.2. Hastalık Etmenin Biyolojisi, Ekolojisi, Yayılışı ve Ekonomik Önemi.....	14
2.3. Hastalıkla Mücadele Yolları	18
2.3.1. Kültürel ve Fiziksel Önlemler.....	18
2.3.2. EB İzolatlarının Bitki Hastalıkları ile Biyolojik Mücadelede Kullanımı... ..	22
2.3.3. EB İzolatların Bitki Gelişimini Teşvik Edici Özelliklerinin Araştırılması.....	27
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	32
3.1. Materyal.....	32
3.2. Yöntem.....	32
3.2.1. Sörvey Çalışmaları.....	32
3.2.2. Çalışmalarda Kullanılan Besi Yerleri ve İçerikleri.....	34
3.2.3. Aday EB İzolatlarının İzolasyonu.....	35
3.2.4. Fasulye Hale Yanıklığı Hastalık Etmeni <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> (<i>Psp</i>)'nın İzolasyonu	36
3.2.5. İzole Edilen Aday EB İzolatlarının Ön Seçimi.....	37
3.2.6. Aday EB İzolatlarının Tanılanması.....	40
3.2.7. Fasulye Hale Yanıklığı Hastalığı Etmeni <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> 'nın Tanılanması.....	41
3.2.7.1. Hastalık Etmeninin Biyokimyasal, Morfolojik ve Patojenisite Yöntemleri ile Tanılanması.....	41
3.2.7.2. Hastalık Etmeninin Moleküler Yöntemlerle Tanılanması.....	44
3.2.8. <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> İzolatlarının Virülenslik Düzeylerinin Belirlenmesi.....	46
3.2.9. Aday EB İzolatların <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> 'ya Karşı <i>in vitro</i> Antagonistik Etkinliğinin Belirlenmesi.....	47
3.2.10. EB İzolatlarının Antagonistik ve Bitki Gelişimini Teşvik Etmede Kullandıkları Mekanizmalarının <i>in vitro</i> Koşullarda Belirlenmesi.....	47
3.2.10.1. EB İzolatlarının Siderofor Üretme Potansiyellerinin Belirlenmesi.....	48

3.2.10.2. EB İzolatlarının Proteaz Enzim Üretme Potansiyellerinin Belirlenmesi.....	49
3.2.10.3. EB İzolatlarının Amonyak (NH ₃) Üretim Potansiyellerinin Belirlenmesi.....	49
3.2.10.4. EB İzolatlarının Indol-3-Asetik Asit (IAA) Üretimin Potansiyellerinin Belirlenmesi.....	50
3.2.10.5. EB İzolatlarının İnorganik Fosforu (P) Çözme Potansiyellerinin Belirlenmesi.....	52
3.2.11. EB İzolatlarının <i>in vivo</i> Koşullarda Hastalık Çıkışına ve Bitki Gelişimine Olan Etkilerinin Belirlenmesi.....	53
3.2.11.1. Koparılmış Meyve Testlemeleri ile EB İzolatlarının Hastalık Çıkışını Engelleme Potansiyellerinin Belirlenmesi (Yarı <i>in vivo</i>)....	53
3.2.11.2. EB İzolatlarının Fasulye Yaprakları Üzerinde Hastalık Çıkışını Engelleme Potansiyellerinin Belirlenmesi (<i>in vivo</i> Saksı Denemeleri).....	54
3.2.11.3. EB İzolatlarının Bitki Gelişimine Olan Etkilerinin Belirlenmesi.....	56
3.2.12. Deneme Deseni ve İstatistiki Analizler.....	57
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	58
4.1. Sörvey Çalışmaları.....	58
4.2. Aday EB İzolatlarının İzolasyonu.....	60
4.3. Fasulye Hale Yanıklığı Etmeni <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> 'nın İzolasyonu.....	61
4.4. Aday EB İzolatlarının Seçimine Yönelik Ön Testler.....	61
4.4.1. Aday EB İzolatlarının Tanılanması	63
4.5. Fasulye Hale Yanıklığı Hastalığı Etmeni <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> 'nın Tanılanması.....	69
4.6. Aday EB İzolatlarının <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> 'ya Karşı <i>in vitro</i> Antagonistik Etkinliklerinin Belirlenmesi.....	73
4.7. EB İzolatlarının Hastalık Gelişimini Engelleme (Antagonistik) ve Bitki Gelişimini Teşvik Eden Mekanizmalarının Belirlenmesi.....	76
4.7.1. EB İzolatların Siderofor Üretme Potansiyellerinin Belirlenmesi.....	76
4.7.2. EB İzolatlarının Proteaz Enzimi Üretme Potansiyellerinin Belirlenmesi.....	80
4.7.3. EB İzolatlarının Amonyak (NH ₃) Üretim Potansiyellerinin Belirlenmesi.....	83
4.7.4. EB İzolatlarının Indol Asetik Asit (IAA) Üretme Potansiyellerinin Belirlenmesi.....	85
4.7.5. EB İzolatlarının Fosforu (P) Çözme Potansiyellerinin Belirlenmesi...	87
4.8. EB İzolatlarının <i>in vivo</i> Hastalık Çıkışı ve Bitki Gelişimine Etkilerinin Belirlenmesi.....	95
4.8.1. EB İzolatlarının Hastalık Çıkışını Engelleme Potansiyellerinin Belirlenmesi.....	95

4.8.2. EB İzolatlarının <i>in vivo</i> Bitki Gelişimine Etkileri.....	103
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	107
KAYNAKLAR.....	114
ÖZGEÇMİŞ.....	127
EK-1.....	128
EK-2.....	129



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.	Kuru ve taze fasulye üretimi yapan ülkeler ve üretim miktarları...	2
Şekil 1.2.	Fasulye Hale Yanıklığı Hastalığı Etmeni <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> (Psp) 'nın dünya ölçeğinde yayılış alanları.....	4
Şekil 1.3.	Psp'nin fasulye yaprağında erken (A) ve ilerleyen (B) dönemlerde oluşturduğu belirtiler ve şiddetli bitki sararmaları ve yaprak dökümlerinin görüldüğü tarlalardan genel görünüm (C).....	7
Şekil 1.4.	Şekil 1.4. Fasulye Hale Yanıklığı hastalığı etmeni Psp'nin meyvede oluşturduğu ıslaklık, yağ damlası şeklinde başlayan ve ilerleyen zamanlarda bu ıslaklığın etrafını kahverengi lezyonun çevrelemesi şeklinde ortaya çıkan tipik belirtileri (ok).....	8
Şekil 3.1.	Sörveyler esnasında örneklenen hastalığın tipik belirtilerinin görüldüğü bitkiler (A ve B). Şiddetli enfeskiyon sonucu tarla genelinde oluşan genel görünüm (C)	34
Şekil 3.2.	Endofit Bakteri (EB) izolat süspansiyonlarının bütün bitkisinin yapraklarına enjeksiyon yoluyla inokulasyonu.....	38
Şekil 3.3.	Patates dilimlerinde pektolitik aktivite (yumuşak çürüklük). gösteren (A) ve Pektolitik aktivite göstermeyen izolatın belirtisi...	39
Şekil 3.4.	Fasulye meyvesi üzerinde gerçekleştirilen EB izolatlarının patojenite testi.....	40
Şekil 3.5.	Psp izolatının inokulasyondan 10 gün sonra fasulye yapraklarında oluşturduğu tipik nekrotik leke ve etrafında hale oluşumları.....	44
Şekil 3.6.	Farklı bölgelerden izole edilen ve kesin tür tanınması yapılmış Psp izolatların duyarlı Gina çeşiti fasulye meyveleri üzerinde virülenslik testi.....	46
Şekil 3.7.	İkili kültür testinde TSA üzerinde gelişen EB izolatı üzerine Psp süspansiyonunun püskürtülmesi (A) ve (B) endofit bakteri izolatı tarafından engelleme zonu.....	47
Şekil 3.8.	EB izolatlarının Blue-CAS Agar besi ortamında siderofor oluşturma potansiyellerinin belirlenmesi.....	48
Şekil 3.9.	EB izolatın SMLBA üzerinde proteaz üretme potansiyellerinin belirlenmesi.....	49
Şekil 3.10.	EB izolatları tarafından farklı miktarlarda amonyak üretimine bağlı olarak ortaya çıkan renk değişimi.....	50
Şekil 3.11.	EB izolatları tarafından üretilen IAA değerlerini belirlenmesinde baz alınan standart eğri ve farklı EB izolatları tarafından farklı konsantrasyonda oluşturulan IAA'in eliza plakasında görüntüsü...	51
Şekil 3.12.	EB'lerin Pikovskaya Agar (PVK) besi yeri üzerinde fosforu çözme potansiyelleri.....	52
Şekil 4.1.	Hastalık etmeni ve EB izolasyonu için örneklemelerin yapıldığı yağmurlama sistemi ile sulanan fasulye tarlasının genel durumu.	59

Şekil 4.2.	King B besi ortamında hastalık etmeni <i>Psp</i> 'ye ait fluoresan parlama gösteren bakteri kolonileri	61
Şekil 4.3.	EB izolatlarının tütün bitkisinde aşırı duyarlılık (HR) testi. (A), İnokulasyon noktalarında (*) HR negatif reaksiyon gösteren EB izolatları. (B), HR pozitif reaksiyon gösteren bitki patojeni ve oluşturduğu nekrotik belirtiler (ok)....	62
Şekil 4.4.	Patates dilimlerinde pektolitik aktivite (yumuşak çürüklük) testi. (A) <i>P. carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> oluşturduğu yumuşak çürüklük belirtisi. Düşük pektolitik aktivite gösteren (B) veya pektolitik aktivite göstermeyen (C) EB izolatları (*).	63
Şekil 4.5.	Farklı bölgelerden elde edilen ve MALDI-TOF ile tanılanması yapılmış EB izolatların cins düzeyinde dağılımları.....	64
Şekil 4.6.	Farklı bölgelerden elde edilen ve MALDI-TOF ile tanılanması yapılmış EB izolatların cins düzeyinde dağılımları.....	68
Şekil 4.7.	Hastalık belirtisi gösteren yaprak ve meyvelerden hastalık etmeni <i>Psp</i> 'nin izolasyonu.....	69
Şekil 4.8.	(A) Aday <i>Psp</i> izolatlarının Fasulye meyvelerine inokulasyonu, (B) 24 saat nem çemberinde bekletilmesi ve (C) <i>Psp</i> izolatlarının meyveler üzerinde farklı şiddetlerde oluşturdukları belirtiler.....	70
Şekil 4.9.	K13.1 kodlu <i>Psp</i> izolatının MALDI-TOF ile yapılan teşhis sonucu elde edilen eşleşme ve indeks değerleri.....	72
Şekil 4.10.	Farklı bölgelerden izole edilmiş <i>Psp</i> izolatlarının spesifik primerler ile tanılanması.....	72
Şekil 4.11	EB izolatlarının hastalık etmeni <i>Psp</i> 'nin gelişimini engelleme (antagonistik) potansiyelleri.	73
Şekil 4.12.	EB izolatlarının CAS Agar besiyerinde siderofor üretme potansiyelleri ve EB izolatları tarafından siderofor üretimi sonucu EB kolonisi etrafında oluşan zonlar.....	77
Şekil 4.13.	EB izolatların SMLBA üzerinde proteaz üretme potansiyellerinin belirlenmesi.....	81
Şekil 4.14.	EB izolatlarının PVK besi yeri üzerinde fosforu çözme potansiyellerinin belirlenmesi.	89
Şekil 4.15.	EB izolatlarının koparılmış fasulye meyveleri üzerinde hastalık çıkışını engelleme potansiyelleri. (A ve B) Meyve üzerinde açılan noktalara önce EB izolatlarının sonra <i>Psp</i> etmeninin uygulanması. (C) Hastalığın tamamen engellendiği inokulasyon noktalarında EB izolatlarının teşvik ettiği HR reaksiyonları....	96
Şekil 4.16.	EB izolatlarının koparılmış fasulye meyveleri üzerinde hastalık çıkışını engelleme potansiyelleri. Meyve üzerinde açılan noktalara farklı önce <i>Psp</i> etmeninin sonra EB izolatlarının uygulanması ...	96
Şekil 4.17.	Tohum EB ile kaplaması sonrası yapraktan <i>Psp</i> uygulaması, bulaştırılan bitkilerin nem çemberinde bekletilmesi ve denemelerin değerlendirmesi.....	99

Şekil 4.18.	Farklı EB uygulamalarının bitki yapraklarında hastalık çıkışı üzerine olan etkinliği.....	102
Şekil 4.19.	Tohuma EB kaplamasının bitki gelişimi üzerine olan etkinliği.....	104
Şekil4.20.	Farklı EB'ler ile kaplanan (A) ve kaplanmayan (B) tohumlardan gelişen bitkiler.....	105



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1.	Fasulyenin besin içeriği ve miktarları (100 g/dane)	1
Çizelge 1.2.	2018 yılı bölgeler bazında Türkiye’de kuru ve taze fasulye üretimi (Anonim, 2018).....	3
Çizelge 3.1.	2015 ve 2016 üretim yıllarında Sörvey yapılan illerde fasulye üretim alan ve örnekleme yapılan toplam alan, alınan örnek sayısı ve elde edilen toplam EB izolatı sayısı	33
Çizelge 4.1.	EB izolasyonu için alınan örnek sayısı, EB’nin izole edildiği bitkinin alındığı yer ve izole edildiği bitki aksamına göre elde edilen toplam EB izolat sayısı.....	60
Çizelge 4.2.	Farklı illerden elde edilen EB izolatların MALDI-TOF tanı sonuçları.....	66
Çizelge 4.3.	Fasulye üretim alanlarına yapılan Sörveylerde hastalıklı bitki örnekleri ve bu örneklerden izole edilen hastalık etmeni <i>Psp</i> izolat sayısı.....	69
Çizelge 4.4.	Farklı <i>Psp</i> izolatlarının fasulye meyveleri (cv. Gina) üzerinde yapılan virülenslik testleri sonucunda elde edilen lezyon çapı.....	71
Çizelge 4.5.	Sağlıklı fasulye bitkilerinden elde edilmiş farklı türlere EB izolatlarının hastalık etmeni <i>Psp</i> izolatına karşısında göstermiş oldukları <i>in vitro</i> antagonistik etkinliği.....	74
Çizelge 4.6.	Farklı türlere ait EB izolatlarının CAS Agar besiyeri üzerinde siderofor üretim aktiviteleri.....	78
Çizelge 4.7.	Farklı türlere ait EB izolatlarının proteolitik enzim (proteaz) aktiviteleri.....	82
Çizelge 4.8.	Farklı türlere ait EB izolatlarının amonyak üretme aktiviteleri.....	84
Çizelge 4.9.	Farklı türlere ait EB izolatlarının IAA üretim miktarları.....	86
Çizelge 4.10.	Farklı türlere ait EB izolatların fosforu çözme etkinliğinin belirlenmesi.....	89
Çizelge 4.11.	EB izolatlarının, patojeni engellemede kullandıkları biyokontrol (antagonistik engelleme, siderofor, proteaz, amonyak) ve bitki gelişimini teşvik eden (IAA ve fosfat çözünürlük) mekanizmalar....	92
Çizelge 4.12.	EB izolatlarının yarı <i>in vivo</i> koşullarda koparılmış fasulye meyveleri üzerinde hastalık çıkışını engelleme etkinliklerinin belirlenmesi.....	97
Çizelge 4.13.	Bitki yapraklarında EB izolatlarının hastalık etmeni bulaştırılmış yapraklarda hastalık çıkışını engelleme potansiyellerinin belirlenmesi ^a	100
Çizelge 4.14.	Tohuma kaplama şeklinde uygulanmış EB izolatlarının bitki gelişimine (kök, gövde, toplam bitki uzunluğu ve bitki yaş ağırlığı) olan etkileri.....	105

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

SİMGELER

°C	: Celsius (derece)
Ha	: Hektar
µg	: Mikrogram
mg	: Miligram
g	: Gram
kg	: kilogram
µL	: Mikrolitre
mL	: Mililitre
L	: Litre
µm	: Mikrometre
mm	: Milimetre
dk	: Dakika
ppm	: part per million (milyon birimde bir birim)
rpm	: rotation per minute (dakikada dönme sayısı)
kDa	: kilo Dalton
uv	: ultra viole

KISALTMALAR

ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
BCA	: Biological Control Agent
CAS	: Krom azurol S (Chrome Azurol S)
DAPG	: 2,4- diacetylphloroglucinol
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
EtBr	: Etidyum Bromür
EB	: Endofit Bakteri
FAO	: Dünya Gıda ve Tarım Örgütü (Food and Agriculture)
HCCA	: α-Cyano-4-hydroxycinnamic acid
HCN	: Hidrojen Siyanür (Hydrogen cyanade)
HR	: Hypersensitive Reaction (Aşırı Duyarlılık Tepkimesi)
IAA	: Indol 3 Asetik Asit
IMD	: Irreversible Membran Damage (Geri dönüşümsüz Membran)
KB	: King B Agar Besi yeri
Kç	: Bakteri Koloni Çapı
LB	: Luria Bertani Besi yeri
LPS	: Lipopolysaccharides
MALDI-TOF MS	: Matriks Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight
NA	: Nutrient Agar Besi Yeri

NaOCL	: Sodium Hypochlorite (Sodyum Hipoklorit)
NCBI	: The N ational C enter for B iot e chnology I nformation
PAL	: P henylalanine a mm o nia- l yase
PCN	: Phenazine-1-carboxamide
PCR	: P olimeraz C hain R eaction
PGP	: P lant G rowth P romoting
PGPB	: P lant G rowth P romoting B acteria
PGPR	: P lant G rowth P romoting R hizobacteria
POX	: P eroxidase
PPO	: P olyphenol o xidase
<i>Psp</i>	: <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>
PVK	: P ikovskaya Agar
SMLBA	: S kim M ilk içeren L uria B ertani Agar
SPSS	: S tatistical P ackage for the S ocial S ciences
TSA	: T ryptic S oybean A gar B esi Y eri
TÜİK	: T ürkiye İ statistik K urumu
<i>Xap</i>	: <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>
Zç	: Engelleme Z on Ç apı

1. GİRİŞ

Baklagiller (*Leguminosea*) yaklaşık 700 cins ve 18,000 tür ile çiçekli bitkiler içinde en kapsamlı bitki grubudur. Bu kadar geniş bir açığa sahip olan baklagiller, hayvan ve insan beslenmesinde, tıbbi bitki olarak ilaç endüstrisinde, mobilya ve kâğıt yapımında, boya ve reçine yapımı ve kozmetik sanayii gibi birçok alanda kullanılmaktadır. Ayrıca köklerindeki nodul oluşturan faydalı bakteriler vasıtasıyla biyolojik azot fiksasyonuna sahip olmaları dolayısıyla da toprak verimliliğinin artırılmasında önemli faydaları bulunmaktadır (Özdemir, 2002). Baklagiller familyasında yer alan bitkilerden en önemlilerinden birisi de fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.)'dir. Anavatanı Orta Amerika olan fasulye, Amerika kıtasının keşfi ile önce Avrupa sonra ise diğer bölgelere yayılmıştır (Graham ve Ranalli, 1997). Toplam yemeklik tane baklagil ekim alanının %49 ve toplam kuru baklagil üretiminin %37'sini oluşturan fasulyenin tarımı dünya üzerinde ılıman bölgelerde yaygınlaşmıştır. Zengin besin içeriği nedeniyle, tüm dünyada en çok tüketilen baklagillerin başında gelmektedir (Çizelge 1.1).

Çizelge 1.1. Fasulyenin besin içeriği ve miktarları (100 g/dane)

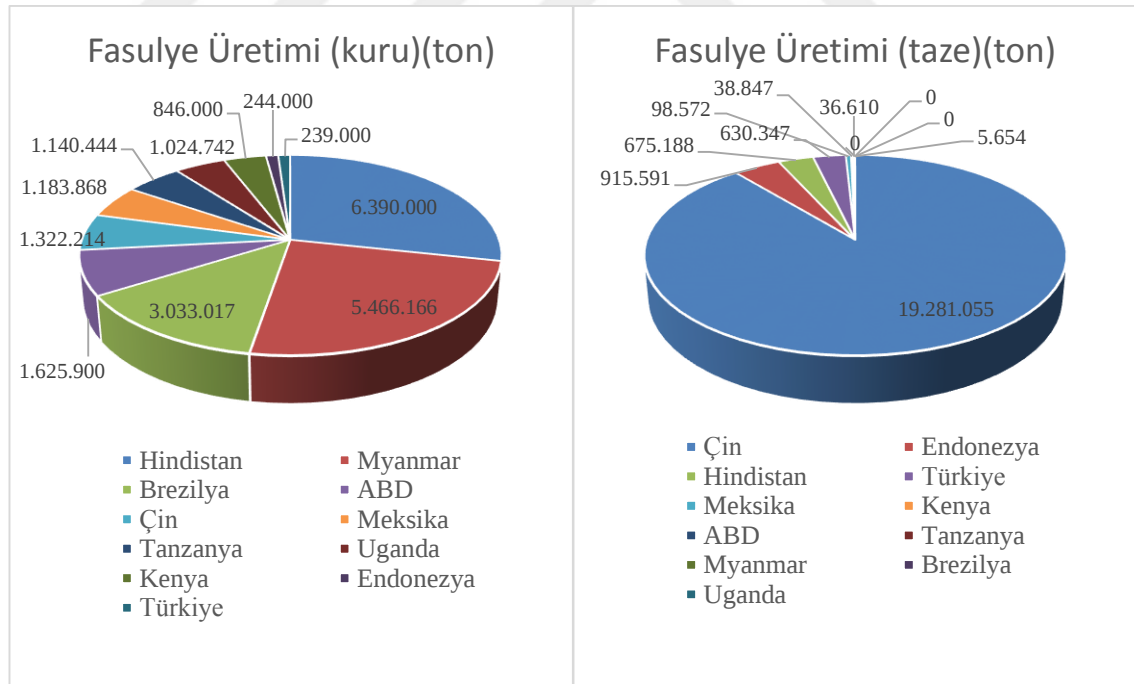
Besin İçeriği	İçerik Miktarı	Besin İçeriği	İçerik Miktarı
Su	10.1 g	Sodyum	8 mg
Protein	21.0 g	Çinko	2.6 mg
Toplam yağ	1.1 g	Bakır	0.8 mg
Karbonhidrat	64.2 g	Manganez	1.4 mg
Kalsiyum	130.0 mg	Selenyum	13 mg
Demir	6.8 mg	Thiamin	0.8 mg
Magnezyum	182.0 mg	Riboflavin	0.2 mg
Fosfor	415.0 mg	Vitamin B-6	0.5 mg
Potasyum	1,464.0 mg	Pantothenic acid	1.0 mg

http://www.usaid.gov/our_work/humanitarian_assistance/ffp/crg/fsbeansnavy

Fasulye, yemeklik tane baklagiller arasında ekim alanı ve üretim bakımından dünyada ilk sırayı almaktadır. Dünya Gıda ve Tarım Organizasyonu (FAO)'nun 2017

yılı istatistiklerine göre, Dünya genelinde 27,536,829 hektar alanda kuru fasulye ekiliş alanından toplam 31,405,912 ton ürün elde edilmiş olup, 1,579,971 Ha alanda taze fasulye ekim yapılmış ve toplam 24,221,252 ton ürün elde edilmiştir (Anonim, 2018). Ülkelere göre üretim durumlarına (ton) bakıldığında, kuru fasulye yetiştiriciliğinde Hindistan 6,390,000 ton üretim ile ilk sırayı alırken, bu ülkeyi 5,466,166 ton ile Myanmar, 3,033,017 ton ile Brezilya, 1,625,900 ton ile ABD. ve 1,322,214 ton ile Çin Halk Cumhuriyeti takip etmiş, Türkiye ise 239,000 ton üretim ile ilk 10 ülke içinde yer almamıştır. Taze fasulye yetiştiriciliğinde ise durum oldukça farklı olmuş, Çin 19,281,055 ton üretim ile ilk sırayı alırken, ikinci sırayı 915,591 ton ile Endonezya, 3. sırayı 675,188 ton ile Hindistan, 4. sırayı 630,347 ton ile Türkiye ve 5. sırayı 313.596 ton ile Tayland takip etmiştir.

Ülkemizde 2017 yılında 630.347 ton taze, 239.000 ton kuru olmak üzere toplam 869.347 ton ile dünyada fasulye tarımında 11. sıradadır (Şekil 1.1). Kuru fasulye tarımı, gelişmekte olan ülkelerde yaygın olmasına karşın, verimi gelişmiş ülkelerde daha yüksektir.



Şekil 1.1. Kuru ve taze fasulye üretimi yapan ülkeler ve üretim miktarları (Anonymous, 2017)

Ülkemizde en fazla üretimi yapılan sebze türlerinden birisi olan fasulyenin hem sahil, hem de iç bölgelerimizde yetiştiriciliği yapılmakta olup, genelde 1000 m den daha yüksek rakımlarda kolaylıkla yetişmektedir. Üretim genellikle açık tarla şartlarında sırik ve bodur tiplerle yapılmaktadır. Fasulye hem taze hem de kuru olarak değerlendirildiği gibi konserve edilerek, dondurularak, güneşte ve yapay yollarla yeşil olarak kurutulularak da tüketilmektedir. Ülkemizde yetiştirilen fasulyelerin hemen tamamı *Phaseolus vulgaris* türü içinde yer alır (Özdemir, 2002). Ülkemizin 2018 yetiştirme sezonunda hemen her yerinde taze ve kuru olarak üretilen fasulye, en fazla Orta/iç Anadolu bölgesinde yetiştirilmekte olup, bu bölgeyi Ege/Marmara, Akdeniz, Karadeniz ve diğer (Trakya, Güneydoğu ve Doğu Anadolu) bölgeleri izlemiştir (Çizelge 1.2).

Çizelge 1.2. 2018 yılı bölgeler bazında Türkiye’de kuru ve taze fasulye üretimi (Anonim, 2019)

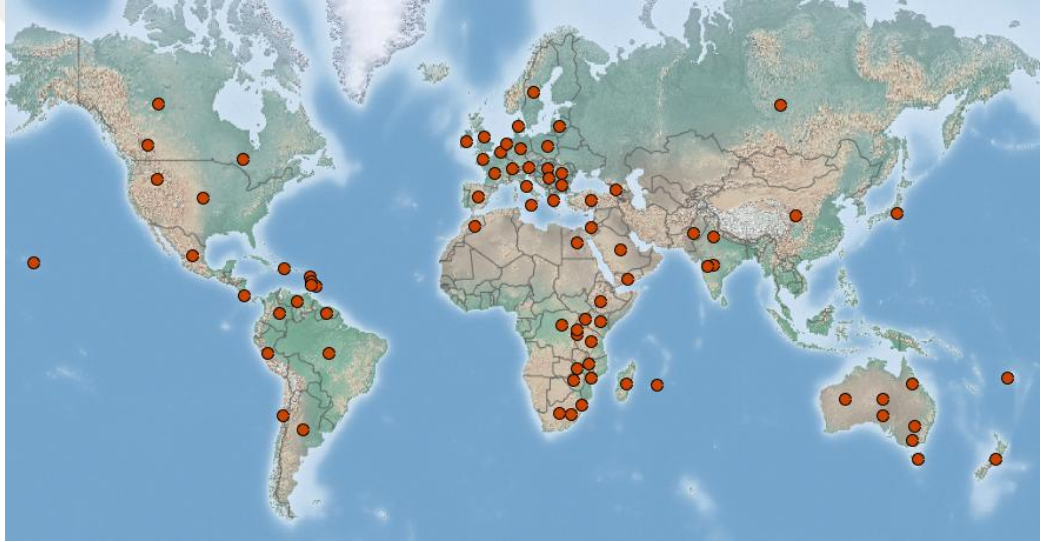
Bölgeler	Kuru (Ton)	Taze (Ton)	Toplam (ton)
Orta/İç Anadolu	151,303	88,611	239,914
Ege/Marmara	14,280	192,251	206,531
Akdeniz	7,746	149,233	156,979
Karadeniz	10,728	115,430	126,158
Diğer Bölgeler	35,943	27,018	62,961
Türkiye Toplamı	220,000	572,543	792,543

<https://biruni.tuik.gov.tr/medas/?kn=92&locale=tr>

İstatiksel veriler incelendiğinde Türkiye’de birim alandan elde edilen verimin yetersiz düzeyde olduğu gözlenmektedir. Bu durumun en temel nedenleri, çiftçilerin ürün yetiştiriciliğinde uygulama tekniklerinde sıkça yaptıkları yanlışlıklar, bölgeye adapte olmuş yüksek verimli çeşitlerin kullanılmamasının yanı sıra, genel hastalık ve zararlıların neden olduğu kayıplardır (Balkaya ve ark., 1999). Verim düşüklüğüne etki eden faktörler arasında hastalık etmenlerinden kaynaklanan zararlar önemli bir yere sahiptir. Ülkemiz ekonomisi içinde zengin bir besin içeriğine sahip olan fasulye üretimi ve kalitesi diğer kültür bitkilerinde olduğu gibi birçok bakteriyel, fungal ve viral patojenler tarafından olumsuz yönde etkilenmektedir (Nywall, 1989).

Genel olarak incelendiğinde fasulyede hem üretimi hem de verimi olumsuz yönde etkileyen en önemli bakteriyel hastalıklar Hale Yanıklığı etmeni olarak bilinen *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (*Psp*), adi yaprak yanıklığı etmeni olarak bilinen *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (*Xap*) ve fasulyede kahverengi leke hastalığı olarak bilinen *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (*Pss*)' dir (Saettler, 1991, Serfontein, 1994; Hirano ve ark., 1995; Taylor ve ark., 1996; Allen ve ark., 1998). Bu hastalık etmenlerinin varlığı ülkemizde yapılan çalışmalarla da ortaya konulmuştur (Benlioğlu ve Ozakman, 1991; Bozkurt 2002; Dönmez, 2004).

Psp'nin neden olduğu bakteriyel hale yanıklık hastalığı fasulye üretimi yapılan tüm ülkelerde (Şekil 1.2) görülebilmektedir (Singh ve Munoz, 1999; Hsieh ve ark., 2005).



Şekil 1.2. Fasulye Hale Yanıklığı Hastalığı Etmeni *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*'nın dünya ölçeğinde yayılış alanları (www.eppo.org)

Hastalık etmen Gram negatif, çubuk şeklinde (0,4-0,9 x 0,6-2,6 µm) ve tek polar flagellaya sahip olup, *Phaseolus vulgaris* dışında *P. hincatus*, *P. coccineus*, *P. acutifolius*, *Vigna aconitifolia*, *V. radiata* ve *Lupinus polyphylus* gibi bitkileri de enfekte edebilmektedir (Bradbury, 1986). Patojenin bitkiye giriş yerleri stoma, hidatod gibi doğal açıklıklar ve yaralardır. Bu tür açıklıklardan giriş yapan bakteri yapraklarda hücreler arası boşluklara yerleşmektedir. Etmen gövdeye ise hipokotil ve epikotildeki stomalardan, yapraklardaki vesiküler sistemlerden veya infekteli kotiledonlardan taşınabilmektedir. Tohum penetrasyonu ise pedisel ve funikulus vasküler sistemleri

ile meydana gelmektedir. Tohum kabuğu altına yerleşen etmen bu alanlarda uzun yıllar canlı kalabilmektedir.

Bakteriyel hastalık etmenlerinin fasulye tarımının yapıldığı ülkelerde sorun olduğu ve hastalık etmenlerinin yaygınlığı ve şiddeti üzerine uygulanan yetiştiricilik koşulları yanı sıra, bitki çeşitlerinin genetik yapısı ve bölgenin iklim koşullarının önemli düzeyde etkide bulunduğu bildirilmiştir. Bunlar arasında Hale Yanıklığı etmeni *Psp*'nin serin, nemli ve yağışlı bölgelerde yetiştirilen fasulyelerde sorun olurken (Taylor ve ark., 1996; Allen ve ark., 1998), adi yaprak yanıklık etmeni *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*'nin özellikle uzun süreli sıcak ve nemli havaların hakim olduğu üretim alanlarında sorun olduğu bildirilmiştir (Schwartz ve Galvez 1980; Saettler, 1991; Serfontein, 1994; Fourie, 2002).

Psp tohumla taşınabilen bir hastalık etmeni olması dolayısıyla uygun epidemi koşullarında ve hassas çeşitlerin ekildiği bölgelerde %100'e varan ürün kayıplarına neden olabilmektedir (Demir ve Gündoğdu, 1994). Hastalığın belirtileri başlangıçta yaprak altında görülen küçük ıslak lekeler şeklinde başlayıp bu kısımların zamanla kuruyarak küçük 3-6 mm çapında nekrotik lekeler dönüşmesi ve lekelerin etrafı bakteriyel toksin tarafından neden olunan oldukça geniş yeşilimsi sarı bir hale ile kuşatılması şeklinde ortaya çıkmaktadır. Bu kapsamda nispeten küçük leke etrafında gelişen geniş hale oluşumu ile adi yaprak yanıklığı hastalığı (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*)'nin belirtilerinden ayırt edilebilir.

Hastalık belirtileri enfeksiyonun ilerleyen döneminde artarak yaprağın tamamen sararması ve sararan yaprağın dökülmesi ile sonuçlanmaktadır (Soylu ve Şahin, 2019). Sistemik olarak gelişen hastalık belirtilerinde hale oluşumuna rastlanılabılır. Hastalık belirtilerinin gözlemlendiği yaprakların arasında kalan yapraklarda genel bir sararma gözlenirken bu yaprakların damarları koyu yeşil renkte görülmektedir. Meyve üzerindeki ıslaklıklar enfeksiyonun ilk döneminde küçük toplu iğne başı büyüklüğünde olup, enfeksiyonun ileri aşamasında bu ıslaklıkların ortasında dışarıya taşan açık sarı-krem renge bakteriyel akıntı (eksudat) oluşumlarına rastlanmaktadır. Geç dönemlerde bu alanlar kahverengileşerek içe doğru çökmüş nekrotik bir hal almaktadır.

Krem rengindeki bakteriyel akıntı etmeni, sarı renkte akıntıya neden olan adi yaprak yanıklığı belirtilerinden ayırt edilmesine yardımcı olur. Hastalık etmeni aynı

zamanda gövde de sistemik enfeksiyon sonucu belirtiler göstermektedir. Gövde üzerinde tipik ıslak lekeler ile başlayan ve uzunlamasına kırmızımsı çizgilere dönüşen lekelerin ilerleyen dönemlerde kuruyup nekrotikleşmesi sonucu bitki gövdesinde kırılmalar oluşmaktadır (Soylu ve Şahin, 2019).

Serin ve yağışlı iklim koşulları, hastalığın yayılması ve enfeksiyon şiddetinin artması için çok uygundur. Etmen, bitki tohumunu da enfekte edebilmekte, çoğu kez hastalıklı tohumlar primer enfeksiyon kaynağı olarak hastalığın ortaya çıkmasına neden olmaktadır (Smith, 1986). Bulaşık tohumluk ve hastalıklı bitki artıkları etmenin inokulum kaynaklarıdır. Bakteri, bulaşık bitki artığından sağlıklı bitkilere; yağmur damlalarının sıçraması veya toprak partiküllerinin rüzgârla taşınması ile bulaşmaktadır. Patojen, bitkiye yüksek nem koşullarında veya bitki yüzeyinde serbest su bulunduğu durumlarda, stoma ve hidatod gibi doğal açıklıklardan veya doğrudan yaralardan giriş yapabilmektedir. *Psp*'nin düşük sıcaklıklarda daha iyi geliştiği düşünülmektedir. Etmenin özellikle 18–22 °C sıcaklıklarda epidemi gerçekleştirme ihtimali ve riski daha fazladır (Hagedorn ve Inglis, 1986; Saettler, 1994).

Enfekteli bitki artıkları ya da tohumlarda olumsuz koşulları geçiren bakteri çimlenmekte olan sürgünler ve tohumlar üzerinde çoğalarak yağmur ve sulama suyu ile etrafa dağılmaktadır. Hastalık etmeni bitki yaprakları üzerinde hastalık meydana getirmeksizin epifitik olarak kalabilir ve daha sonra uygun ortamını bulduğunda hastalığı başlatabilir. Bakteriyel Hale Yanıklığı sıcaklık orta ya da serin ve nemin yüksek olduğu ortamlarda şiddetli belirtiler oluşturmaktadır. Ayrıca sertifikasız tohumların kullanılması da hastalığın ortaya çıkmasında asıl faktör olabilmektedir.

Tohum embriyosuna yerleşmiş olan hastalık etmeni çimlenen tohumla birlikte sistemik olarak bitki içinde yayılarak ilk belirtilerini kotiledon veya gerçek yapraklar üzerindeki ıslaklık ile başlayan ve daha sonra düzensiz klorotik lekeler şeklinde gösterir. Lekeler bir süre sonra nekrotikleşerek etrafı sarı bir hale ile çevrilir (Şekil 1.3).

İlerleyen dönemlerde bu lekeler birleşerek yaprak yanmış gibi bir görünüm almaktadır. Enfeksiyonun son dönemlerine doğru bakteri ksilem dokusuna geçerek vasküler sisteme yerleşmekte ve sistemik olarak bitkinin tüm yapraklarına yayılabilmektedir.



Şekil 1.3. Fasulye Hale Yanıklığı hastalığı etmeni *Psp*'nın fasulye yaprağında ilk dönemlerde oluşturduğu etrafın sarı haleler ile çevrili nekrotik lekeler (ok) ve ilerleyen dönemlerde şiddetli bitki sararmaları ve yaprak dökümlerinin görüldüğü tarlalardan genel görünümü.

Hastalığın gözlemlendiği bitkilerdeki meyveler üzerinde ise ilk dönemlerde suda ıslatılmış lekeler şeklinde belirtiler gözlenmekte ve zamanla bu ıslaklıkların etrafı koyu kırmızı-kahverengine dönüşmektedir (Şekil 1.4).



Şekil 1.4. Fasulye Hale Yanıklığı hastalığı etmeni *Psp*'nin meyvede oluşturduğu ıslaklık, yağ damlası şeklinde başlayan ve ilerleyen zamanlarda bu ıslaklığın etrafını kahverengi lezyonun çevrelemesi şeklinde ortaya çıkan tipik belirtileri (ok).

Yoğun enfeksiyonlarda ve nemli koşullarda bu alanlardan bakteriyel eksudat çıkışları gözlenmektedir (Darrasse ve ark., 2007). Hastalığın tohum üzerindeki belirtileri ise özellikle beyaz renkli tohumlarda tohum kabuğunda sarı veya kahverengi lezyonlar şeklinde olup yoğun enfeksiyonlarda tohumlarda büzüşme, küçülme ve zayıf çimlenme görülmektedir.

Primer enfeksiyon kaynakları infekteli tohumlar ve bitki artıkları olan hastalığın sekonder enfeksiyonları ise yağmur damlaları, rüzgar, böcekler ve yağmurlama sulama ile infekteli bitkilerden sağlıklı bitkilere taşınması ile olmaktadır (www.eppo.org). Hastalık yoğun enfeksiyonlarda %15-40 oranında ürün kaybına neden olabilmektedir (Singh ve Munoz, 1999).

Bitki hastalıkları ile mücadelede en önemli husus, hastalık ve zararlılardan arı temiz üretim materyali kullanmaktır. Fasulye üretiminde, özellikle tohumluk materyal üretim alanlarında üretim sezonu boyunca ve hasat öncesinde dikkatle kontroller yapılmalı ve hastalık belirtisi gösteren bitkilerden ve bu bitkilerin bulunduğu alanlardan mümkün olduğunca tohum temin edilmemelidir.

Kültürel işlemler esnasında bitkilerin yaralanmamasına özen gösterilmelidir. Üretim alanında belirtilerin görüldüğü bitkiler uzaklaştırılmalı ve imha edilmelidir.

Hastalığın görüldüğü üretim alanında münavebe yapılarak hastalığın üretim alanına uzun süre yerleşmesinin önüne geçilmelidir. Sulama işlemleri hava sıcaklığının çok yüksek olmadığı, güneş ışınlarının bitkiye dik gelmediği zamanda ve damla sulama yöntemi ile yapılmalıdır.

Hastalıkla mücadelede genel olarak hastalıktan ari ve sertifikalı tohum kullanımı, hasat ve diğer işlemler sırasında kullanılan alet ve ekipmanların klorin dioksit, sodyum hipoklorit gibi kimyasallarla dezenfeksiyonu, hasat sonrası bulaşık bitki artıklarının toplanarak imha edilmesi, dayanıklı çeşit kullanımı, bakırlı bileşikler ile yaprak ilaçlaması ve tohumlara antibiyotik uygulaması gibi yöntemler önerilmektedir (Schwartz ve ark., 2007). Kimyasal ilaçlamanın özellikle meyve enfeksiyonlarını engellemede yetersiz oluşu (Weller ve Saettler, 1976) antibiyotik uygulamasının ise gerek birçok ülkede yasaklanmış olması gerekse kısa sürede kullanılan antibiyotik ve bakırlı preparatlara karşı hastalık etmenin dayanıklılık geliştirmesi gibi probleminin ortaya çıkması gibi nedenlerden dolayı hastalıkla mücadelede kimyasallara alternatif yöntemlerin araştırılması elzem noktalara ulaşmıştır. Hastalıklarla kimyasal mücadeleye alternatif çevre dostu yöntemlerden birisi de “**biyolojik mücadele**”dir. Söz konusu bu mücadele yönteminin çevre ve insan sağlığı açısından olumlu yönlerinin gittikçe daha iyi kavranmasıyla hastalıklarla biyolojik mücadele ile ilgili çalışmalar son yıllarda artarak devam etmektedir.

Biyolojik mücadele, doğa koşullarında sağlıklı olarak yetişen bitkilerin kök, gövde, yaprak, ve çiçekler gibi farklı organların etrafında, üzerinde ve/veya dokuların içerisinde yaşayan, bitkilerde herhangi bir hastalık belirtisine neden olmayan bakteriyel, viral kökenli mikroorganizmaların (mikrobiom) değişik formülasyon ve uygulama şekillerinde kullanıldığı, hastalıklar tarafından neden olunan zararı en düşük düzeye indirme strateji olarak tarif edilir (Tjamos ve ark., 2010; Wang ve ark., 2010; Nega, 2014). Biyolojik mücadele kapsamında birçok hastalık etmenine karşı doğada genelde sağlıklı bitkilerden izole edilen, özellikle bakteriyel ve fungal mikrobiomlardan “biyolojik preparatlar” geliştirilerek toprak, tohum ve yaprak kökenli fungal ve bakteriyel hastalıklara karşı başarılı bir şekilde kullanılmaya başlanmıştır (Paulitz ve Belanger, 2001). Son yıllarda bitki hastalık etmenleri ile mücadelede biyolojik mücadele’nin kullanıldığı tarım sistemlerinde tarım ilaçların kullanımı azaldığı gibi pestisitlerin çevreye olası yan etkileri minimum düzeye

indirgenmesi nedeni ile yoğun ilgi çektiği bilinmektedir (Soylu ve ark., 2005; Sülü ve ark., 2016). Biyolojik preparat geliştirmenin en önemli adımlarından biri farklı bölgelerde yetişen bitkilerin farklı kısımlarından biyolojik mücadele etmeni mikrobiomların izolasyonu ve bunların hastalık etmeninin gelişimi üzerine olan etkinliğinin ve etki mekanizmaların araştırılmasıdır.

Biyolojik mücadele kapsamında en fazla kullanılan mikrobiomlar kültüre alınıp, yapay ortamlar üzerinde geliştirilebilen mikroorganizmalardır. Bu bağlamda bakıldığında fungal ve bakteriyel mikrobiomlar biyolojik mücadele kapsamında önemli bir yer tutmaktadır. Biyolojik mücadelede kullanılan yararlı bakteriyel mikrobiomlar bitkide yaşadıkları yerlere göre **epifit veya endofit** olarak isimlendirilirler (Dobbelaere ve ark., 2003; Berg ve Hallman, 2006).

Epifitik bakteriler doğrudan bitki yüzeyinden veya bitkinin toprak altı organların hemen yanındaki topraklardan ve kök yüzeylerinden izole edilen, endofit bakterilerde olduğu gibi uygulama yapıldığı bitkilere herhangi bir zarar vermeyen yararlı bakteriler olarak tanımlanır (Hallmann ve ark., 1998). *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Pantoea*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Serratia*, *Stenotrophomonas*, *Paenibacillus*, *Azoarcus*, *Azotobacter*, *Acetobacter*, *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Flavobacterium*, *Microbacterium* cinsine dahil bakteri türleri epifit bakteri olarak teşhis edilmişlerdir (McInroy ve Kloepper, 1995; Mahaffee ve Kloepper, 1997; Gupta ve ark., 2016). Endofit bakteriler yüzey dezenfeksiyonu yapılmış bitki kısımlarının doku içlerinden izole edilen, uygulama yapıldığı bitkilere herhangi bir zarar vermeyen bakteriler olarak tanımlanır (Hallmann ve ark., 1998).

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

bakteri türleri aynı zamanda epifit biyolojik mücadele etmeni bakteri türleri olarak da bildirilmiştir (Gupta ve ark., 2016).

Biyolojik mücadelede kullanılan bakteriler ilk olarak 1978 yılında Kloepper ve Schroth tarafından bitki kök, kökboğazı ve etrafındaki topraklardan izole edilen bakteriler için tanımlanmıştır ve uzun bir süre boyunca bu tür bakteriler için “**Bitki Gelişimini Teşvik Eden Kökbakterileri (PGPR, Plant Growth Promoting Rhizobacteria)**” terimi kullanılmıştır (Kloepper ve Schroth, 1978). PGPR grubu bakteriler başta bitki gelişimini teşvik eden bitki hormonların sentezlenmesi olmak üzere, biyolojik olarak azot bağlanması, toprakta farklı formlarda bitki tarafından alınamayan önemli makro ve mikro besin elementlerin (Potasyum, fosfor, demir, çinko, magnezyum vb) çözünürlüğünün artırılması ve siderofor üretimi vb. mekanizmalarla bitki gelişimini teşvik ederek doğrudan bitki gelişimin artırmışlardır. PGPR’lar ayrıca dolaylı olarak hastalık gelişimini azalttığı (Vessey, 2003), antibiyosis, yer veya besin için rekabet ve sistemik dayanıklılığın uyarılması gibi mekanizmalarla ise doğrudan patojen gelişimini engelleyerek veya hastalık şiddetini önemli ölçüde azaltarak etkili olabilmektedir (Bora ve Özaktan, 1998).

Fürnkranz ve ark. (2009), bu tür bakteriler için PGPR deyimini kullanmak yerine, biyolojik mücadelede kullanılan tüm bakterileri yaşadıkları veya izole edildikleri (rizosfer veya filosfer) yerlere bakmaksızın genel anlamda “**Bitki Gelişimini Teşvik Eden Bakteriler**” (PGPB, Plant Growth Promoting Bacteria) ve “**Biyolojik Mücadele Etmeni**” (BCA, Biological Control Agent) olarak sınıflandırmışlardır. PGPB sınıfındaki bakteriler, genelde bitkilerin gelişimini yukarda bahsedilen mekanizmaları kullanmak suretiyle teşvik ettiği gibi, üretmiş oldukları biyokimyasal bileşikler ile aynı zamanda bitkilerde sorun olan hastalık etmenlerin gelişmelerini baskılayabilmekte veya tamamen öldürebilmektedir (Kloepper ve Schroth, 1978). BCA türlerine giren bakteriler ise genelde bitki gelişimini teşvik etmeksizin (hormon, besi elementlerin doğrudan üretmiş oldukları antimikrobiyal bileşenler sayesinde hastalık etmenlerini baskılayabilmekte veya tamamen öldürebilmektedir. Bu tür mikroorganizmalar genelde literatürlerde doğrudan “**antagonist bakteriler**” olarak da isimlendirilmektedir.

Endofit veya epifit orijinli BCA ve PGPB izolatları ekonomik öneme sahip kültür bitkilerinde sorun olan hastalıklarının baskılanmasında (1) “**Doğrudan**” veya (2) “**Dolaylı**” olmak suretiyle iki şekilde etkide bulunur (Arora ve ark., 2012; Bhardwaj ve ark., 2014; Gupta ve ark., 2016).

Gerek BCA gerekse PGPB izolatları, (i) siderofor üretimi, (ii) azot fiksasyonu, (iii) çözünemeyen veya bitkinin alabileceği formlarda olmayan bitki besin maddelerinin (mineral maddelerin) bitkinin alabileceği formlara dönüştürmesi (minerilazasyon), (iv) karbon kaynağı (besin) açısından rekabet, (v) bitkisel hormonların (indole asetik asit (IAA), oksin, sitokinin, giberellik asit, etilen vb. teşvik edilmesi gibi mekanizmalardan bir veya birkaçını kullanmak suretiyle hastalık etmeninin gelişimini doğrudan engelleyebilme kapasitelerine sahiplerdir (Santoyo ve ark., 2016).

Bitki korumada kullanılan bitki hastalıklarının gelişimini önleyen (antagonist), bitkilerin gelişimini teşvik eden (PGPB) veya bu özelliklerin her ikisini de bir arada bulunduran bakteriler bitkilerin farklı bölgelerinden (kök, gövde, yaprak ve meyve gibi) izole edilmektedirler. Doğada yer alan sağlıklı bitkilerin kök ve toprak bölgesi (rizosfer/rhizosphere), toprak üstü aksamaları (filosfer/phylosphere) ve doku içleri (endosfer/endosphere) Proteobacteria, Firmicutes ve Actinobakteri şubesine ait pek çok faydalı PGPB türlerine konukçuluk yapmakta olup, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Stenotrophomonas*, *Serratia*, *Micrococcus*, *Pantoea*, *Ochrobactrum* ve *Microbacterium* cinsine dahil endofit ve epifit bakteri PGPB türleri sıklıkla rapor edilmiş türler olarak bildirilmiştir (Hallmann ve ark., 1997; Sturz ve ark., 2000; Rosenbluth ve Martinez-Romero, 2006; Sun ve ark., 2010; Marquez-Santacruz ve ark., 2010; Romero ve ark., 2014; Shi ve ark., 2014).

Bitki dokularının içerisinde genellikle bitkiler ile etkileşim (simbiyotik) halinde yaşamakta olan milyonlarca bakteri türü yer almaktadır. “Endofit” terimi her ne kadar fungal mikroorganizmalar ile ilişkilendirilse de, bitki gelişimini teşvik eden/düzenleyen bakteriyel endofit bakterilerin (bu bölümden itibaren **EB** olarak isimlendirilmiştir) biki ile olan etkileşimleri de azımsanmayacak kadar fazladır.

Bu çalışmada; ülkemizin fasulye üretimi yapılan illerinde önemli sorunlardan biri olan bakteriyel Hale Yanıklığı hastalığı (*Psp*) etmenine karşı endofit karakterli bitki gelişimini teşvik eden bakteri izolatları (EB) kullanılmak suretiyle biyolojik mücadele olanakları araştırılmıştır. Bu kapsamda ülkemizin önemli fasulye yetiştiriciliğı yapılan bölgelerdeki hastalığın gözlendiğı tarlalardaki sağılıklı fasulye bitkilerinin kök, gövde, meyve ve yapraklarından EBizolatlarının (*i*) izolasyonu, (*ii*) biyokimyasal ve moleküler teşhisleri, (*iii*) Fasulye Hale Yanıklığı hastalığı etmeni *Psp*'karşı *in vitro* ve *in vivo* antibakteriyel etkinlikleri, (*iv*) hastalığı engellemede ve (*v*) bitki gelişimini teşvik etmede rol oynayan olası etki mekanizmalarının *in vitro* koşullarda belirlenmesi amaçlanmıştır.



2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Hastalık Etmeni *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*'nın Tespiti ve Tanısı

Fasulyede Hale Yanıklığı hastalığına neden olan *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (*Psp*) (Burk) Young, Dye ve Wilkie, tohum kökenli bakteriyel patojendir. Patojen ilk olarak *Psp* olarak sınıflandırılmış ancak yapılan DNA çalışmaları sonucunda etmenin genetik yapı olarak *Pseudomonas syringae* patovarylarıyla benzer olduğu belirlenmiş ve *Psp* olarak yeniden isimlendirilmiştir (Gardan ve ark., 1992).

Gram negatif bakteriler grubunda yer alan *Psp* 0,5–1,0 x 1,5–4,0 µm boyutlarında, düz veya hafif kavisli, bir veya birden fazla polar kamçılı bir bakteridir. King B (KB) Agar besi yeri kullanılarak bitkilerden kolayca izole edilebilir. Bu besi yeri bütün floresan *Pseudomonas*'lar için kullanışlıdır. *Pseudomonas*'lar demir içermeyen besi yerlerinde 24-48 saat gelişimden sonra yayılabilir. Sarı, yeşil ve mavi floresan pigment üretirler. Floresan koloniler 366 nm (uzun dalga boyu) UV ışığı altında görülebilir. *Pseudomonas syringae*'nin patovaryları normal olarak mavi ve saprofitlerden daha az pigment üretmektedirler. Bakterinin optimum gelişim sıcaklığı 25–30 °C, maksimum 36–37 °C, minimum ise 2–3 °C'dir. DNA'nın G+C yüzdesi 58-71 mol' dür (Schaad, 2001).

Psp'nin tanı çalışmalarında, levan oluşumu, oksidase reaksiyonu, pektolitik aktivite testi (Kovacs, 1956), arginine dihidrolaz testi (Thornley, 1960), karbon kaynaklarının kullanımı, King B besiyerinde gelişim, arbutin hidrolizi, jelatin hidrolizi, nitrat indirgenmesi, L(+) Arginine dehidrolaz aktivitesi, H₂S üretimi, tütün yaprağında aşırı duyarlılık reaksiyonu (Klement, 1963) ve diğer bazı spesifik biyokimyasal testler (Lelliott ve Stead, 1987; Klement ve ark., 1990; Schaad, 2001) esas alınmaktadır.

2.2. Hastalık Etmenin Biyolojisi, Ekolojisi, Yayılışı ve Ekonomik Önemi

Hastalığın son derece önemli olmasından dolayı gerek ülkemizde gerekse fasulye üretimi yapılan diğer birçok ülkede etmenin tanısı, yaygınlığı ve ürünlerde

meydana getirdiği zararlarla ilgili birçok araştırma yapılmış olup, konuyla ilgili çalışmalardan elde edilen sonuçların bazıları aşağıda özetlenmiştir.

Guthrie ve ark. (1965), tarafından 16.000 fasulye bitkisinin bulunduğu üretim alanında yapılmış olan bir çalışmada *Psp* ile enfekte olmuş bir adet bitkinin bulunması durumunda bile uygun epidemi koşullarında ürünün tamamının kaybedilebileceği bildirilmiştir.

Karaca (1977), fasulye Hale Yanıklığı hastalığının Türkiye’de ilk kez Karadeniz Bölgesi ve Bursa yöresinde saptandığını bildirmiştir.

Staskawicz ve Panopoulos (1979), *Psp*’nin phaseolotoxin üretimi sıcaklığa bağlı olarak değişme gösterdiğini, hastalık etmeni tarafından toksin üretimi 18-20°C’de optimum seviyede iken 30°C’de belirlenebilir miktarlarda üretilmediği gözlemlenmiştir.

Schuster ve Coyne (1981), Tarla koşullarında yapılmış olan bir çalışmada, *Pss* ve *Psp*’nin toksin üretmeyen izolatlarının toksin üretenlere göre daha az virulent olduğu bildirilmiştir. Bu sonuç patojenite için toksin üretiminin ön şart olduğunu göstermiştir.

Zapata ve ark. (1985) tarafından gerçekleştirilmiş bir çalışmada *Psp* bakteriyel etmeni ile bulaşık olan fasulye tohumlarının kontrollü koşullarda (7–10°C sıcaklık ve %40–50 oransal nem) depolanması halinde patojenin 6 yıla kadar süreyle canlılığını devam ettirebildiği belirtilmiştir.

Smith (1986), Hale yanıklığı etmeni *Psp*, sırk fasulyelere nazaran özellikle bodur ve çalı fasulyelerinde önemli zararlara neden olduğunu bildirmiştir.

Schwartz (1989), tarafından yapılan çalışmada *P. s. pv. phaseolicola*’nın uygun koşulların bulunduğunu ve hassas çeşitlerin ekildiği bölgelerde %100 e varan hasarlar meydana getirebilmektedir. Enfekte olmuş tohumlar enfekte olmuş fideleri verirler fakat bunlar genellikle üründe bulunan fidelerin toplam miktarına göre azdır. Bu primer enfeksiyondan sonra hastalığın yayılışı yağmur sularıyla, genellikle rüzgârın egemen olduğu yöndedir. Tohum enfeksiyonları ile daha yıkıcı zararlar oluşturan *Psp* bulaşık tohumların taşınmasıyla uzak mesafelere yayılmakta ve bu noktalarda da lokalize olabilmektedir. Amerika da bir primer enfeksiyon kaynağından 26 metre kadar uzakta yeni enfeksiyonlar kaydedilmiştir. Araştırmacı, Amerika’ nın Michigan eyaletinde yer alan araştırma tarlalarında yürütülen çalışmasında ayrıca, *P. s. pv.*

phaseolicola'nın meydana getirdiği tane kayıplarının %23–43 oranında değiştiği tespit edilmiştir. Ayrıca verimde meydana gelen ürün kayıplarının ortalama %10 ile %50 arasında değiştiğini bildirmiştir.

Benlioğlu ve Özakman (1991), hastalığın Niğde, Nevşehir, Afyon ve Eskişehir yörelerinde %50'ye yakın oranda verim kayıplarına neden olduğunu bildirmişlerdir.

Goto (1992) fasulye bitkisinde simptom göstermeyen tohumların enfekteli olabileceğini tespit etmiş ve *Psp*'nin %50 oranında simptom sergilemeyen tohumlarla da taşındığı saptamıştır.

Kahveci ve Maden (1994), fasulyede ciddi problemlere neden olan ve tohum kaynaklı bakteriyel patojen *Psp*'nin ülkemizde Ankara, Artvin, Bursa illeri ve Karadeniz bölgesinde var olduğunu tespit etmiştir.

Benlioğlu ve ark. (1994), tarafından yürütülen bir çalışmada fasulye üretimi yapılan 24 farklı bölgeden toplanan 293 fasulye tohumunun bakteriyel patojenlerle bulaşıklık durumlarını belirlemek amacıyla patojenle inokulasyon çalışmaları yapılmış ve toplanan fasulyeler içerisinde 16 bölgeden alınan 64 fasulye bitkisinin bakteriyel yanıklık patojenleri ile bulaşık olduğu bildirilmiştir.

Demir ve Gündoğdu (1994), Ege Bölgesinde yemeklik baklagillerde görülen bakteriyel hastalıkların tespiti ve mücadelesi için yapılan bir çalışmada *Pss*, *Psp* ve *Xap* etmenleri tespit edilmiş olup özellikle *Psp* ve *Xap* etmenlerinin uygun koşullar oluştuğu zaman %100'e varan oranda ekonomik kayıplara neden olduklarını bildirmişlerdir.

Agarwal ve Sinclair (1997), *Psp* bulaşık olduğu tohumlarda 12 yıla kadar canlı kalabildiğini bildirmişlerdir. Etmenin uzun yıllar canlılığını koruyabilmesinde etkili olan faktörlerin uygun sıcaklık, orantılı nem ve fasulye bitkisinin çeşidi olduğunu ve *Psp*'nin fasulye tohumlarında, 2–3 yıl canlılığını sürdürdüğünü bildirmişlerdir.

Goszczyńska ve Serfontein (1998), fasulyeden izole edilen *Pss*, *Psp*, *Xap* ve *Xapf*'in morfolojik olarak tanısını yapabilmek için Milk Tween (MT) ortamını geliştirmişler ve bu ortamda gelişen bakteri kolonilerinin kolayca birbirinden ayırt edilebildiğini bildirmişlerdir.

Koenraadt (1999), BBD, MT, KB, XCP1 ve PTSA gibi 5 farklı besiyerinde *Xap*, *Pss* ve *Psp*'nin gelişim özelliklerine bakmış ve *Pss* ve *Psp*'nin BBD ve MT besiyerlerinde KB, XCP1 ve PTSA'dan daha iyi gelişim gösterdiğini tespit

etmişlerdir.

Ağsakallı ve Olgun (2001), iklim faktörlerinin fasulye yetiştiriciliğinde önemli sorunlar oluşturan fungal, bakteriyel ve viral hastalık etmenlerinden antraknoz (*Colletotrichum lindemuthianum*), Adi Yaprak Yanıklığı (*Xap*), Fasulye Hale Yanıklığı (*Psp*) [*Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola*], Bakteriyel Kahverengi Leke (*Pss*), Fasulye Adi Mozaik Virüsü ve Fasulye Sarı Mozaik Virüsü gelişimi üzerine olan etkilerini araştırdıkları çalışma sonucunda yağış, sıcaklık ve nem gibi faktörlerin hastalık çıkışı ve ürün kaybı üzerine büyük ölçüde etkili olduğunu bildirmişlerdir.

Fourie (2002), Tohum kökenli bakteriyel hastalık etmeni olan *Psp* özellikle serin ve yağışlı hava koşullarının sürekli hüküm sürdüğü Avrupa, Güney Afrika ve Kuzey Amerika gibi ülkelerde yüksek düzeyde yaygınlık göstererek ürünlerde verim ve tohumluk kalitesini olumsuz yönde etkilediğini, etmenin tohumluk amaçlı tarlalarda %10, ticari amaçlı tarlalarda %37 düzeylerinde olduğunu, en yaygın hastalık olarak saptanan bakteriyel kahverengi leke hastalığı etmeni. *Pss*’nin ise sırasıyla %83 ve %100 oranlarında bulundukları tespit edilmiştir.

Güven ve ark. (2004), Eskişehir ilinde yetiştiriciliği yapılan fasulye üretim alanlarında yürütmüş oldukları çalışmada Fasulye Hale Yanıklığı etmeni *Psp*’nin ciddi derecede sorun oluşturduğunu tespit etmişlerdir.

Dönmez (2004), Doğu Anadolu Bölgesinde fasulye yetiştiriciliği yapılan alanlarda ki sorunun bakteriyel bir etmen olan *Psp*’dan kaynaklandığını ve hastalığın ekonomik düzeyde zarar verdiğini tespit etmiştir.

Kendi (2009), *Psp* bakteriyel hastalık etmeninin fasulye tohumlarında taşınma oranlarını incelemiştir. Fasulye tohumlarından izole ettiği bakteriyel etmenlerin tanı çalışmasında NA, MSP, King B besi yerlerinde gelişim, levan oluşumu, oksidaz reaksiyonu, pektolitik aktivite testi, arginine dehidrolaz testi, karbon kaynaklarının kullanımı, arbutin hidrolizi, jelatinin hidrolizi, nitrat indirgemesi, H₂S üretimi ve tütün (White Burley) yaprağında aşırı duyarlılık reaksiyonu testlerini yapmıştır. Yapılan çalışma sonucunda 12 ilde tohumla taşınma oranı Ankara %2.28, Aksaray %5.14, Çorum %0, Eskişehir %0, Kayseri %1.71, Kırşehir %0, Kırıkkale %1.71, Konya %6.85, Nevşehir %1.14, Niğde %1.71, Sivas %1.14, Yozgat %0 ve İç Anadolu bölgesinde ise %21 olarak tespit edildiği bildirilmiştir.

Vural ve Soylu (2012), Hatay ilinin 6 önemli ilçesindeki fasulye ekim alanında rasgele seçilmiş farklı tarlalarda bitki çıkışı (fide), çiçeklenme ve meyve-hasat dönemleri olmak üzere 3 farklı bitki gelişim döneminde yürütmüş oldukları sörveyler sonucunda bölgede fungal hastalıkların bakteriyel hastalıklara kıyasla daha yaygın ve şiddetli olduğunu, fasulye bitkisinin yaprak ve meyvelerinden izole edilen 2 önemli bakteriyel hastalık etmeni *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (Burk) Young, Dye&Wilkie [Fasulye Hale Yanıklığı] ve *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Smith) Dye [Fasulye Adi Yaprak Yanıklığı]'nın bölgede düşük düzeyde önemli olduğu belirlenmiştir.

Elkoca ve Çınar (2015), tarafından Erzurum' da bazı kuru fasulye (*Phaseolus vulgaris* L) çeşit ve hatlarının ekolojik koşullara adaptasyonu, tarımsal ve kalite özelliklerinin belirlenmesi amacıyla yapmış oldukları çalışmada deneme alanında *Psp* (Fasulye Hale Yanıklığı)'nın ürünlerde zarar meydana getirdiğini gözlemlemişlerdir. Ayrıca hastalık şiddeti ile incelemiş oldukları parametreler arasında yapılan korelasyon analizleri sonucunda hastalık hassasiyetinin hem toplam verimi hem de tane verimini olumsuz yönde etkilediğini belirlemişlerdir.

2.3. Hastalıklarla Mücadele Yolları

Bakteriyel ve fungal kökenli hastalıklarla mücadele yöntemleri genel olarak kültürel önlemler, fiziksel uygulamalar, dayanıklı çeşit kullanımı, kimyasal mücadele ve biyolojik mücadele şeklinde yapılır. Çalışmamıza konu olan bakteriyel etmen ile yapılan Kültürel ve Fiziksel mücadele yöntemleri üzerine yapılan çalışmalar bulunmakla birlikte, endofit bakterilerin hastalığa karşı kullanılmasına yönelik oldukça kısıtlı çalışmaya rastlanılmıştır. Söz konusu yapılan çalışmalar ve elde edilen sonuçlar aşağıda kısaca özetlenmiştir.

2.3.1. Kültürel ve Fiziksel Önlemler

Hastalıkla mücadelede en önemli husus temiz üretim materyalinin kullanılması ile üretim alanlarının hastalığın girişinden ve yayılmasından korunmasıdır. Bu amaçla pek çok araştırmacı hastalığın tohum yolu ile bulaşması ve bu nedenle karşı karşıya

kalınan ekonomik zararın önlenmesi hususuna dikkat çekmiştir. Bir diğer husus da kullanılan çeşidin hastalığa karşı hassas oluşudur. Bu konuda birçok araştırmacı sürekli olarak mevcut çeşitlerin hastalığa karşı dayanıklılık durumlarının belirlenmesi ve yeni çeşit geliştirilmesi üzerine çalışmalar yürütmektedir.

Sutton ve Wallen (1970), yaklaşık olarak 10,000'de 1 tohumun *Xap* ile enfekteli olmasının hastalığın ortaya çıkışı ve yayılması için yeterli olduğunu bildirirken, Weller ve Saettler (1980) tarafından yapılan bir başka çalışmada tarla koşullarında hastalığın ortaya çıkabilmesi için tohum başına 1000-10,000 bakteri gerektiği saptanmıştır.

Schuster ve Coyne (1981), tarafından bildirildiğine göre, fasulye çeşitlerinde bakteriyel patojenlere karşı tolerans kaynaklarının farklılık gösterdiği gözlemlenmiştir. İlk olarak 1942'de *Psp*'ya dayanıklı genotip olarak Red Mexican tanımlanmış, 1955'de ise Ferguson ve ark., bitkide bu dayanıklılığın kırıldığını tespit etmişlerdir. 1964'de *Psp*'nin yeni bir ırkı tanımlanmış ve Red Mexican UI3'ün ırk 1'e dayanıklı, ırk 2'ye hassas olduğu belirlenmiştir. *Psp* izolatlarının Red Mexican üzerinde küçük halesiz lekelere, Red Kidney üzerinde ise tipik haleli lezyonlara neden olduğu saptanmıştır.

Hartmann ve ark. (1986), *Psp*'nin toksik filtratlarına karşı farklı fasulye çeşitlerinin kallus kültürlerinin nekroz oluşumu, nekroz oluşmadan gelişmenin azalması ve normal gelişme şeklinde reaksiyon verdiğini ve filtrat içeren ortamda geliştirilen dayanıklı çeşitlerin kalluslarında nekroz oluşmadığını belirlemişlerdir.

Smith (1986), Kuzey Amerika'daki bazı kültürlerin Hale Yanıklığına karşı dayanıklı olduğu saptanmasına rağmen Avrupa'daki çeşitlerin Hale Yanıklığına karşı duyarlı olduğu ve bu bölgede çalı fasulyelerinde önemli zararlara neden olduğu saptanmıştır.

Schaad ve ark. (1989), tohum kaynaklı patojen olan *Psp* ile tek pratik mücadelenin hastalıksız tohum kullanımı olduğu, hastalıktan ari ve sertifikalı tohum kullanımı, yabancı ot kontrolü, enfekteli bitki artıklarının yok edilmesi ve etmenin konukçusu olmayan bitkilerle ürün rotasyonu hastalığın çıkışını engellemede veya mevcut inokulum kaynaklarının yok edilmesinde son derece önemli olduğunu bildirmiştir.

Kikoka ve ark. (1989), Tanzania Morogoro'da 1987-1988 yılları arasında *Psp*

ile enfekteli fasulye alanlarda mısır bitkisi ile yapılan 2 yıllık ürün rotasyonu sonucu hastalık şiddetinde önemli düzeyde azalma meydana geldiğini bildirmişlerdir.

Sigee (1993), *Psp*’nın Irk 1 ile inokule edilmiş olan Red Mexican (dayanıklı) ve Prience (duyarlı) fasulye çeşitlerinde inokulasyondan 2 saat sonra hem uyumlu hem de uyumsuz reaksiyonlarda inokule edilen alanlarda ıslaklık olduğunu tespit etmişlerdir. Uyumlu reaksiyonlarda 24 saat sonra tekrar ıslaklık simptomlarının görüldüğünü, 96 saat sonra ise bu alanların bronzlaşmaya başladığını, uyumsuz reaksiyonda ise inokulasyondan 24 saat sonra inokule edilen alanlarda camlaşma olarak adlandırılan kurumaların ve daha ileri dönemlerde nekrotik lekelerin oluştuğunu bildirmişlerdir.

Benlioğlu ve ark. (1994), farklı fasulye hatlarına karşı *Xap* ve *Psp*’nin farklı ırklarının göstermiş olduğu reaksiyonların belirlenmesi ile ilgili çalışmada F-2629, F-2342 ve F-2657 hatlarının *Psp*’nin 1 nolu ırkına, F-2666, F-2829 ve F-2835 hatlarının ise *Psp*’nin II nolu ırkına karşı 22 yüksek düzeyde dayanıklı olduğunu ayrıca F-2328 hattının ise *Xap*’ye karşı dayanıklı olduğunu saptamışlardır.

Milosevic ve Slusarenko (1996), Red mexican fasulye çeşitinin 7-9 günlük kotiledon yapraklarını *Psp*’nin avirulent ve virulent ırklarıyla inokule ederek aşırı duyarlılık reaksiyonu (HR)’nin meydana geldiği uyumsuz reaksiyonlarda görülen aktif oksijen metzbolizmasını ve lignifikasyonu incelemişlerdir. Özellikle uyumsuz reaksiyonlarda bitki hücrelerinde asidik peroxidase, xanthine oxidase ve glutathione reductase aktivitesinin arttığını, katalaz aktivitesinin ise azaldığını tespit etmişlerdir. Ayrıca *in situ* koşullarda peroksidaz aktivitesinin inokule edilen dokularda lignin birikimi ile doğru orantılı olduğunu ve HR oluşumunda aktif oksijen türlerinin önemli rol oynadığını bildirmişlerdir.

Bestwick ve ark. (1997), *Psp* ile inokule edilen fasulyelerde bakterinin istila ettiği hücrelere komşu olan hücrelerde yüksek oranda hidrojen peroksit (H_2O_2) biriktiğini, inokule edilmiş bitkilerde ise H_2O_2 ’nin yalnız ksilem damarlarında bulunduğunu tespit etmişlerdir. Ek olarak sınırlandırılmış bir şekilde biriken H_2O_2 ’nin antimikrobiyal bir etmen gibi rol oynadığını bildirmişlerdir.

Garcia-Espinosa (1997), dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesinde vertikal dayanıklılıktan çok horizontal dayanıklılık gösteren çeşitlerin seçilmesi gerektiğini bildirmiştir.

Güven (2000), tarafından, Eskişehir’de çeşitli fasulye üretim alanlarından toplanan 86 *Psp* izolatu, bakteriosin üretme yeteneğine göre tiplendirilmiştir. Test edilen tüm izolatlar bakteriosin üretmiş ve 24 bakteriosin grubu test edilmiştir. Bakteriosin grupların ve izolatların coğrafik orjinleri arasında bir ilişki bulunmadığını belirlemiştir.

Bozkurt (2002), tarafından yapılmış olan bir çalışmada ülkemizde yetiştirilen farklı fasulye çeşitlerinin fasulye Hale Yanıklığı etmeni *Psp* dünya genelinde tanılanmış farklı ırklarına karşı göstermiş olduğu reaksiyonlar, bitkilerin kapsül (meyve) ve kotiledon yaprakları üzerinde belirlenmiştir. Fasulye çeşitleri arasında Roma-II, Efequen ve Cilena’nın ırk 1. ırk dışındaki tüm bakteri ırklarına karşı duyarlı olduğu tespit edilmiştir. Efequen ve Cilena çeşitleri 1, Gina, Yunus-90 ve Magnum çeşitleri ise 4 bakteri ırkına karşı dayanıklılık gösterirken Roma-II, Yunus-90, Göynük-98 ve Şekerli çeşitleri 1, Şehirali-90 ve Ayşe kadın çeşitleri 2, Karacaşehir-90 çeşiti 3 bakteri ırkına karşı orta derecede dayanıklılık göstermiştir. Bakterinin 6., 8. ve 9. ırklarının testlenen tüm fasulye çeşitlerinde virulent olduğu tespit edilmiştir.

Dönmez (2004), tarafından yürütölmüş olan çalışmada fasulye ekim alanlarında önemli derecede ekonomik kayıplara neden olan *Xap* ve *Psp* bakteriyel hastalık etmenlerine karşı bölgede yaygın olarak ekimi yapılan 36 fasulye genotipinin ve 2 çeşidin dayanıklılık durumlarını sera ve tarla koşullarında test etmiştir. Sürdürölen denemeler sonucunda kullanılan fasulye çeşit/genotiplerinin her iki yılda da patojenlere karşı benzer derecede hassasiyet gösterdiği bildirilmiştir. Tarla denemesi sonucunda hastalık şiddetindeki artışın tohum verimini de önemli seviyede azalttığı belirlenmiştir. Test edilen genotiplerden sadece 36K’nın her iki patojene karşı yüksek seviyede dayanıklı olduğu tespit edilmiştir.

Akbaş (2005), Doğu Anadolu bölgesinde yaygın olarak görölen ve *Xap* etmenlerine karşı laboratuvar koşullarında yapılmış olan deneme sonucunda 36K nolu fasulye genotipinin dayanıklı, Yakutiye-98 ve Kantar-05 hatlarının ise hassas olduklarını belirlemiştir. Kontrol bitkisine kıyasla *Psp* ve *Xap* sırasıyla 36K genotipinde %9, %16, Yakutiye-98 çeşitinde %27 ve %10, Kantar-05 çeşidinde ise %14 ve %20 verim kaybına neden olmuştur. Sonuç olarak 36K genotipinin fasulyede önemli verim kayıplarına yol açan *Psp* ve *Xap* bakteriyel patojenlerine karşı dayanıklılık ıslahı çalışmalarıında gen kaynağı olarak kullanılabileceğini bildirmiştir.

Çakır ve ark. (2007), Eskişehir ve çevresinde yetiştirilen fasulyelerden izole ettikleri *Xap* ve *P. s. pv. phaseolicola*'yı bölgede yaygın olarak yetiştirilen 6 çeşit ve 8 fasulye hattına karşı testlemiş ve sera koşullarında yapmış oldukları bu çalışmada fasulye çeşit ve hatlarının farklı düzeyde duyarlılık gösterdiğini saptamışlardır.

Soylu ve ark. (2007), sörvey çalışmalarını yürüttükleri Hatay ili Dört Yol ve Erzin ilçelerinde fasulye bitkisinin yaprak ve meyvelerinde *Psp* (Fasulye Hale Yanıklığı)'nin var olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca tohum kaynağı İzmir-Bursa olan Nasuha isimli fasulye çeşitinin bölgede yaygın olarak ekildiğini ve bu çeşitin *Psp* ve *Xap*'ye karşı hassas olduğunu bildirilmişlerdir.

2.3.2. EB İzolatlarının Bitki Hastalıkları ile Biyolojik Mücadelede Kullanımı

Psp etmenin biyolojik mücadelesine yönelik ülkemizde herhangi bir çalışma yapılmamış olup dünyada da bu etmenle ilgili biyolojik mücadele çalışmalarına yönelik araştırmalar yeni başlamıştır. Bu doğrultuda mücadelenin yapılabilirliğine yönelik verilerin elde edilmesi ve uygulamaya geçirilmesi açısından bu doktora çalışması ve elde edilecek veriler ülkemizde yapılan ilk, dünyada da ilk çalışmalar arasında olması nedeni ile büyük önem arz etmektedir. Çalışmalarımızda da elde edilen farklı türlere ait endofit bakterilerle farklı bitki bakteriyel ve fungal hastalık etmenlerine karşı yapılmış olan çalışmalardan bazıları aşağıda özetlenmiştir.

Poon ve ark. (1977), endofit bakterilerin, çeltikte bakteriyel yanıklık belirtilerinin oluşumunu engellediğini bildirilmiştir.

Van Buren ve ark. (1993), bakteriyel patojenlere karşı endofit bakterilerin antagonistik aktivitelerini araştırdıkları çalışmalarında, patates gövde dokularından izole ettiği 192 endofit bakteri izolatının 61'inin, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*'a karşı etkili biyokontrol sağladığını gözlemlemiştir. Bu bakteriler arasında, bir floresan *Pseudomonas* (CICA90) izolatı kök ve gövdenin içindeki ve dışındaki dokuların her ikisinde de kolonize olabilmektedir.

Chen ve ark. (1995), bitki toprak üstü aksamlarından izole edilen bakterilerin bazıları, biyolojik mücadele ajanı olarak hastalıkları kontrol etmelerinin yanı sıra endofit bakteriler ve konukçuları arasındaki yakın ilişkinin, endofit bakterilerin biyokontrol ajanları olarak seçilmelerinde doğal aday olmalarına neden olduğunu

bildirmişlerdir.

Sturz ve Matheson (1996), patates yumrularında bakteriyel yumuşak çürüklük etmenine (*Erwinia carotovora* var. *atroseptica*) dayanıklılığın, *in vitro* da bu etmenin gelişimini engelleyen endofit bakterilerin yumrudaki populasyon yoğunluğu ile negatif bir korelasyon oluşturduğunu yaptığı çalışma ile göstermiştir. Bu bakteriler arasında *Arthrobacter* sp. ön plana çıkmaktadır.

Quadt-Hallmann ve ark. (1997), Endofit bakterilerin bitkiye giriş yaptıktan sonra apoplast, iletim demetleri ve hücrelerarası boşluklarda aktif olarak kolonize olduktan sonra konukçu bitki içerisinde sistemik şekilde yayılabildiklerini, kolonizasyonun gerçekleştiği ekolojik alanın bitkileri infekte eden fitopatojenlerin bulunduğu ekolojik alan ile benzerlik gösterdiğini, dolayısıyla bu durum endofit bakterilerin, doku içinde yaşayan patojenlere (özellikle bakteriyel hastalıklara) karşı iyi bir biyokontrol ajanı olarak kullanılma nitelikte olduğunu bildirmişlerdir.

Krechel ve ark. (2002), Hücre duvarının parçalanması, endofit bakterilerin fungal patojenleri kontrol etmede kullandıkları bir diğer mekanizmadır. Patates köklerinden izole edilen endofit bakterilerin, kitinaz, glukanaaz, sellulaz gibi hidrolitik enzimleri yüksek seviyelerde ürettiği bildirilmiştir.

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

Stromberg ve ark. (2002), tarafından yapılan çalışmada kullanılan farklı bakteriyel izolatın farklı bitki patojenlerine karşı etkinlikleri test edilmiş ve bu bakteriyel izolatlar arasında *Arthrobacter ilicis* 99-41 izolatı buğdayda *Pythium ultimum* etmenine karşı etkin olarak tespit edilmiştir.

Krechel ve ark. (2002), Mikroorganizmalar arasındaki yer ve besin rekabeti, endofit bakterilerin fungal patojenleri kontrol etmelerinde önemli mekanizmalardan biri olarak değerlendirilmektedir. Çünkü her iki organizma grubu aynı nişe yerleşir ve aynı besin maddelerinden faydalanır. Bu kapsamda mikroorganizmaların siderofor üretme potansiyelleri öne çıkmaktadır. Sideroforların endofit bakteriler tarafından yaygın olarak üretildiği yapılan çalışmalar ile bildirilmiştir.

Jetiyanon ve Kloepper (2002), Tayland da, bazı kültür bitkilerinde ISR'yi tetikleyen, endofit *Bacillus* spp. ile yaptıkları sera denemeleriyle, tropikal tarımda endofit bakteriler ile ISR'nin tetiklenmesi sürecini araştırmışlardır. Çalışmalarında, domates ile *Ralstonia solanacearum*; biber (*Capsicum annuum* var. *acuminatum*) ile *Colletotrichum gloeosporioides*; (*Brassica chinensis* var. *parachinensis*) ile *Rhizoctonia solani*; hıyar ile Hıyar Mozaik Virüsü içeren 4 farklı konukçu-patojen sistemi kullanmışlardır. Çalışmanın hedefi, dört konukçu-patojen sisteminin tümünde, ISR'yi tetikleyen endofit spor oluşturan bakterileri saptanmasıdır. Bu amaçla 7 bireysel izolat ve 2 izolatın 11 farklı kombinasyonu test edilmiştir. *B. amyloliquefaciens* IN937a izolatı ve 4 izolatın karışımı (IN937a+B. *subtilis*IN937b; IN937b + *B. pumilus* SE34; IN937b + *B. pumilus*SE49; ve IN937b + *B. pumilus* INR7) bu dört hastalığın tümünün oranını ve şiddetini önemli ölçüde azaltmıştır. Elde edilen sonuçlar 2 önemli nedene dikkat çekmektedir. Birincisi, spesifik endofit bakteri izolatlarının tetiklediği ISR'nin, tropikal koşullar altında hastalıklara karşı konukçu bitkileri koruyabileceğini gösterirken, ikincisi ise, iki bakteriyel izolatın karışımının, farklı patojenlere karşı farklı konukçuların korunmasını bireysel izolatlara göre daha önemli oranda gerçekleştirebildiği yapılan bu çalışmayla göstermişlerdir.

Verhagen ve ark. (2004), ISR-uyarıcı *P. fluorescens* WCS417r ile işlem gören *A. thaliana* bitkisinde ISR-uyarıcı genler microarray analizleri ile belirlemişlerdir. Ayrıca, kök içerisinde regule edilmiş 97 gen ile karşılaşırken, gövdede farklı bir gen regülasyon ile karşılaşmamışlardır. Ancak, araştırmacılar bitki patojeni, *P. syringae* pv. *tomato* ile bitkinin inokule edilmesinin ardından, *P. fluorescens* WCS417r ile ön işlem görmüş bitkilerin gövdelerinde regule olan 81 gen bulmuşlardır. Dolayısıyla bitkilerin, ISR yoluyla patojen saldırısına karşı dayanıklılıklarının tetiklendiği yaptıkları bu çalışma ile göstermişlerdir.

Ojiambo ve Scherm (2006), tarafından buğday'da *G. graminis* var. *tritici* etmenine karşı *Pseudomonas putida* izolatlarının, elma, hıyar, fasulye ve armutta *A. solani*, *E. amylovora*, *F. oxysporum*, *Oidium* sp., *Pythium* sp., *R. solani*, *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* gibi etmenlere *Pseudomonas fluorescens* BL915, BlightBan A506 izolatlarının, buğdayda *Arthrobacter ilicis* 3026C izolatının *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* etmenlerine karşı etkili olduğunu bildirmişlerdir.

Kloepper ve Ryu (2006), Biyolojik kontrol için alternatif mekanizmalardan biri,

bakteriyel metabolitlerin, uyarılmış sistemik dayanıklılık (ISR) olarak adlandırılan bir süreç ile bitkilerin patojenlere karşı dayanıklılığını artırarak, bitkileri etkilemesidir. Bazı kimyasal uygulamaları veya nekroz oluşturan patojenler yoluyla bitkilerde dayanıklılığın oluşması, sistemik kazanılmış dayanıklılık (SAR) olarak adlandırılır. Bitkiler bazı durumlarda, fitopatojen saldırılarında hastalığı baskılayıcı tepkilerin bir parçası olarak bakteriler ile ortak ilişki içerisine girebilir. Endofit bakteriler, böyle korunma tepkilerinin uyarılmasında görev almaktadır. Son çalışmalar, endofit bakterileri de içeren bazı rhizobakterilerin, etilen ve jasmonik asit'in yanı sıra, salisilik asit'e bağımlı olan sistemik korunmanın oluşumunu tetiklediğini göstermiştir.

Fritz ve ark. (2009), yapmış olduğu çalışmada *Pseudomonas fluorescens* grubunda yer alan birçok izolat ile yaptıkları çalışmalarda bu izolatlardan içlerinde *Pseudomonas gessardii* nin de bulunduğu bazı izolatların pseudomonic acid A (mupirocin) adı verilen bir çeşit antibiyotik ürettiklerini tespit etmişlerdir. Bu sayede *Pseudomonas* izolatlarının göstermiş olduğu antagonistik ve antibiyosis etkinin açıklanması konusunda önemli bir bilinmeyen daha açığa çıkarılmıştır.

Egamberdieva (2011), İskoçya çam köküyle ilişkili mikorizal mantar ve bakteriler ile *Fusarium culmorum*, *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinera* gibi patojenik mantarlara karşı buğdayla ilişkili bakterilerin antagonistik aktivitesini test etmek ve bakteri izolatları ile ekstrasellüler litik enzimlerinin üretimini belirlemek üzerine yapılan bir çalışmada bakteri izolatlarından elde edilen hücre dışı enzimler mikorizal hiflerden elde edilenlere nazaran çok daha yüksek antagonistik aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Elde edilen bakteriyel izolatların teşhisleri gerçekleştirilmiş ve bu izolatlar arasında *Arthrobacter ilicis* KNCL24, *Rhodococcus fascines* HNOL8 ve buğdaylardan ise *Bacillus cohnii* (19), *B. subtilis* (1) ve *B. lentus* (28) olduğu belirlenmiştir. Tüm izolatlar, yüksek düzeyde pektinaz aktivitesi göstermiştir. Sadece 4 izolat (*A. ilicis* KNCL24, *B. lentus* 17, *B. subtilis* 4, *B. halodurans* 12) hidrojen siyanür üretebildiği tespit edilmiştir. Sonuçlar, buğdayla ilişkili bakteriyel suşların, mikorizal hiflerden elde edilen bakteriyel re-izolatlardan daha fazla antagonistik aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir. Test edilen tüm bakteriyel suşlar, bir yada daha fazla hücre duvarını parçalayan enzimleri üretmiştir.

Aktaş (2015), Öz nekrozu etmeni *Pseudomonas corrugata*'ya karşı PGPR ve biyokontrol etmeni bakterilerin etkinliğini araştırdığı çalışmasında, çalışmada elde edilen

Bacillus türlerinin hastalığı baskılamada ve bitki gelişiminde olumlu etkide bulunduğu belirlenmiştir.

Müller ve ark. (2016), tarafından yapılan bir çalışmada buğday bitkisi yapraklarından elde edilen 175 bakteriyel izolattan 40 tanesinde *Fusarium* ve *Alternaria* etmenlerine karşı ikili kültür denemelerinde antagonistik etki tespit etmiştir. Bu izolatların 20 tanesinde ise 2,4-diacetylphloroglucinol antibiyotik aktivitesi tespit etmişlerdir. Etkin bulunan bakterilerin teşhisleri yapıldığında büyük bir çoğunluğunun floresan *Pseudomonas* olduğu tespit edilmiş olup bu izolatlar genetik karakterizasyonları tamamlandığında *Pseudomonas gessardii* ile aynı guruba düşmüştür.

Çetinkaya-Yıldız ve Aysan (2016), Domateste bakteriyel solgunluk hastalığı ile kimyasal mücadeleye alternatif olarak bitki büyüme düzenleyici kök bakterilerinin (PGPR) kullanılma olanaklarının araştırıldığı bir çalışmada, 39 farklı toprak örneğinden 499 adet aday PGPR bakteri izolatu elde edilmiştir. Bu izolatlar arasında en fazla fosforu çözme ve azotu bağlama özelliklerine sahip 30 izolat aday PGPR olarak seçilmiş olup, bu izolatlar arasında en etkili olan sekiz izolatın bakteriyel solgunluk hastalığını baskılayabilme potansiyelleri *in vivo* koşullarda belirlenmiştir. Y1.6.7 ve N6.6.21 kodlu PGPR izolatları hastalık gelişimini sırasıyla ortalama %38 ve %54 oranında azaltıldığını bildirmişlerdir.

Ünlü ve Aysan (2016), *Xanthomonas axonopodis* pv. *pelargonii*'nin biyolojik mücadelesine yönelik yapılan bir çalışmada, sardunya yetiştirilen toprak örneklerinden izole edilen 234 aday PGPR izolatlarının saksı çalışmasında hastalığı engelleme yeteneği araştırılmıştır. Fosforu yüksek oranda çözebilen iki PGPR izolatının yaprak enfeksiyonunu %88-100 oranında, bir PGPR izolatu ise gövde enfeksiyonunu %63 oranında engellediği belirlenmiştir.

Egamberdieva ve ark. (2017), yapmış oldukları çalışmada tıbbi ve aromatik bitkilerin etkinliklerinin dokularında barındırdıkları endofit bakteri miktarına ve çeşitliliğine bağlı olarak değiştiğine yönelik bulgular elde etmiş ve *A. spanius* muhteva eden sarı kantaron bitkilerinden elde edilen ekstraktların *in-vitro* koşullarda *F. culmorum*, *F. solani*, *G. graminis*, ve *A. alternata* etmenlerine karşı *in-vivo* koşullarda ise domates bitkilerinde *F. oxysporum* etmenine karşı etkin bulunmuşlardır.

Aktan (2018), Sağlıklı badem bitkilerinin farklı kısımlarından endofit ve epifit bakterilerin izolasyonu, teşhisi, *S. sclerotiorum*, *Ceratobasidium* sp., *M. phaseolina*, *F.*

oxysporum ve *P. chlamydospora* etmenlerinin misel gelişimlerinin *in vitro* koşullarda engelleme potansiyellerinin ikili kültür testleri ile belirlenmesine yönelik yapılan çalışmada elde edilen 97 bakteri izolatının 46'sı patojenlere karşı test edilmiş ve ikili kültür testlerinde *Bacillus subtilis* ssp. *subtilis* AEP3 (Pc), *Bacillus mojavensis* AEP109 (Pc), *B. vallismortis* AEPBT113 (Mp, Ss), *B. cereus* AEP2 (Mp, Ss, *Serratia marcescens* AEN38 (Cb), *Pseudomonas chlororaphis* ssp. *aurantiaca* AEP119 (Ss) ve *Ochrobactrum anthropi* AEP84 (Pc), hastalık etmenlerinin misel gelişimlerini %63.75-79.58 gibi yüksek oranlarda engellemek suretiyle güçlü *in vitro* antagonistik etkinlik gösterdiği belirlenmiştir.

Sazinas ve ark. (2019), *Pseudomonas fluorescens* grubunda yer alan bakterilerin pek çoğunun siderofor üretimi yaptığını, bu sideroforlar arasında bir grup (thioquinolobactin sideroforları) büyük önem taşıdığını yapmış oldukları çalışmada *Pseudomonas gessardii* grubuna ait bir izolatın (*Pseudomonas* sp. DTU12.1) yüksek oranda thioquinolobactin siderofor ürettiğini tespit etmişlerdir. Bu siderofor grubu oomycetes bazı fungus türleri üzerinde biyoaktivite göstermektedir. Bu nedenle *Pseudomonas* cinsine ait izolatların biyokontrol mekanizmalarının araştırılması ve bu mekanizmaların uygulamada daha aktif kullanılması büyük önem taşımaktadır.

2.3.3. EB İzolatlarının Bitki Gelişimini Teşvik Edici Özelliklerinin Araştırılması

Patriquin ve Döbereiner (1978), *Graminea* familyasına bağlı çok sayıda konukçu bitkiden izole edilen diazotrofik bakterilerin, biyolojik N₂ fiksasyonuna aktif olarak katılması ve N fikse etmesi birçok araştırmacı tarafından belirlenmiştir (Diem ve ark., 1978;).

Van Loon (1984), tarafından yapılan çalışmada ACC-deaminase enzimi üreten endofit bakterilerin inokule edildikleri bitkilerde, olumsuz koşullar altında gelişmeyi destekleyici özellikleri ve bitkilerin strese olan toleransını artırmaları gibi yararlı etkileri olduğunu tespit edilmiştir. Fungal patojenlerin infeksiyonunda olduğu gibi çevresel stresten bitkilerin zarar görmesi, stress anında etilen seviyesindeki artışa bağlı olarak bitkinin direk tepkisinin bir sonucu olarak oluşabilir. Dolayısıyla ACC-deaminaz, bitki gelişme döneminde stres altındayken artan etilen seviyelerini düşürerek, bitkinin gelişimini destekleyici etkisi ile sigorta görevi görebilmektedir.

Quispel (1991), yapmış olduğu çalışmada bitki gelişimini artıran endofit bakterilerin en çok çalışılmış yönünün, azot fiksasyonu olduğunu belirterek son dönemlerdeki çalışmaların, biyolojik olarak fikse ettikleri nitrojeni (Biyolojik Azot Fiksasyonu-BNF) doğrudan konukçularının kullanımı için uygun forma dönüştüren endofit diazotroflar üzerine yoğunlaştığını belirtmiştir. Bu gibi simbiyotik sistemler endofit bakterilerin, kök yüzeyindeki rizosfer mikroorganizmaları ile rekabetlerinin azalmasında, metabolik substratlara kolay erişimlerinde, uygun ortam koşulları sağlanmasında ve çok yüksek oksijen konsantrasyonlarından korunmada avantajlar sağlamaktadır.

Kloepper ve ark. (1991), tarafından yapılan çalışmada ise endofit bakterilerin bitki gelişimini artıran mekanizmaları ile benzer şekilde konukçuları üzerinde yararlı etkiler meydana getirdiği belirtilmiş, Höflich ve ark., (1994) da benze şekilde bitki gelişimini artıran bakterilerin, bitkide büyüme ve gelişmeyi doğrudan ya da dolaylı olarak desteklediğini, bitki gelişimini desteklenmesindeki doğrudan etkisinin, bu bakterilerin sentezledikleri bileşikler ile bitkiye yarar sağlamaları veya bulundukları ortamda bitkiler için bazı besinlerin alınımını kolaylaştırmaları şeklinde, bitki gelişiminin desteklenmesindeki dolaylı etkilerini ise, bir veya daha fazla fitopatojenik organizmanın zararlı etkilerini azaltması veya engellemesi şeklinde açıklamıştır.

Sturz ve ark. (1998), Patates yumrusundan izole edilen endofit bakterilerin %10'unun bitki gelişimini desteklediği saptanmıştır. Ayrıca ürün rotasyonu içerisindeki patates ve yonca ile yaptığı araştırmalarda, izole edilen endofit bakterilerin %21'inin bitki gelişimini desteklediği, bunun sürgün uzunluğunda %63, sürgün yaş ağırlığında %66, kök yaş ağırlığında %55 oranında artış olarak ortaya çıktığını gözlemlenmiştir.

Glick ve ark. (1995-1998), yaptıkları pek çok çalışma ile bitki gelişimini teşvik eden bakterilerin çoğunun ACC (aminocyclopropane-1-carboxylate) Deaminase enzimine sahip olduklarını yaptıkları çalışmalar ile göstermiştir. Bitki gelişimi içerisinde, etilen seviyelerinin düzenlenmesinde ACC-deaminase'ın etkili olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca bitki ile ilişkili bazı bakteriler, kodladıkları ACC-deaminase enzimini kullanarak etilenin öncülü olan ACC'yi parçalayarak, karbon ve azot kaynağı olarak ortaya çıkan son ürünlerden besin olarak faydalanabilir. Dolayısıyla, bitki dokularının içerisinde bu bakteriler kolonize olur. Bunu takiben ACC, bu bakteriler tarafından etkili bir şekilde parçalanır ve eş zamanlı olarak düşük etilen seviyelerinde

ve stresli koşullar altında bitki gelişimi yeniden teşvik edilir. Kök uzunluğunda ve bitki biomasında artış gibi bitki gelişiminin desteklenmesinin, *Burkholderia phytofirmans* ve *B. cepacia* izolatları, *Methylobacterium fujisawaense*, *Pseudomonas* spp., *Arthrobacter* spp. ve *Bacillus* spp. gibi endofit bakteri türleri tarafından ACC-deaminaz üretimine bağılı olduğu kaydedilmiştir.

Patten ve Glick (2002), bitki gelişimini artıran bakterilerde, IAA'nın üretimi, diğerk bitkiye yararlı özellikler ile yakından ilişkili olduğunu bildirmişlerdir. IAA üretiminin, bitki gelişiminin desteklenmesi üzerindeki rolünü kanıtlanmışlardır. Bitkiye yararlı *Pseudomonas putida* GR12-2 izolatının kök gelişimini ve lateral kök oluşumunu desteklemesi, fonksiyonel IAA biyosentez yolunun varlığıyla ilişkilendirilmişlerdir. *P. putida* GR12-2'nin IAA sentezinden yoksun mutantları ile yapılan çalışmada, bu izolatların bitki gelişimini destekleme potansiyelini kaybettiğı gözlemlenmiştir.

Forchetti ve ark. (2007), sulak ve kurak rejimlerde yetiştirilen ayçiçeğı bitkilerindeki endofit bakterileri ile yaptıkları çalışma ile, fosforu çözebilme aktivitesine sahip endofit bakterilerin daha çok kuraklığa maruz kalan bitkilerden izole edildiğini göstermiştir. Fosforu çözebilen bakterilerin tümünün, birkaç fitohormonu üretebilme ve nitrojenden zengin bir ortamda gelişebilme yeteneğı gibi diğerk bitkiye yararlı özelliklere de sahip olduğunu ortaya çıkarmıştır. Ayrıca, çevresel baskı altında fosforu çözebilen bakteriler, bitkilerin aktif gelişme aşamasında destekleyici özellik gösterebilir olduğunu ortaya koymuşlardır.

Tsavkelova ve ark. (2007), karasal orkide bitkilerinden izole ettiğı endofit ve rizoplane bakterilerini analiz etmiştir. Bu analizler sonucunda *Erwinia*, *Bacillus*, *Pseudomonas* ve *Flavobacterium* gibi cinsleri içeren bu endobakteriyel izolatların, IAA üretimlerini gözlemlenmiştir. Bu kültürlerden yapılan ortalama ölçümlere göre, endobakteriyel toplulukların, rizoplardan izole edilen bakteri topluluklarından daha etkili IAA üreticileri olduğu bu araştırmacılar tarafından gözlemlenmiştir. Börölce bitkisinde yapılan çalışmaya göre, endofit bakteri kültürlerinin süpernatantlarının uygulandığı bitkilerde; kök oluşumu önemli ölçüde teşvik edilmiş, gelişen köklerin sayısında ve uzunluğunda kontrollere göre artış gözlemlenmiştir. Bu durum, kök gelişiminde endobakteriyel oksinlerin, potansiyel olarak önemli bir role sahip olduğunu göstermektedir.

Puente ve ark. (2009), Bitki endofit bakterileri arasında yaygın bir diğer özelliğin fosforu çözebilme aktivitesi olduğunu, Çilek, soyafasulyesi, baklagiller, ayçiçeği ve kaktüs' deki endofit bakterilerin çoğunluğu (%59-100) petri tabaklarında yapılan deneylerde mineral fosforu çözebilme yeteneği göstermiştir (Dias ve ark., 2009; Palaniappan ve ark., 2010)

Shi ve ark. (2010), *Bacillus pumilus* 2-1, *Chryseobacterium indologene* 2-2 ve *Acinetobacter johnsonii* 3-1 endofit bakterileri ile şeker kamışı bitkilerinin inokule edilmişleri ile inokule edilmemiş bitkilerinin karşılaştırıldığı da bitkinin klorofil içeriğinin ve bitkide karbonhidratların sentezinin inokule edilenlerde artmış olduğunu gözlemlemişlerdir.

Hardoim (2011), yapmış olduğu çalışma ile endofit bakteri topluluklarının bir diğer yaygın özelliklerinin, sideroforlar aracılığıyla demirin alınması olduğunu bildirmiştir. Çeltik bitkisinden izole ettiği endofitlerin metagenomunda, siderofor biyosentezi, iyon-siderofor membran resptörleri, demir alınımını sağlayan taşıma ve depolama proteinleri gibi ilişkili potansiyel proteinleri kodlayan genlerin çok sayıda bulunduğunu belirtmiştir. Demir için, ökaryodik konukçu dokularının yanısıra toprak içerisinde rekabet sürekli olarak devam etmektedir. Demiri bağlama yeteneğinde olan endofit bakteriler, ortamda bulunan patojenlerin demirden faydalanmasını sınırlayarak, dolayısıyla bu patojenik bakteriler üzerinde antagonistik aktivite gösterir.

Abdel-Rahman ve ark. (2017), Mısır'da farklı bölgelerde sulama kanallarından toplanan örneklerden elde edilen 15 farklı bakteri izolatının domates yetiştiriciliği yapılan toprağa inokule edilmesinden sonra bitkilerde gelişimi en çok teşvik eden izolatın teşhis edilmesi sonucu *Achromobacter* sp. EMCC1936 izolatı elde edilmiş ve bu bakterinin bitki gelişimini teşvik edici özellikleri karakterize edildiğinde yüksek miktarda IAA ürettiği ve fosfat kayaçlarının çözülerek bitki tarafından alınabilir hale getirilmesinide yüksek etki mekanizmasına sahip olduğu tespit edilmiştir.

Li ve ark. (2018), Meyan kökü bitkisinden elde edilen endofit bakterilerin bitki gelişimini teşvik edici özellikleri karakterize edilmiş ve bu özellikler arasında serbest azotun bağlanması, fosfat ve potasyum çözünürlüğü, siderofor üretimi, oksin sentezi ve hidrolitik enzimlerin üretimi gibi bitki büyümesini teşvik edici etkinlilerin sergilendiği tespit edilmiştir. Bu bakteriler *ex-situ* koşullarında ve iklim odalarında meyan ve buğday

bitkilerinde etkinliklerine bakıldığında *Bacillus* sp. ve *Achromobacter* sp. türlerinin kurak ortamlarda meyan kökü ve diğer kültür bitkilerinin daha uzun süre hayatta kalmasını ve büyümesini teşvik etmek açısından biyogübre olarak kullanılabilirliğinin tespiti yapılmıştır.

Soto ve ark. (2019), yapmış oldukları çalışmada ağır metaller ile bulaşık topraklarda yetiştirilen bitkilerin toksisite nedeni ile gelişememe ve verim verememesi üzerine bu topraklarda ağır metallere karşı dayanıklı bazı mikroorganizmaların kullanımı ile bu topraklarda IAA, siderofor üretimi ve fosforun alınabilir hale getirilmesi sayesinde bitkilerin yetiştirilebilir ve ürün alınabilir hale getirilmesini mümkün kılmışlardır. Bu çalışmada *Pseudomonas gessardii* ve *Brevundimonas intermedia* izolatları birlikte kullanıldığında yüksek miktarda siderofor üretimi, fostatın bitki tarafından alınabilir hale geldiği ve yüksek miktarda IAA üretiminin olduğu tespit edilmiştir. Aynı zamanda bu mekanizmaların kullanımı bitkilerde metallothionein, superoxide dismutase, ascorbate peroxidase ve phytochelatin synthase genlerinin yüksek oranda sentezlendiğini ortaya çıkarmıştır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Çalışmanın ana materyalini Ankara, Eskişehir, Burdur, Niğde ve Konya illeri ve ilçelerinde fasulye yetiştiriciliği yapılan tarlalardaki hastalıklı bitki örneklerinden izole edilen *Psp*, sağlıklı bitki örneklerinin kazık kök, kök boğazı, gövde, yaprak ve meyvelerinden izole edilen aday Antagonist/PGP özelliklere sahip EB izolatları oluşturmuştur.

Çalışmanın diğer materyallerini bakteriyoloji laboratuvarı alet ve ekipmanları, moleküler çalışmalarını gerçekleştirmek için moleküler biyoloji laboratuvarı alet ve ekipmanları, tür teşhislerini gerçekleştirmek için Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Bitki Sağlığı Kliniği MALDI-TOF ünitesi ve ilgili ekipmanları, çeşitli cam ve plastik laboratuvar malzemeleri, besi ortamları, kimyasal maddeler, patojenisite testlerinin yapılması ve denemenin kurulması için gerekli olan saksılar, torf-perlit, kimyasal gübreler, çeşitli bitki tohumları oluşturmuştur.

3.2. Yöntem

3.2.1. Sörvey Çalışmaları

Çalışmalarda kullanılan hastalık etmeni ve etkinlikleri araştırılmış olan EB izolatları 2015 ve 2016 yılı üretim sezonlarında Ankara, Eskişehir, Burdur, Niğde ve Konya illerindeki önemli fasulye üretim alanlarından tesadüfi örnekleme yöntemine göre yapılan Sörvey çalışmaları ile elde edilmiştir. Fasulye bitkilerinin çiçeklenme döneminde itibaren Sörvey çalışmalarına başlanmış ve meyve olgunlaşma döneminin sonuna kadar devam edilmiştir.

EB izolatlarının elde edilmesine yönelik olarak, öncelikle *Psp* ile enfekteli (varsa) bitkilerin etrafındaki sağlıklı fasulye bitkilerinin kazık kök, kökboğazı, gövde, yaprak ve meyvelerinden, etmen ile enfekteli bitki bulunamaması durumunda ise her tarladan, bölgeyi temsil edecek sayıda sağlıklı fasulye bitkilerinden örnekler alınmıştır.

Sörvey çalışmaları süresince, hastalık etmeninin izolasyonu amacıyla fasulye üretim alanlarındaki bitkiler *Psp*'nin varlığı açısından incelenmiştir. Hastalık etmeninin oluşturduğu belirtiler açısından şüpheli bulunan bitkilerden örnekler alınmıştır (Şekil 3.1). Sörveyler sırasında gazete kâğıdına sarılarak polietilen torbalara konulan örnekler, soğuk zincirde Zirai Mücadele Merkez Araştırma Enstitüsü Bakteriyoloji Laboratuvarına getirilmiştir.

Çizelge 3.1. 2015 ve 2016 üretim yıllarında Sörvey yapılan illerde fasulye üretim alan ve örnekleme yapılan toplam alan, alınan örnek sayısı ve elde edilen toplam EB izolatı sayısı

Örnek Alınan		İncelenen Alan		
İl	İlçe	Ekim alanı (da)	Örneklenen alan (da)	Örnek sayısı
Niğde	Çamardı	9,370	469	9
	Merkez	39,330	1,967	22
	Ulukışla	6,455	323	6
Konya	Altınekin	25,250	1,263	4
	Çumra	85,000	4,250	7
	Derbent	7,175	359	2
	Kadınhanı	25,000	1,250	5
	Meram	6,078	304	2
	Sarayönü	6,850	343	2
	Selçuklu	10,350	518	5
	Yünak	6,600	330	1
	İnönü	400	20	2
Eskişehir	Mihalıçcık	750	38	3
	Sarıcakaya	1,510	76	8
	Seyitgazi	675	34	3
	Tepebaşı	930	47	6
	Ağlasun	1,332	67	2
Burdur	Çavdır	2,500	125	3
	Çeltikçi	653	33	1
	Göhlhisar	1,600	80	2
	Karamanlı	600	30	1
	Merkez	8,401	420	9
	Ayaş	1,250	63	1
Ankara	Çubuk	1,290	65	1
	Kazan	3,200	160	1
	Kızılcahamam	1,298	65	1
	Polatlı	2,035	102	1
TOPLAM		257.882	12,801	110



Şekil 3.1. Üretim alanlarında Sörveyler esnasında görülen belirtiler incelenerek hastalığın tipik belirtilerinin (ok) görüldüğü bitkiler (A ve B). Şiddetli enfeskiyon sonucu tarla genelinde yoğun sararmalar ve yaprak dökümlerinin gözlemlendiği tarladan genel görünüm (C)

3.2.2. Çalışmalarda Kullanılan Besi Yerleri ve İçerikleri

Çalışmada kullanılan besi yerleri kullanılmadan önce 121 °C’de 15 dk. otoklav edilmiştir. Denemelerde EB ve hastalık etmeni izolatların izolasyonu ve tanısında King’s B Agar (KB), Luria Bertani Broth (LB), Nutrient Agar (NA) ve Trypic Soybean Agar

(TSA) besi yerleri ticari olarak temin edilmiş (Merck, Darmstad, Germany) ve kullanılmıştır. Besi yerlerinin kimyasal içerikleri Ek-1 de verilmiştir.

3.2.3. Aday EB İzolatların İzolasyonu

EB izolatları yüzey sterilizasyonu yapılmış kazık kök, gövde, meyve ve yapraklardan elde edilmiştir. Bu kapsamda arazilerden getirilen bitkiler öncelikle tamamen topraklarından arındırılmış olarak laboratuvara getirilmiştir. Bitkilerin daha sonra kök, gövde, meyve ve yaprakları ayrılmış, tüm örnekler akan çeşme suyu altında yıkanarak yüzeydeki mikroroganizma ve kalıntılardan arındırılmış daha sonrada izolasyon için kağıt havlularda kurutulmuştur.

EB izolatların elde edilmesinde en önemli nokta örneklerin epifit mikroorganizmalardan arındırılmasıdır. Bu amaçla ön yıkaması yapılmış ve kurutulmuş farklı bitki aksamalarının (kök, kök boğazı ve gövdelerden alınan dokular) önce %70'lik etil alkolde (3 dakika) daha sonra %1'lik sodyum hipoklorit solüsyonunda 2 dakika bekletildikten sonra tekrar %70'lik etil alkolle ile muamale edilmiştir. Örnekler üzerindeki alkol ve sodyum hipokloriti uzaklaştırmak için örnekler 5 kez steril su ile yıkanarak yüzey dezenfeksiyonu aşaması tamamlanmıştır.

Yüzey sterilizasyonu yapılmış kazık kök, gövde ve meyveler steril bistüri ile açılarak iç dokuları doğrudan besi yeri üzerine baskılama (imprinting) veya steril eppendorf tüpü içinde herhangi bir tampon solüsyon konulmaksızın ezilip ortaya çıkan özsuyununun besi ortamlarına çizimi/ekimi şeklinde izolasyonları yapılmıştır (Strobel ve ark., 2004). Yapraklardan endofit izolasyonu, yaprakların doğrudan steril 50 mM MgCl₂ tampon solüsyonunda (pH 7.2) ezildikten sonra elde edilen süspansiyondan KB besi yerlerine baget ile yayılmak suretiyle yapılmıştır.

Her iki şekilde ekimi yapılan petriler 26 °C'de 24-48 saat inkubasyona bırakılarak, ortaya çıkan bakteri kolonilerinden saflaştırmaya gidilmiştir. KB besi yerinde farklı koloni morfolojisine sahip olarak gelişen, petriyi temsil edecek şekilde seçilmiş her bir koloni bir izolat olarak değerlendirilmiştir (Schaad ve ark. 2001).

Besi ortamlarında gelişen farklı koloniler saflaştırılarak kodlanmış olup, etkinlik ve mekanizmaların belirleneceği çalışmalarda kullanılmak amacıyla, tekrarlı olarak KB veya TSA besi ortamları içeren eğik tüplerde +4 °C'de kısa süreli (3 aya kadar), %40

gliserol içeren Nutrient Broth besiyeri içeren cryotüplerde ise -20 °C’de uzun süreli muhafaza edilmiştir.

3.2.4. Fasulye Hale Yanıklığı Hastalık Etmeni *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*’nın İzolasyonu

Hastalık etmeni *Psp*, fasulye bitkilerinin tipik hastalık belirtisi gösteren yaprak ve meyvelerinden izole edilmiştir. Etmenin izolasyon çalışmaları kapsamında, şüpheli bitki örnekleri kese kağıtlarında soğuk zincirde laboratuvara ulaştırıldıktan sonra hemen izolasyon prosedürlerine başlanmıştır. Hastalık belirtisi gösteren yaprak materyalleri, ilk önce yabancı maddeleri arındırmak için akan musluk suyunda yıkanmış, kağıt havlu ile kurutulmuştur. Yapraktan izolasyonda, yaprak yüzeyi önce %70’lik etil alkol silinmiş daha sonra hastalık belirtileri ile sağlıklı dokuyu birlikte içeren kısımlara (1 cm²) kesildikten sonra parçalar %1’lik sodyum hipoklorit solüsyonunda 2 dakika bekletildikten sonra yüzey dezenfeksiyona tabi tutulmuştur. Yüzey dezenfeksiyonu yapılmış yaprak parçaları üzerindeki alkol ve sodyum hipokloriti uzaklaştırmak için örnekler 5 kez steril su ile yıkanarak yüzey dezenfeksiyonu aşaması tamamlanmıştır. Yüzey dezenfeksiyonu yapılmış yaprak parçaları içerisinde steril 50 mM MgCl₂ tampon solüsyonu (pH 7.2) bulunan steril eppendorf tüplerinde ezilmiş, elde edilen bitki özsuyu 10⁻¹ ve 10⁻² oranlarında seyreltilmiş ve daha sonra bu seyreltmeler baget yardımı ile KB besi yerine ekilmiştir.

Hastalık etmeninin tipik ıslaklık belirtisi gösteren meyvelerden izolasyonunda, doğrudan ıslaklık belirtilerin görüldüğü noktaların üst epidermis yüzeyi %70 elkol ile silinerek ön dezenfeksiyonu yapılmış, ardından üst epidermis dokusu steril bistirü ile kesilip atıldıktan sonra hemen altındaki ıslak iç dokusu steril bistirü ile kesilip aseptik olarak çıkartılmış ve bu küçük parçalar KB besi yeri yüzeyine doğrudan sürülerek (veya baskılama yaparak) herhangi bir ezme/sulandırma yapmaksızın saf olarak izole edilmiştir.

Ekim yapılmış petriler 26 °C’de 48 saat süreyle inkubasyona bırakılmıştır. İnkubasyondan sonra petrilerde gelişen yuvarlak, açık mavi-yeşil krem renkli, UV ışık altında floresan ışıltı yapan koloniler saflaştırılarak tanılama çalışmaları için %40’lık gliserol içeren Nutrient Broth besiyerinde -20 °C’de muhafaza edilmiştir (Lelliot ve Stead, 1987).

3.2.5. İzole Edilen Aday EB İzolatlarının Ön Seçimi

EB izolatlarının öncelikli olarak insanlarda ve sıcakkanlı canlılarda patojen olup olmadıklarına dair +37 °C de gelişmelerine bakılmış ve gelişme göstermeyen izolatlar ile bu izolatların bitkilerde patojen olup olmadıklarını değerlendirmek için Tütün Aşırı Duyarlılık Testi (HR=Hipersensitif Reaksiyon) ve Patates Pektolitik Aktivite testleri yapılmıştır. Patojen olmadığından emin olunan EB adayı izolatlar ile çalışmalara devam edilmiştir. Bu testlerin yapılış ve değerlendirilmeleri şu şekildedir.

37 °C’de Gelişme: EB izolatlar NA besiyerine ekilmiştir. Petrilerdeki besi ortamının kurumasını önlemek için petriler polietilen bir poşet ile veya parafilm ile sarılarak muhafaza altına alınmıştır. Daha sonra petriler +37 °C sıcaklığa ayarlanmış inkübatöre yerleştirilerek 3 gün süre ile gelişmeye bırakılmıştır. Üç gün süre sonra petrilerde gelişme gösteren izolatlar pozitif olarak kabul edilmiş, gelişme göstermeyen izolatlar ise negatif olarak değerlendirilmiştir. Pozitif olarak kabul izolatlar çalışmalardan çıkartılarak otoklav içerisinde steril edilerek yok edilmiştir. Negatif olarak kayıt edilen gelişme göstermeyen izolatlar daha sonraki testlere alınmıştır.

Tütünde Aşırı Duyarlılık Testi (HR= Hypersensitive Reaction): NA besiyerinde taze olarak geliştirilen EB izolatları ile Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Bitki Sağlığı Kliniği Kültür Koleksiyon Merkezinden sağlanan, tanılması yapılmış bitki patojeni izolat (*Psp* 12 izolatı) kültürlerinin steril 0.05 mM MgCl₂ tampon çözeltisi içinde yaklaşık olarak 10⁸-10⁹ cfu/mL konsantrasyonda olacak şekilde süspansiyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan süspansiyonlar tercihen Burley çeşidi tütün bitkilerinin yapraklarına steril şırınga ile (özellikle damar aralarında yayılacak şekilde) inokule edilmiştir (Şekil 3.2). 24 saat sonra inokule edilen bitki dokularının çökerek ölmesi şeklinde sonuç veren izolatlar Tütün HR (+) olarak, inokulasyon yapılan yapraklardaki dokularda çökmeye neden olmayan izolatlar ise Tütün HR (-) olarak değerlendirilmiştir (Lelliott ve Stead, 1987).



Şekil 3.2. EB izolat süspansiyonlarının tütün bitkisinin yapraklarına enjeksiyon yoluyla inokulasyonu.

Patateste Pektolitik Aktivite (Yumuşak Çürüklük) Testi: Yıkılmış ve saf etanole batırıldıktan sonra yüzeyleri yakılmış olan 7-8 mm kalınlığındaki patates dilimleri, steril filtre kağıtları içeren petriler içerisine yerleştirilerek üzerlerine Nutrient Agar besiyerinde taze olarak geliştirilen endofit bakterilerin yaklaşık olarak 10^8 - 10^9 cfu/mL konsantrasyonda olacak şekilde hazırlanmış süspansiyonları damlatılarak steril öze yardımı ile patates dilimi üzerine yayılmıştır. Kontrol olarak Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Bitki Sağlığı Kliniği Kültür Koleksiyon Merkezinden sağlanan ve *Pectobacterium caratovorum* subsp. *caratovorum* olarak tanımlanmış Pcc5 izolat kullanılmıştır. İnokule edilmiş dilimler 22 °C sıcaklıkta 24 saat bekletilmiş ve patates dilimleri üzerindeki inokulasyon noktaları çürümeler yönünden değerlendirilmiştir (Lelliott ve Stead, 1987). Patates dilimlerinde yumuşak çürüklük oluşumu pozitif olarak kabul edilmiş (Şekil 3.3) ve pozitif reaksiyon veren (varsa) izolatlar bitki patojeni olması nedeniyle elenmiştir



Şekil 3.3. Patates dilimlerinde pektolitik aktivite (yumuşak çürüklük) testi. (A), Pektolitik aktivite gösteren izolatların patates dilimlerinde oluşturduğu yumuşak çürüklük belirtisi (ok) ve Pektolitik aktivite göstermeyen izolatın (*) belirtisi

Fasulye meyvelerinde patojenite Testi: +37 °C’de gelişme göstermemiş, Tütün HR ve Pektolitik Aktivite Testi negatif olarak belirlenmiş izolatların patojenisite testleri daha önceki çalışmalarda duyarlı olarak bildirilen Gina fasulye çeşidinin meyveleri üzerinde yapılmıştır (Soylu ve ark., 2007). Meyve inokulasyonları Harper ve ark. (1987) tarafından bildirilen yöntemlere göre yapılmıştır. Meyve inokulasyonunda King B ortamına ekimi yapılmış 48 saatlik EB kültürlerindeki bir koloniden steril bir kürdan ile alınan inokulum (yaklaşık 0.1 g) genç meyvelerin üzerine 0.5 cm. aralıklarla 5 tekerrürlü olmak üzere batırma şeklinde inokule edilmiştir (Şekil 3.4). Kontrol olarak Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Bitki Sağlığı Kliniği Kültür Koleksiyon Merkezinden sağlanan *Psp* 12 izolat kullanılmıştır. Meyveler şeffaf plastikten yapılmış nem çemberlerine konarak 25 °C’de inkübasyona bırakılmıştır. İnokulasyon noktalarında herhangi bir ıslaklık belirtisi oluşturmeyen izolatlar aday EB izolatu olarak çalışmalarda kullanılmak üzere saklanmıştır.



Şekil 3.4. Fasulye meyvesi üzerinde EB izolatlarının patojenite testi. Sağlıklı bitkiden elde edilen izolatların bazıları meyveler üzerinde inokulasyon noktasında ıslaklık belirtisi (ok) oluşturması nedeniyle denemelerden çıkartılmıştır.

3.2.6. Aday EB İzolatlarının Tanılanması

Ön seçimi yapılan EB izolatları, morfolojik ve biyokimyasal özelliklerine göre (koloni rengi, King B besi ortamında flüoresan ışıltama göstermesi, koloni gelişimi (normal/mukoid), gram +/-) değerlendirilmiştir. Aday endofit izolatların kesin tür tanısı MALDI-TOF kütle spektrofotometrisi (Matriks Assisted Lazer Desorption Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry/ Matriks Destekli Lazer Desorpsiyon İyonizasyon-Uçuş Süreli Kütle Spektroskopisi) (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany) ile (Pavlovic ve ark., 2012) gerçekleştirilmiştir.

MALDI-TOF analizlerinde, 24-36 saat süre ile TSA besiyerinde geliştirilen EB kolonilerinden kürdan yardımıyla bir miktar bakteri kütlesi içerisinde 300 µL steril su bulunan eppendorf tüpleri içerisine eklenmiş ve tüpler vortex cihazında karıştırılarak bakteri süspansiyonu elde edilmiştir.

Tüplerin içerisine 900 µL %100 ethanol (Merck, Damstrad, Germany) eklendikten sonra karışım 13,000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilmiştir. Tüplerdeki süpernatant atılmış oluşan pellet tekrar 13,000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Herhangi bir şekilde kalan ethanol kalıntısı görülmüş ise pipet yardımıyla dikkatli bir şekilde uzaklaştırılmış ve oluşan pellet 5 dakika oda sıcaklığında kuruması sağlanmıştır. Pellet kuruduktan sonra

üzerine 30 µL %70 formik asit (Merck, Darmstad, Germany) eklenerek 13,000 rpm’de 1 dakika tekrar vortekslenmiş, sonra 30 µL acetonitril eklenmiş tekrar 13,000 rpm’de 1 dakika vortekslenerek karışım iyice çözdürülmüştür. Son olarak süpernatant’dan 1 µL alınarak örnek plakasındaki (target) noktalara iki tekrarlı olacak şekilde eklenmiş, oda sıcaklığında yaklaşık 3-5 dakika kurumasını müteakiben, her örnek noktası üzerine 1 µL HCCA matrix (α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid) solüsyonu (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany) eklenmiş ve yaklaşık 3-5 dakika kuruması sağlanmıştır. Cihazın kütle kalibrasyon standardı olarak Brukers Bacterial Test Standard (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany) kullanılmıştır.

Örnekler MALDI-TOF MS (Microflex LT; Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany) cihazına Flex Control Software (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany) yazılımı ile yüklenmiştir. Her bir spektrum otomatik modda örneklerin iyonlaşması için gereken minimum lazer gücü olan 500 lazer ışını ile elde edilmiştir. Spektrum 2-20 kDa aralığındaki m/z (kütle/yük) oranında analiz edilmiştir. Mikoroganizma kütüphanesi olarak BIOTYPER™ 3.1 programı (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany) kullanılmıştır. MALDI-TOF cihazı tarafından belirlenen teşhisleri firma tarafından önerilen değerlere göre yapılmıştır. Teşhis sonucunda ortaya çıkan skor değeri 2.3 - 3.0 aralığında tanının tür düzeyinde oldukça güvenilir olduğu; 2.00 - 2.299 aralığında kesin cins düzeyinde güvenilir, tür düzeyinde yüksek güvenilir olduğu; 1.70 - 1.999 arasında tanının cins düzeyinde güvenilir, tür olarak muhtemel düzeyde olduğu; 1.7 değerinden aşağı olan değerler ise güvensiz tanı olarak değerlendirilmiştir.

3.2.7. Fasulye Hale Yanıklığı Hastalığı Etmeni *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*’nın Tanılanması

3.2.7.1. Hastalık Etmenin Biyokimyasal, Morfolojik ve Patojenisite Yöntemleri ile Tanılanması

Hastalık belirtisi gösteren bitkilerden alınan örneklerin King B besi yerinde floresan özellik gösteren kolonilerinin izole edilmesi sonrası elde edilen her bir koloni bir izolat kabul edilmiş ve her bir koloniye Psp olup olmadığını kontrol amaçlı Gram Reaksiyon, LOPAT testi (Nutrient Sucrose Agar (NSA) ortamında Levan koloni oluşturma, Oksidaz,

Patateste pektolitik aktivite testi, tütün, Arginin dehidrolaz testi, Tütünde hipersensitif reaksiyon testi) yapılmış ve Schaad, ve ark. (2001) tarafından bildirilen test sonuçları ile uyumlu olan izolatlar ile çalışmalara devam edilmiştir. Referans izolat olarak HMKÜ Bitki Sağlığı Kliniği Kültür Koleksiyon Merkezinden sağlanan ve tanılması yapılmış *Psp* 12 izolatı kullanılmıştır.

Levan Oluşumu: Nutrient Agar besi yerine %5 oranında sakkaroz (sukroz) eklenerek hazırlanan Nutrient Sukroz Agar (NSA) besi yerine *Psp* olduğundan şüphe edilen izolatların çizgi ekimi yapılmış ve tüm kültürler 27°C’de 3-4 gün inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda besi yeri üzerinde kalın, beyaz, konveks, mukoid koloni oluşumu gösteren izolatlar pozitif oluşturmayanlar negatif olarak değerlendirilmiştir.

Oksidaz testi: Taze hazırlanan %1’lik N,N,N,N’-Tetramethyl-1.4 phenylene diammonium diclorid eriği steril filtre kağıdına damlatılmıştır. *Psp* olduğundan şüphe edilen izolatların 48 saatlik kültürü steril öze ile ıslak kurutma kağıdına çizildiğinde 10 sn. sonra renk maviye dönüşmüşse pozitif, 60 sn. sonra maviye dönüşmüşse geç pozitif, 60 sn. sonra maviye dönüşmemişse negatif olarak değerlendirilmiştir.

Pektolitik Aktivite Testi: Taze ve hastalısız patates yumruları yüzey dezenfeksiyonu için %70’ lik alkole batırılmış ve hafif alevden geçirilmiştir. Yüzey dezenfeksiyonu yapılan patates yumruları steril bıçakla 7-8 mm kalınlığında dilimlere ayrılmış ve her dilim altında ıslak kurutma kağıdı olan steril bir petri kabına yerleştirilmiştir. Dilimlerin ortasına 27°C’de King B besi yerlerinde geliştirilmiş iki günlük EB kültürlerinden steril öze ile alınarak açılan çukurlara bulaştırılmıştır. Petri kapları kapatılarak oda sıcaklığında üç gün bekletildikten sonra kontrol edilmiştir. Kontrol olarak HMKÜ, Bitki Sağlığı Kliniği Kültür Koleksiyon Merkezinden sağlanan ve *Pectobacterium caratovorum* subsp. *caratovorum* olarak tanılanmış Pcc5 izolat kullanılmıştır. Yapılan kontroller sonrasında patates dilimleri sert ve kürdan batırıldığında kolayca batmıyorsa sonuç negatif, kürdan kolaylıkla batıyor, dilimde bir yumuşama, hafif pis koku ve suda sararma oluşmuşsa sonuç pozitif olarak değerlendirilmiştir (Lelliott ve Stead, 1987).

Arginine Dehidrolaz Testi: Taze olarak hazırlanan Thorney 2A (1 L distile su, 1 g peptone, 5 g NaCl, 0.3 g K₂HPO₄, 3 g Agar, 0.01 g Phenol red, 10 g/L L-arginine) besi yerinden cam tüplere 3'er ml konulmuş ve otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilizasyon işlemine tabi tutulmuştur. Daha sonra bu tüplere bakteri kültürleri aşılansmış ve üzerleri 2 ml sıvı parafinle kapatılmıştır. 7-10 gün 27°C'ye ayarlı inkübatörde inkübasyondan sonra ortam renginin pembe-kırmızıya dönmüşse pozitif, normal renk olan ten rengi açık pembe olarak kalmışsa negatif olarak değerlendirilmiştir.

Tütünde Aşırı Duyarlılık (HR) Testi: Elde edilen bütün aday *Psp* izolatları King B besiyerine ekildikten sonra 28 °C'ye ayarlı inkübatörde 2-3 gün inkübasyona bırakılmıştır. Gelişen kültürlerden steril distile H₂O ile seyreltme serisi hazırlanarak UV spektrofotometrede 10⁸ cfu/mL konsantrasyonunda süspansyonları hazırlanmış ve enjektörlerle tütün (*Nicotiana tabacum* L. Samsun) yapraklarının alt kısmından damar aralarına enjekte edilmiştir. Kontrol olarak HMKÜ, Bitki Sağlığı Kliniği Kültür Koleksiyon Merkezinden sağlanan *Psp* 12 izolatı kullanılmıştır. İnokule edilen bitkiler en az 8 saat ışıklı bir ortamda muhafaza edilmiş ve inokulasyonun yapıldığı bölgede nekroz oluşup oluşmadığı gözlemlenmiştir. Bu süre sonunda inokulasyon noktasında ölü doku oluşumu HR pozitif, oluşmaması ise HR negatif olarak değerlendirilmiştir.

Patojenisite Testi: İzole edilen floresan özellikteki, Tütün HR pozitif, Pektolitik Aktivite Testi negatif, biyokimyasal özellikleri belirlenmiş izolatların patojenisite testleri daha önceki çalışmalarda duyarlı olarak bildirilen Gina fasulye çeşidinin gerçek yapraklarında ve meyveleri üzerinde yapılmıştır (Soylu ve ark., 2007). Yaprak inokulasyonu tütün HR testinde kullanılan izolatların 10⁸ cfu/mL konsantrasyonunda süspansyonları fasulye yapraklarına püskürtülmesiyle yapılmıştır (Şekil 3.5). Meyve inokulasyonları Harper ve ark. (1987) tarafından bildirilen yöntemlere göre yapılmıştır. Meyve inokulasyonunda King B ortamına ekimi yapılmış 48 saatlik bakteri kültürlerindeki bir koloniden steril bir kürdan ile alınmış olan inokulum (yaklaşık 0.1 g) genç meyvelerin üzerine 0.5 cm. aralıklarla batırma şeklinde inokule edilmiştir. Kontrol olarak HMKÜ, Bitki Sağlığı Kliniği Kültür Koleksiyon Merkezinden sağlanan *Psp* 12 izolatı kullanılmıştır. Meyveler şeffaf plastikten yapılmış nem çemberlerine konarak 25 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnokulasyondan 10 gün

sonra yaprakta, 2-4 gün sonra meyveler üzerinde oluşan belirtiler incelenmiş ve tipik hastalık belirtilerinin oluşumu gözlemlenmiştir. Belirtilerden re-izolasyonlar yapılmış ve elde edilen re-izolatlarla daha önce yapılmış olan tanı testleri tekrar uygulanmıştır ve bu testlerden de pozitif sonuç alınmıştır. Elde edilen re-izolatlarla moleküler teşhis çalışmaları yapılmıştır.



Şekil 3.5. Hastalıklı bitkilerden elde edilen virulent *Psp* izolatının fasulye yapraklarında oluşturduğu tipik nekrotik leke ve etrafında hale oluşumları (ok)

3.2.7.2. Hastalık Etmenin Moleküler Yöntemlerle Tanınması

Psp izolatlarının DNAsı, QIAGEN DNeasy Tissue and Blood ekstraksiyon kiti ve üretici firması tarafından tavsiye edilen protokol kullanılarak elde edilmiştir. PCR çalışmalarında *P. s. pv. phaseolicola*'nın phaseolotoxin genine spesifik DNA'sının amplifikasyonu için P5.1/P3.1 primerleri kullanılmıştır.

Moleküler tanıda kullanılan kimyasallar:

6.5X Loading Dye; Bromofenol mavisi 30.0 mg; 5XTAE 4.25 mL Gliserol 5,75 mL

5xTAE Tamponu (pH= 8): Tris 54 g; Borik asit 27.5 g; EDTA 20 mL 0.5 M; Steril distile su 500 mL. Steril su içerisinde çözüldükten sonra karışımın pH sı 8 e ayarlanıp, toplam hacim steril distile su ile 1 L ye tamamlanmıştır.

1xTAE Tamponu: 100 mL 5xTBE nin hacmi steril destile su ile 500 mL ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

Ethidium Bromür Çözeltisi: 300 µL ethidium bromür 500 mL 0,5xTBE tamponu içerisine ilave edilerek hazırlanmıştır. Hazırlanan çözelti karanlık ortamda oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

DNA amplifikasyonu için PCR karışımının hazırlanması: PCR karışımı 0.2 mL ependorf tüplerde hazırlanmıştır. Karışımın içeriği (Toplam 25 µL); 2 µL Bakteri DNAsı, 12.5 µL *PCR Master Mix, 2 µL Forward primer, 2 µL Revers primer, 6.5. µL steril su, *PCR Master Mix 0.05 ünite/ µL Taq DNA, 4 mM MgCl₂, 0.4 mM dATP, 0.4 mM dCTP, 0.4 mM dGTP ve 0.4 mM dTTP ayarlanıp hazırlanmıştır.

PCR protokolleri:

P. s. pv. phaseolicola'nın tanısında kullanılan phaseolotoxin geninin PCR protokolü Schaad ve ark. (1995)'in da önerdiği gibi **P5.1** (5'-AGCTTCTCCTCAAAACACCTGC-3') ve **P3.1** (5'-TGTTCCGCCAGAGGCAGTCATG-3') primerleri kullanılmış ve agaroz jel üzerinde 500 bp büyüklüğünde bant oluşumu gözlemlenmiştir. PCR (Applied Biosystems - Veriti 96 Well) döngü koşulları ise;

DÖNGÜ KOŞULLARI				
Ön Denaturasyon	25 döngü			Son Uzama
94°C	94°C	58°C	72°C	72°C
2 dak.	1 dak.	1 dak.	2 dak.	8 dak.

PCR ürünlerinin elektroforez sisteminde belirlenmesi

Agaroz jelin ve elektroforez tampon solüsyonunun hazırlanması: %1' lik Agaroz jel hazırlanması; 100 ml 1XTAE buffer solüsyonu, 1 g agaroz (SigmaAldrich) tartılır ve solüsyonda agaroz ısıtılarak eritilir. Agaroz TAE buffer içerisinde eritildikten sonra solüsyon 45C sıcaklığa düşünceye kadar soğutulur ve 5ml Pronosafe ilave edilip hafifçe karıştırılarak Pronosafe'in solüsyonda homojen bir hal alması sağlanır. Pronosafe homojen bir şekilde solüsyonda dağıtıldıktan sonra tanka dökülerek jelin donması beklenir.

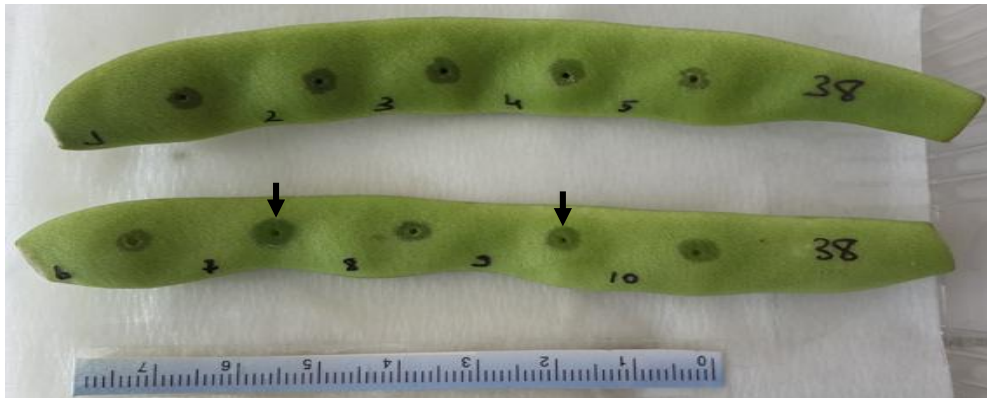
Agaroz jel donduktan sonra içinde 1X TAE buffer bulunan elektroforez tankı içerisine yerleştirilmiştir. Daha sonra tarak jelden dikkatlice çıkarılmış ve oluşan çukurlara 2 µL loading dye ve 8 µL PCR ürünü karışımı bir mikropipet yardımıyla karıştırılarak

çukurlara yüklenilmiştir. PCR ürünleri 80 volt elektrik verilerek yaklaşık 1 saat yürütülmüştür. Oluşan bantların moleküler ağırlıklarını belirlemek amacıyla 100bp'lik moleküler işaretleyici (BioLabs 100bp DNA Ladder N3231S) kullanılmıştır.

Agaroz jelin görüntülenmesi: Pronosafe ile hazırlanan jel üzerindeki bantların transiluminatörde UV ışık altında oluşturdukları yansımalar incelenmiş ve fotoğraflanmıştır.

3.2.8. *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* İzolatlarının Virülenslik Düzeylerinin Belirlenmesi

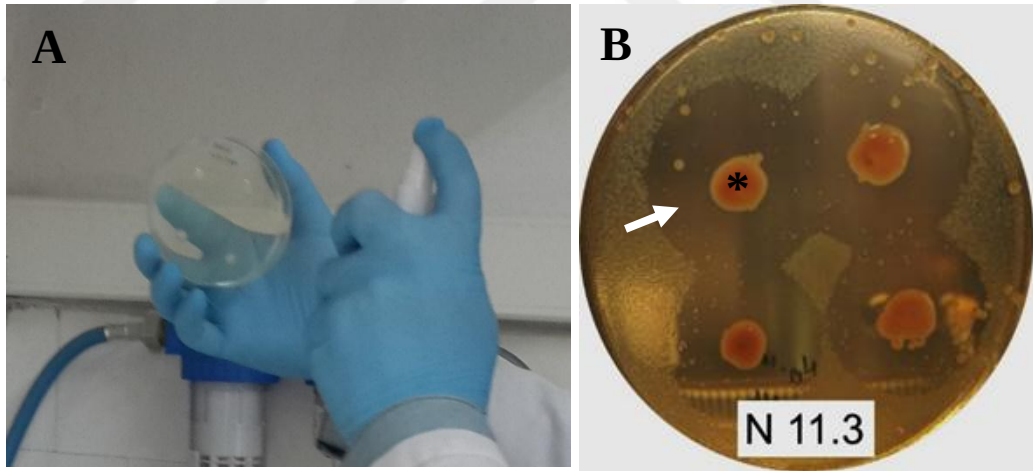
Farklı bölgelerden izole edilen ve kesin tür tanılaması yapılmış *Psp* izolatların virülenslik testi duyarlı Gina çeşiti meyveleri üzerinde Harper ve ark. (1987) tarafından bildirilen yöntemlere göre yapılmıştır. King B besiyerinde gelişmiş olan 2 günlük bakteri kültürlerindeki tek koloniden alınan *Psp* kültürü 10^8 cfu/mL konsantrasyonunda ayarlandıktan sonra (OD_{620} : 0.12) genç meyvelerin üzerine 0.5 cm. aralıklarla steril kürdan ile açılan yaralara pipet ile damlatılarak (40 μ L) inokule edilmiştir. Meyveler şeffaf plastikten yapılmış nem çemberlerine yerleştirilerek 25 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnokulasyondan 2-4 gün süre ile her bir izolatın genç meyvelerde oluşturmuş olduğu ıslaklık şeklinde ortaya çıkan belirtileri çapı ölçülmüş ve ortalamaları alınmıştır (Şekil 3.6). Elde edilen değerler birbiri ile karşılaştırılarak virülensliği en yüksek *Psp* izolatı belirlenmiş olup, bu izolat *in vitro* ve *in vivo* etkinlik çalışmalarında referans izolat olarak kullanılmıştır.



Şekil 3.6. Farklı bölgelerden izole edilen ve kesin tür tanılaması yapılmış *Psp* izolatların duyarlı Gina çeşiti fasulye meyveleri üzerinde virülenslik testi

3.2.9. Aday EB İzolatların *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*'ya Karşı *in vitro* Antagonistik Etkinliğinin Belirlenmesi

Virülenslik testlerinde en virulent olarak belirlenen *Psp* izolatına karşı endofit izolatların *in vitro* antagonistik etkinliği, ikili kültür testleri ile belirlenmiştir (Jetiyanon ve Kloepper, 2002). Petrilerde gelişmiş saf 2 günlük EB izolat kültürlerinden steril kürdan yardımıyla alınmış bakteri kütlesi, TSA besiyeri üzerine birbirine eşit uzaklıkta 4 farklı noktaya nokta şeklinde ekilmiş; 24 saat süre ile 26 °C de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda EB izolatların geliştiği petrilere 10^8 cfu/mL konsantrasyonunda *Psp* süspansiyonu (OD_{620} : 0.12) püskürtülmüş (Şekil 3.6) ve 48 saat süre ile 26 °C de tekrar inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda EB kolonisinin etrafındaki oluşan şeffaf engelleme zonun çapı ile EB kolonisinin çapı ölçülüp, değerlerin birbirine oranlanması ile antagonistik engelleme indeks (Ant-indeks) değerleri belirlenmiştir (El-Sayed ve ark., 2014). Her izolat 3 tekerrürlü olarak şekilde, bir petriye 4 farklı noktaya ekilmiş ve ölçümler sonucu o izolata ait indeks değerleri hesaplanmıştır (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. İkili kültür testinde TSA üzerinde gelişen aday EB izolatı (*) üzerine *Psp* süspansiyonunun püskürtülmesi (A) ve (B) EB izolatı tarafından oluşturulan engelleme zonu (ok)

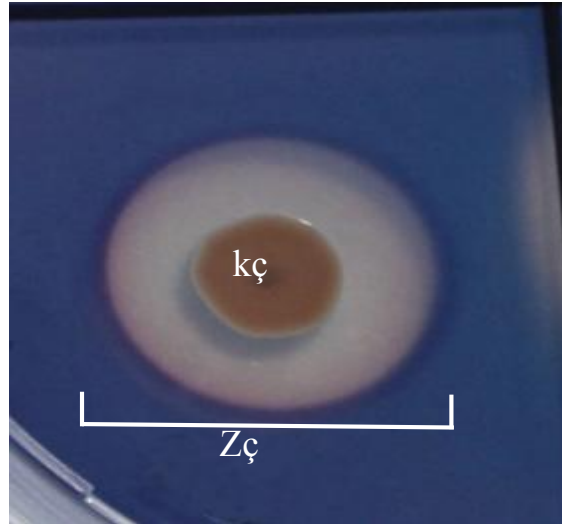
3.2.10. EB İzolatlarının Antagonistik ve Bitki Gelişimini Teşvik Etmede Kullandıkları Mekanizmalarının *in vitro* Koşullarda Belirlenmesi

Psp'ye karşı engelleme etkisi gösteren antagonist EB izolatların antagonistik ve bitki gelişimini düzenlemede rol oynayan (Plant Growth Promoting–PGP) mekanizmaları

(siderofor üretimi, proteaz enzim aktivitesi, amonyak üretim oranları, fosforu indirgeme potansiyelleri ve Indol Asetik Asit (IAA) üretim oranları) kullanıp kullanmadıkları *in vitro* koşullarda belirlenmiştir.

3.2.10.1. EB İzolatlarının Siderofor Üretme Potansiyellerinin Belirlenmesi

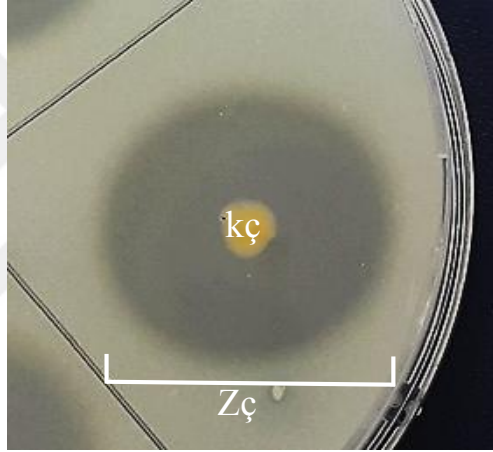
EB izolatlarının, hem bitki gelişimi, hem de biyokontrol aktivitesi için önemli bir belirleyici olan siderofor üretimi Blue CAS agar ortamında belirlenmiştir (Schwyn ve Neilands, 1987). Blue-CAS Agar ortamı petrilerde hazırlanarak her bir petri 4 bölmeye ayrılmış ve her petriye bir EB izolatları 4 tekerrürlü olarak nokta şeklinde ekilmiş ve 28 °C de inkubasyona bırakılmıştır. EB izolatlarının Blue-CAS Agar ortamında üretmiş olduğu siderofor zonlarının (Şekil 3.8) ölçümleri inokulasyondan 2 gün sonra yapılmıştır. Her bir EB izolatu için siderofor üretme indeksi (***S-indeks***), ortaya çıkan şeffaf engelleme çapı (zç) ile bakteri koloni çapının (kç) ölçülmesi (mm) ve birbirine oranlanması (***S-indeks***: zç/kç) ile belirlenmiştir (El-Sayed ve ark., 2014). Her izolat 3 tekerrürlü olarak şekilde, bir petriye 4 farklı noktaya ekilmiş ve ölçümler sonucu o izolata ait indeks değerleri hesaplanmıştır (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. EB izolatlarının Blue-CAS Agar besi ortamında siderofor oluşturma potansiyellerinin belirlenmesi. Siderofor indeks değeri zon çapının (Zç) bakteri koloni çapına (kç) oranlanmasıyla hesaplanmıştır.

3.2.10.2. EB İzolatlarının Proteaz Enzim Üretme Potansiyellerinin Belirlenmesi

EB izolatlarının proteaz enzimi üretme potansiyelleri %2 oranında Skim Milk içeren Laura Bertani Agar (SMLBA) ortamı üzerinde belirlenmiştir (Perneel ve ark., 2007). Bu amaçla izolatlar steril kürdan ile SMLBA besi yeri üzerine inokule edilerek 26°C sıcaklıkta 48 saat süre geliştirilmiştir (Şekil 3.9). Her bir endofit izolat için proteolitik aktivite indeksi (**Pro-indeks**), ortaya çıkan şeffaf engelleme çapı (zç) ile bakteri koloni çapının (kç) ölçülmesi (mm) ve birbirine oranlanması (**Pro-indeks**: zç/kç) ile belirlenmiştir (El-Sayed ve ark., 2014). Her izolat 3 tekerrürlü olarak şekilde, bir petriye 4 farklı noktaya ekilmiş ve ölçümler sonucu o izolata ait indeks değerleri hesaplanmıştır (Şekil 3.9).



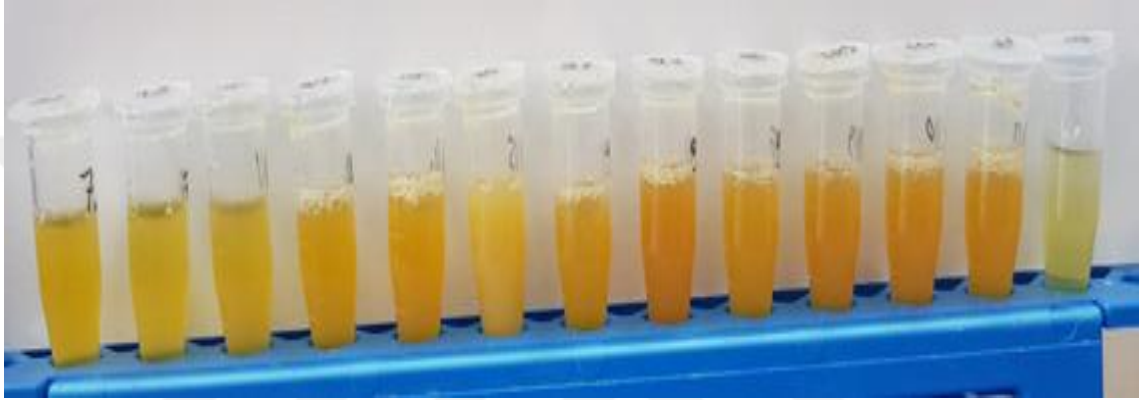
Şekil 3.9. EB izolatın SMLBA üzerinde proteaz üretme potansiyellerinin belirlenmesi. Proteaz indeks değeri zon çapının (Zç) bakteri koloni çapına (kç) oranlanmasıyla hesaplanmıştır.

3.2.10.3. EB İzolatlarının Amonyak (NH₃) Üretim Potansiyellerinin Belirlenmesi

Aday bakteri izolatlarının amonyak (NH₃) oluşturma potansiyelleri Nessler's Reagent çözeltisi ile belirlenmiştir (Cappuccino ve Sherman, 1992). Test edilecek olan bakteri izolatların 2 günlük taze kültüründen steril kürdan ile alınan bakteri inokulumu, içerisinde steril 10 ml peptonlu su (Pepton Water, Merck, Darmstadt, Germany) içeren cam tüplere inoküle edilmiştir. Bakteri ile bulaştırılmış tüpler 30 °C'de 120 rpm'e ayarlı inkübatörlü orbital çalkalayıcıda 2-3 gün inkübasyona bırakılmıştır. Sıvı besi yerinde gelişen bakteriler üzerlerine 500 µL Nessler's Reagent çözeltisi ilave edilmiştir. Besi yeri

içerisinde bakterilerce oluşturulan amonyak üretimi tüplerdeki besi yeri renginin açık sarıdan kahverengi-koyu sarı rene dönüşmesiyle belirginleşmiştir (Şekil 3.10).

Hazırlanan stok besiyerine belirli oranlarda (50, 100, 200, 300, 400, 500, 600 ppm) ilave edilen NH_3 ile standart eğri oluşturulmuş ve endofit izolatların ürettiği NH_3 miktarı 530 nm dalga boyunda spektrofotometre ile okutulduktan sonra $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bilinen değerlerin (mg/ml) standart eğriler ile karşılaştırılarak hesaplanmıştır. Her bir izolat için 3 farklı tüpde oluşan değerler kaydedilmiştir.

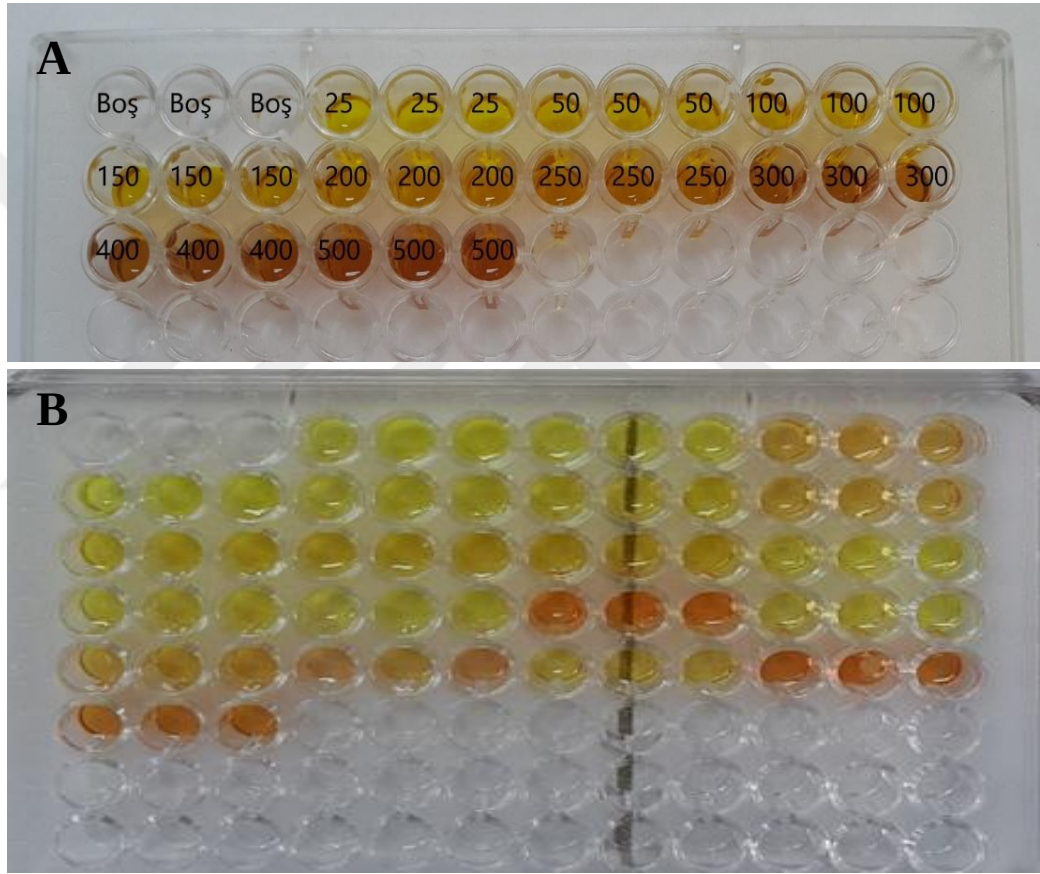


Şekil 3.10. EB izolatları tarafından farklı miktarlarda üretilen amonyak miktarına bağlı olarak ortaya çıkan renk değişimi

3.2.10.4. EB İzolatlarının Indol-3-Asetik Asit (IAA) Üretim Potansiyellerinin Belirlenmesi

EB izolatlarının IAA üretme aktivitesi %0.5 L-tryptophan (500 mg/mL) içeren Luria-Bertani (LB) broth ortamında gelişen süspansiyona Salkowski çözeltisi eklenmek suretiyle belirlenmiştir (Glickman ve Dessaux, 1995). İçerisinde steril 5 ml L-tryptophan içeren LB broth besi yeri bulunan cam tüplere 2 günlük taze kültürlerinden hazırlanan 10^8 cfu/mL konsantrasyondaki bakteri süspansiyondan 500 μL konulduktan sonra, tüpler 30°C 'de 200 rpm'e ayarlı inkübatörlü orbital çalkalayıcıda 2 gün inkübasyona bırakılmıştır. Sıvı besiyerinde gelişen tüplerden alınan 2 ml bakteri süspansiyonları steril eppendorf tüplere konulmuş ve $+4^\circ\text{C}$ 'de 5000 rpm'de 30 dak. santrifüj edilerek katı partiküller çöktürülmüştür. Bu tüplerin üst kısmından alınan 1 ml süpernatant daha sonra temiz cam tüplerinde bulunan 4 ml Salkowski çözeltisi (hazırlanışı: 150 ml %98'lik H_2SO_4 + 250 ml distile H_2O + 7.5 ml 0.5 M $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) üzerine eklenmiş ve 30°C 'de

karanlık ortamda 25 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Salkowski Ayıracının yardımı ile açık sarıdan kırmızı-pembe renge dönüşen solüsyonlarda bakteriler tarafından üretilen IAA değerleri 535 nm dalga boyuna ayarlı UV-vis spektrofotometre (Perkin Elmer, Lamda 25, USA) kullanılarak belirlenmiştir (Patten ve Glick, 2002). Elde edilen absorbans değerleri saf IAA (Merck, Darmstadt, Germany) ile hazırlanmış olan standart IAA spektrofotometre değerleri (Şekil 3.11) ile karşılaştırılarak endofit izolatlarının üretmiş oldukları gerçek IAA miktarları (ppm= $\mu\text{g/mL}$) düzeyinde) kantitatif olarak belirlenmiştir. Her izolat için 3 farklı tüpde gelişen miktar kaydedilmiştir.

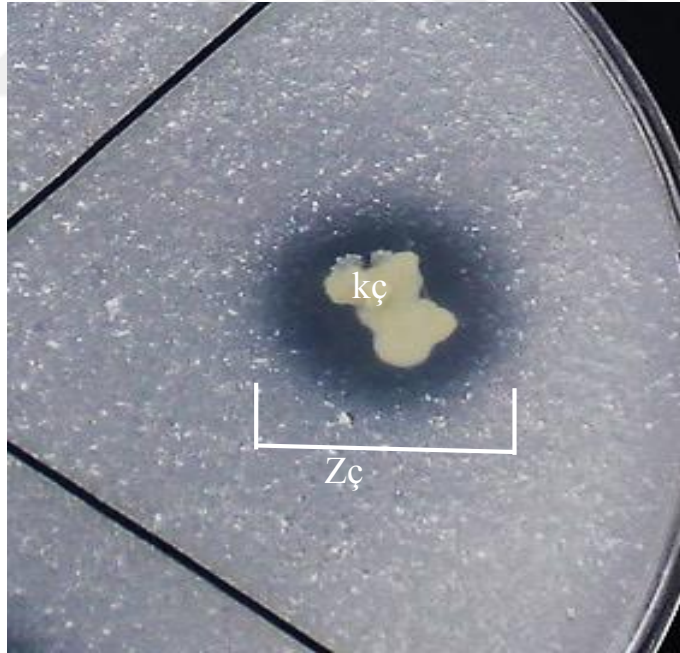


Şekil 3.11. EB izolatları tarafından üretilen IAA değerlerini belirlenmesinde baz alınan standart eğrinin hesaplanmasında kullanılan konsantrasyonların (25ppm, 50ppm, 100ppm, 150ppm, 200ppm, 250ppm, 300ppm, 400ppm ve 500ppm) (A) ve farklı EB izolatları tarafından farklı konsantrasyonda oluşturulan IAA'ın eliza plakasında görüntüsü

3.2.10.5. EB İzolatların İnorganik Fosforu (P) Çözme Potansiyellerinin Belirlenmesi

EB izolatlarının inorganik fosforu çözme potansiyelleri, *in-vitro* koşullarda 0.5%tri-calcium phosphate $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ içeren Pikovskaya Agar (PVK) besi ortamı kullanılarak belirlenmiştir (Kumar ve ark., 2012). Fosforu çözme potansiyeli araştırılan endofit bakterilerin 48 saatlik taze kültürleri NA besiyerlerinde geliştirilmiş ve steril kürdan yardımı ile alınan inokulum, PVK Agar besi ortamı üzerine nokta ekim ile inokule edilmiş ve petriler 30°C’de inkubasyona bırakılmıştır. İnokulasyondan 5-7 gün sonra inokulasyon noktasının etrafında oluşan belirgin şeffaf zon, aday endofit izolatın fosforu çözme potansiyeli açısından pozitif olarak kabul edilmiştir (Şekil 3.12).

Her bir aday EB izolat için fosforu çözme indeksi (*F-indeks*), ortaya çıkan şeffaf engelleme çapı (zç) ile bakteri koloni çapının (kç) ölçülmesi (mm) ve birbirine oranlanması (*F-indeks*: zç/kç) ile belirlenmiştir (El-Sayed ve ark. 2014). Her izolat 3 tekerrürlü olarak şekilde, bir petriye 4 farklı noktaya ekilmiş ve ölçümler sonucu o izolata ait indeks değerleri hesaplanmıştır (Şekil 3.12).



Şekil 3.12. Pikovskaya Agar (PVK) besi yeri üzerinde EB izolatın fosforu çözerek koloni etraflarında oluşturdukları şeffaf zon (Zç). Fosforu çözme indeks değeri zon çapının (Zç) bakteri koloni çapına (kç) oranlanmasıyla hesaplanmıştır.

3.2.11. EB İzolatlarının *in vivo* Koşullarda Hastalık Çıkışına ve Bitki Gelişimine Olan Etkilerinin Belirlenmesi

Psp'ya karşı *in vitro* antagonistik etkinliği ve biyokontrol mekanizmaları belirlenen aday antagonist EB izolatlarının hastalık çıkışını engelleme potansiyelleri ile bitki gelişimine etkilerinin araştırıldığı *in vivo* denemelerde, Gina çeşidi fasulye (*Phaseolus vulgaris* L) meyve ve tohumları kullanılmıştır. Gerek iş yükü gerekse analizlerin duyarlılığı açısından EB izolatları arasında *in vitro* antagonistik ve PGP etkinlik çalışmalarında en yüksek etkinlik gösteren farklı türlere ait izolatlardan seçimi yapılan EB izolatları *in vivo* denemelere dahil edilmiştir.

3.2.11.1. Koparılmış Meyve Testlemeleri ile EB İzolatlarının Hastalık Çıkışını Engelleme Potansiyellerinin Belirlenmesi (Yarı *in vivo*)

Endofit bakterilerin yarı *in vivo* koşullarda hastalık çıkışını engellemedeki etkinlikleri, daha önceki çalışmalarda hastalığa karşı duyarlı olarak bildirilmiş (Soylu ve ark., 2007). Yarı *in vivo* denemelerine başlamadan önce Gina çeşidi meyve temini için yerel üreticilerden destek alınmış ve meyveler (Mayıs ayı içerisinde) doğrudan üreticiden sağlanılmıştır. Bu doğrultuda koparılmış fasulye meyveleri kullanılarak EB izolatlarının *Psp* üzerindeki etkinliği iki farklı şekilde değerlendirilmiştir.

(i) Önce EB izolatlarının inokulasyonu, ardından *Psp* etmeninin meyveye bulaştırılması (endofitlerin koruyucu ve dayanıklılık mekanizmalarının uyarılması şeklindeki etkisi)

(ii) Önce *Psp* etmeninin meyveye bulaştırılması ve ardından EB izolatlarının meyveye inokulasyonu (endofitlerin hastalık gelişimini tedavi edici etkisi)

Karşılaştırma kontrol uygulamaları olarak; meyveler üzerinde steril kürdanlar ile aseptik olarak açılan deliklere (i) sadece EB izolatlarının inokule edilmesi ve (ii) steril distile su inokule edilmesi “**negatif kontrol**”; açılan deliklere (iii) sadece *Psp* etmeninin inokulasyonu ile “**pozitif kontrol**” olarak değerlendirilmiştir.

Meyve inokulasyonunda, NA ve KB besiyerlerinde gelişmiş 48 saatlik endofit ve *Psp* izolatlarının 50 mM MgCl₂ (pH:7.2) tampon çözeltisi içerisinde 10⁸ cfu/mL konsantrasyonunda hazırlanan süspansiyonlar (OD₆₀₀: 0.1) kullanılmıştır. Genç fasulye

meyveleri denemelere başlamadan 1 gün önce laboratuvara getirilmiştir. Genç meyveler inokulasyondan önce %70 etil alkol ile yüzey dezenfeksiyonu yapılmış, üzerlerinde 1'er cm aralıklarla steril kürdan ile yaralar açılmış ve yaraların içerisine pipet ile bakteri süspansiyonları ($\approx 50 \mu\text{L}$) inokule edilmiştir. Her bir meyveye 5 delik açılmış ve her bir endofit izolat için 2 adet meyve kullanılmıştır.

Meyveler şeffaf polietilen şalelere yerleştirilmiş ve etrafları polietilen torba ile sarılarak yüksek nem ortamı oluşturulmuş, 25 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnokulasyondan 2-7 gün süre boyunca her bir EB/*Psp* izolatın uygulandığı inokulasyon noktalarında ıslaklık veya kahverengileşme şeklinde ortaya çıkan hastalık/dayanıklılık/engelleme reaksiyonlarının çapları ölçülmüş ve ortalamaları alınmıştır. Elde edilen değerler negatif kontrol ile karşılaştırılarak *Psp* izolatına karşı etkinlikleri hesaplanmıştır.

3.2.11.2. EB İzolatlarının Fasulye Yaprakları Üzerinde Hastalık Çıkışı Engelleme Potansiyellerinin Belirlenmesi (*in vivo* Saksı Denemeleri)

Saksı denemeleri Bozkurt (2009) tarafından belirlenen yöntem modifiye edilerek gerçekleştirilmiştir. Bu doğrultuda Gina çeşiti fasulye tohumları kullanılarak EB izolatlarının *Psp* üzerindeki etkinliği dört farklı şekilde değerlendirilmiştir.

(i) EB izolatları ile kaplanmış tohumlardan gelişen bitkilerin yapraklarına *Psp* etmeninin pülverize edilmesi (endofitlerin “**koruyucu**” ve/veya “**dayanıklılığı uyarıcı**” etkisi)

(ii) EB izolatlarının tohuma kaplanması, ardından gelişen bitkilerin yapraklarına önce *Psp* etmeninin pülverize edilerek bulaştırılması ardından tekrar EB izolatlarının pülverize edilmesi (endofitlerin hastalık çıkışı önlemede “**koruyucu**” ve/veya “**dayanıklılığı uyarıcı**” etkisinin yanı sıra “**tedavi edici**” etkisi)

Yüzey dezenfeksiyonu yapılmış, hastalıklardan arı fasulye tohumları EB izolatları ile kaplama yapılmaksızın steril torf-toprak karışımı içeren saksılara ekildikten sonra buradan gelişen 3-4 haftalık bitkilerin 2-3 gerçek yapraklı dönemde yapraklarına;

(iii) Önce *Psp* etmeninin pülverize edilmesi, ardından EB izolatının pülverize edilmesi (EB izolatlarının hastalık gelişimini önlemede “**tedavi edici**” etkisi)

(iv) Yapraklara önce EB izolatının pülverize edilmesi, ardından *Psp* etmeninin

pülverize edilmesi (EB izolatlarının “**koruyucu**” ve/veya “**dayanıklılığı uyarıcı**” etkisi)  eklinde 4 farklı uygulama yapılmıştır.

Hastalıklardan ari fasulye tohumlarından çıkan bitkilerin yapraklarına (i) sadece EB izolatlarının pülverize edilmesi ile (ii) steril distile su inokule edilmesi “**negatif kontrol**”; (iii) sadece *Psp* etmeninin pülverize edilmesi ise “**pozitif kontrol**” olarak değerlendirilmiştir.

Süspansiyonların Hazırlanışı: Gerek tohum gerekse yapraklarında, NA ve KB besiyerlerinde geli mi  48 saatlik EB ve *Psp* izolatlarının 50 mM MgCl₂ (pH:7.2) tampon    zeltisi içerisinde 10⁸ cfu/mL konsantrasyonunda hazırlanan süspansiyonlar (OD₆₀₀: 0.1) kullanılmıştır.

Tohum kaplama işleminde hazırlanan bakteri süspansiyonları 5ml %0.05’lik Carboxy Methyl Cellulose (CMC) ile süspanse edilmesi ve bu süspansiyon içerisine fasulye tohumlarına aktarılıp (5 gr tohum / 5 mL CMC) 120 rpm’de 30 dk.  alkalanarak tohumların bakteri ile kaplanması şeklinde gerçekleştirilmiştir (Callan ve ark., 1997).

Patojen inokulasyonu, 2-3 gerçek yapraklı dönemde yapılmıştır. Patojen inokulasyonundan sonra (10⁸cfu/mL) bitkiler %60-70 oransal nem ve 27 2 C’de gelişmeye bırakılmıştır. Pozitif Kontrol uygulamasında hiçbir muamele görmemiş tohumlardan elde edilen bitkilere sadece patojen pülverize edilmiştir. Her uygulama 2 saksıda gerçekleştirilmiş ve her saksıya 5 tohum ekilmiştir. Oluşan hastalık belirtileri patojen inokulasyonundan 21 gün sonra 0-9 skalasına göre değerlendirilerek belirti çıkışında antagonist bakterilerin etkisi pozitif kontrol ve ilaçlı kontrolle kar ıla tırılarak değerlendirilmiştir. Saksı denemesi iki kez yinelenmi tir.

Skala değerleri

0= belirti yok (etkili)

1-3= teksel lekeler, maks. %2 enfeksiyon alanı (orta düzeyde etkili)

4-6= teksel ve birleşik lekeler, maks. %10 enfeksiyon alanı (düşük düzeyde etkili)

7-9= %20 ve üzeri enfeksiyon alanı ve birleşik lekeler (etkisiz)

3.2.11.3. EB İzolatlarının Bitki Gelişimine Olan Etkilerinin Belirlenmesi

EB izolatlarının tohumların çimlenmesi, bitki çıkışı ve gelişimi üzerine etkisinin araştırıldığı denemelerde, sağlıklı fasulye tohumları (cv. Gina) inokulasyon öncesinden %1'lik sodyum hipoklorit içerisinde 5 dakika bekletilmek suretiyle yüzey sterilizasyonu yapılmış ve tohumlar 3 kez steril su ile yıkanmış ve kurutma kağıtları üzerinde iyice kurutulmuştur.

Bitki gelişimine etkisi araştırılan olan EB izolatların 48 saatlik taze kültüründen, %0.05'lik yapıştırıcı bileşik Carboxymethyl Cellulose (CMC) içeren 50 mM MgCl₂ tampon solüsyonunda içerisinde 10⁸ hücre/ml yoğunluğunda süspansiyonları ayarlanmış, daha sonra yüzey sterilizasyonu yapılmış ve kurutulmuş olan fasulye tohumları hazırlanan bakteri süspansiyonu içerisinde yaklaşık 2 saat 150 rpm'de çalkalanmıştır. Çalkalamanın ardından, bakterizasyonu yapılan kaplı tohumlar steril kabin içerisinde bir gün bekletilerek kuruması sağlanmıştır. Her bir izolat için 10 bitki kullanılmış ve her deneme 2 tekerrürlü gerçekleştirilmiştir.

Kaplanan tohumlar steril torf bulunan viyollere ekilmiştir. Bitkiler 28°C'de %70 bağıl nem ve 16:8 saat fotoperiyoda sahip iklim odalarına yerleştirilmiştir. Çimlenme gerçekleşikten sonra bitkiler günlük olarak kontrol edilmiş, uygulama yapılmış tohumlar çimlenme ve bitki gelişimi açısından incelenmiştir. Bitkilerin gelişmeleri gözlemlenmiş ve 28 gün sonunda genel değerlendirme yapılmıştır.

Bakteri izolatlarının bitki gelişimi üzerine olan etkinliklerinin değerlendirilmesinde toplam bitki boyu, kök uzunluğu, gövde uzunluğu ve yaş bitki ağırlığı ölçümleri yapılmak sureti ile gerçekleştirilmiştir. Denemelerde, içerisinde %0.05'lik Carboxymethyl Cellulose (CMC) içeren 50 mM MgCl₂ solüsyon uygulaması yapılan tohumlardan gelişen fideler "**negatif kontrol**" olarak kullanılmıştır. EB izolatları ile muamele edilen fidelerin gelişimi negatif kontrol fideleri ile kıyaslamak suretiyle uygulamaların etkinliği belirlenmiştir.

3.2.12. Deneme Deseni ve İstatistiki Analizler

Tüm *in vitro* ve *in vivo* denemeler “tesadüf parselleri deneme deseni”ne göre kurulmuştur. Endofit bakteri izolatların *Psp* gelişimini engellene oranları ile antagonist ve bitki gelişimini teşvik eden mekanizmalardaki etkinlik değerleri her izolat için 3 farklı petride yapılmış, deneme 2 farklı zamanda tekrar edilmiştir. Elde edilen değerler (indeks, ppm, yarıçap gibi ölçüm değerleri), %oranları hesaplanmadan SPSS istatistik programı (SPSS Statistics 17.0) kullanılarak tek yönlü ANOVA ile varyans analizine tabi tutulmuş, izolatlar arasındaki istatistiksel farklılık Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi ile tespit edilmiştir ($P \leq 0.05$).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Sörvey Çalışmaları

Çalışmanın amacına yönelik olarak gerek hastalık etmeninin izolasyonu, gerekse EB izolatların elde edilmesi amacıyla Ankara, Eskişehir, Burdur, Konya ve Niğde illerinde fasulye üretiminin yoğun olarak yapıldığı tüm ilçelerinde 2015 ve 2016 yetiştirme sezonlarında Sörveyler yapılmıştır. Sörveylerde hastalık belirtileri görülen tarlalardan gerek hastalıklı bitki gerekse bu bitkilere komşu sağlıklı bitkilerin bulunduğu tarlalardan sağlıklı ve hastalıklı fasulye örnekleri alınmıştır (Şekil 3.1). Gezilen iller, üretim bilgileri ve toplanan örnekler ile ilgili bilgiler Çizelge 3.1.'de verilmiştir.

Sörveylerde hastalığın yaygın olduğu üretim alanlarındaki sulama ve bakım işlemlerinin de hastalığın yayılmasında büyük etki gösterdiği tespit edilmiştir. 2016 yılında ziyaret edilen alanların büyük bir çoğunluğunun yağmurlama sulama sistemi ile (Şekil 4.1) sulanması nedeniyle hastalığın çok geniş alanlarda ve şiddetli bir şekilde yayıldığı tespit edilmiştir. Üretici, Tarım İl ve İlçe Müdürlükleri ile yerinde yapılan görüşmeler de yağmurlama sulamanın hastalık çıkışı ve yayılışı üzerine olan olumsuzluklar bildirilmiş olup, buna mukabil olarak bu bölgelerdeki üreticilerin bir kısmının yağmurlama sulama sistemini bırakarak damla sulama sistemine geçtiğini, değişiklik sonucunda 2016 yetiştirme sezonunda aynı bölgelere yapılan Sörveylerde bu üretim alanlarında görülen hastalık şiddetinin düştüğü, hastalık etmeninin üretim alanında oldukça düşük seviyede (küçük bitki öbekçikleri şeklinde) ortaya çıktığı tespit edilmiştir.

Örneklemeler esnasında, üreticilerin hastalığın varlığını ve kaynağını bilmemesi sonucu hastalıkla yapılması gereken mücadeleyi yapmadığı veya geç kalarak hastalığın çok ileri dönemlerinde (meyve enfeksiyonu) farkına vardığı gözlenmiştir. Sörvey yapılan bölgelerde çiftçilerin genelde çıkış sonrası kök çürüklüğü hastalıklarına karşı 1 kez fungusit uygulamasını yaptıktan sonra genelde zararlılara yönelik insektisit uygulamaları yaptıkları, genelde kuru tüketime yönelik olmaları nedeniyle özellikle Niğde ve Konya illerinde meyveler hastalık belirtileri yönünden incelenmediğinden hastalığın kolayca bitki üzerinde çoğaldığı ve tohuma kadar bulaştığı, gözlenmiştir.

Hastalığın yoğun olduğu Niğde ve Konya illerinde, çiftçilerin hasat yaptıktan sonra kendi tarlalarından ayırdığı tohumlukları bir sonraki yıl kullandıkları gözlenmiştir. Bu

nedenden dolayı bölgelerde enfekteli bulaşık tohumların ekiminin yanısıra, yağmurlama sulamanında tercih edilmesi hastalığın bu illerde yaygın olmasının en önemli sebebi olarak düşünülmektedir. Bu konuda gerek üreticiler yerinde bilgilendirilerek gerekse de Tarım İl ve İlçe Müdürlüklerinde çalışan teknik personel eğitilerek konunun öneminin farkedilmesi ve üretim esnasında zamanında hastalık kontrollerinin yapılması ile doğru zamanda mücadelenin yapılması konusunda büyük ilerlerleme sağlanmıştır.



Şekil 4.1. Hastalık etmeni *Psp* ve EB izolasyonu için örneklemelerin yapıldığı yağmurlama sistemi (ok) ile sulanan fasulye tarlasının genel durumu.

Örnekleme esnasında en çok örnek alınan il gerek hastalık belirtilerinin en yoğun görüldüğü, gerekse de hastalıklı ve sağlıklı bitkilerin daha çok iç içe olması nedeni ile Niğde olmuştur. Niğde ilini Konya ve Eskişehir illeri takip etmiştir. Alınan örneklerin %33'ü Niğde ilinden, %25'i ise Konya ilinden toplanmıştır. Toplanan örnekler arasında endofit bakteriyel popülasyonların en zengini ise Konya ve Eskişehir illerinden alınan örnekler olmuştur. Konya ve Eskişehir illerinden toplanan örneklerden izole edilen endofit özellikteki bakterilerin sayısı tüm izolat sayısının yarısına eşittir. Endofit bakteri popülasyonu olarak en fakir il ise alınan 5 örnekten toplamda 15 endofi bakteri izole edilmesi ile Ankara ili olmuştur.

Örnekleme yapılan toplam 110 farklı alandan hastalıklı ve sağlıklı bitkiler toplanırken hastalıklı bitkilerin hemen yanındaki sağlıklı bitkileri ve hastalıklı bitkilerin yoğun olarak bulunduğu üretim alanlarına komşu olan sağlıklı bitkilerin bulunduğu üretim alanlarına öncelik verilmiştir. Bu sayede hastalık etmeninin yoğun bir şekilde görüldüğü alanlarda sağlıklı olan veya hastalık belirtilerini göstermeyen bitkilerde uyarıcı etki gösteren antagonist bakterilerin elde edilme şansı artırılmıştır.

4.2. Aday EB İzolatların İzolasyonu

Laboratuvara getirilen sağlıklı, hastalık belirtisi göstermeyen fasulye bitkilerinin kök-kök boğazı-gövde, yaprak ve meyve gibi farklı aksamlarından toplamda 343 farklı aday EB izolatı elde edilmiştir. Bu bakterilerin izole edildiği bitkinin alındığı yer ve bitki aksamına göre, elde edilen toplam izolat sayılarına ilişkin veriler, Çizelge 4.1’de; verilmiştir.

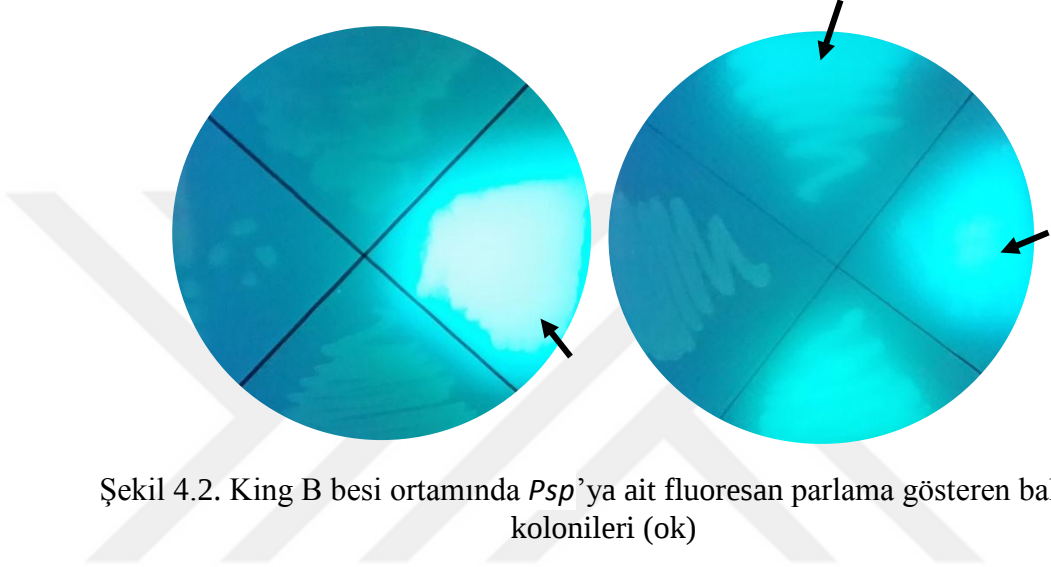
Çizelge 4.1. Aday EB izolasyonu için alınan örnek sayısı, EB’nin izole edildiği bitkinin alındığı yer ve izole edildiği bitki aksamına göre elde edilen toplam EB izolat sayısı

Örnek Alınan Şehir	Örnek Sayısı	Kök, Kökboğazı ve Gövde	Meyve	Yaprak	Toplam
Niğde	37	34	63	10	107
Konya	28	21	36	17	74
Eskişehir	22	29	46	21	96
Burdur	18	11	31	9	51
Ankara	5	6	5	4	15
TOPLAM	110	101	181	61	343

Çalışmalar sonucunda elde edilen tüm izolatlar kodlanmış, bitkilerin alındığı üretim alanları ve EB izolatlarının elde edildiği bitki aksamı da kayıt altına alınmıştır.

4.3. Fasulye Hale Yanıklığı Etmeni *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*'nın İzolasyonu

Ankara, Eskişehir, Burdur, Konya ve Niğde illerinde üretim alanından toplanan hastalık belirtisi gösteren bitkilerden yapılan izolasyonlar sonucunda, King's B besi ortamı üzerinde floresan ışıltama yapan koloniler saflaştırılmış ve bu koloniler ile çalışmalara devam edilmiştir. (Şekil 4.2).

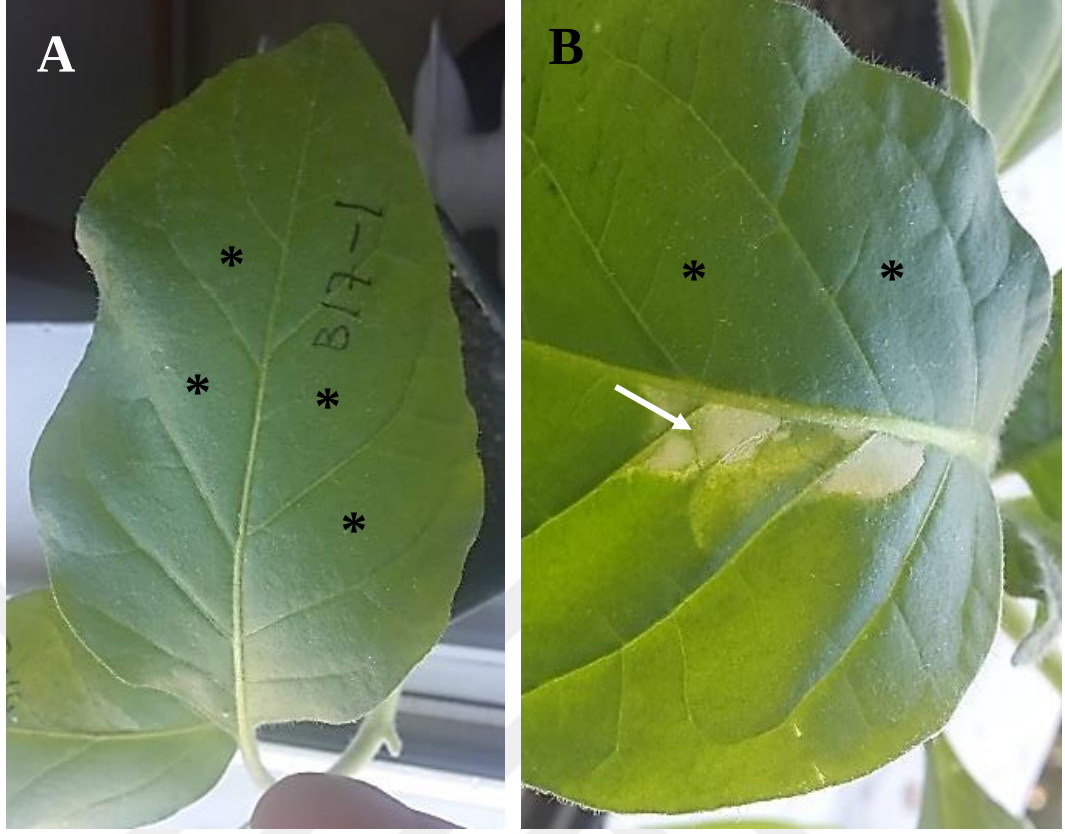


Şekil 4.2. King B besi ortamında *Psp*'ya ait floresan parlama gösteren bakteri kolonileri (ok)

4.4. Aday EB İzolatlarının Seçimine Yönelik Ön Testler

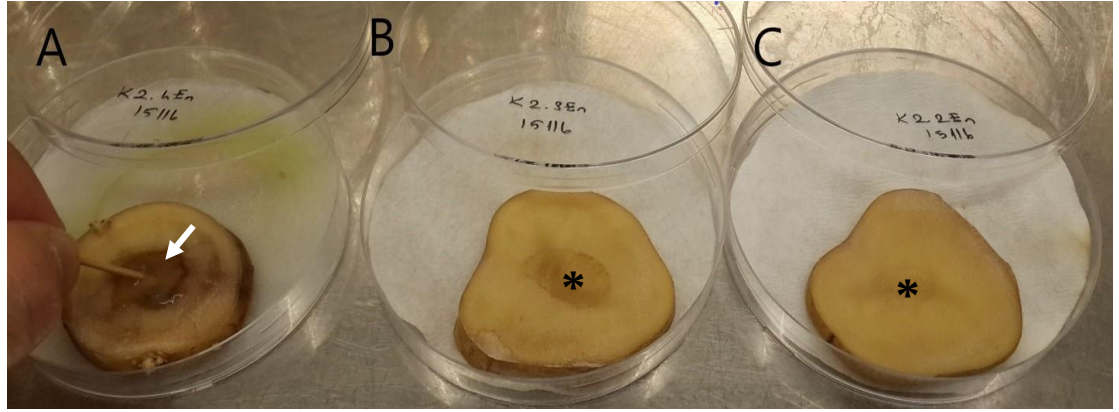
+37 °C de Gelişme Gösterme Testi: İzole edilen EB izolatların +37 °C de inkube edilmiş ve 343 EB izolatından 52 tanesi +37 °C'de gelişme göstermiş, 291 tanesi ise gelişme göstermemiştir. Bu sebeple pozitif sonuç veren 52 izolat çalışmalardan çıkartılarak geriye kalan 291 izolatla ileti testlere devam edilmiştir.

Tütün Bitkisinde Aşırı Duyarlılık (Hipersensitif Reaksiyon) Testi: +37 °C'de gelişme göstermemiş olan 291 EB izolatları ile virulent bitki patojeni bakteri izolatı (*Psp59* izolatı) tütün bitkisinin yaprağında aşırı duyarlılık testine tabi tutulmuş, bitki yaprağına enjekte edilmesinden 24 saat sonra, pozitif kontrol hariç 291 endofit izolatın 87 tanesi enjekte edilen alanlarda tipik HR belirtisi oluşturmuştur (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. EB izolatlarının tütün bitkisinde aşırı duyarlılık (HR) testi. (A), İnokulasyon noktalarında (*) HR negatif reaksiyon gösteren EB izolatları. (B), HR pozitif reaksiyon gösteren bitki patojeni ve EB izolatları ile inokulasyonu sonucu meydana gelen nekrotik belirtiler (ok)

Patates Pektolitik (Yumuşak Çürüklük) Aktivite Testi: +37 °C’de gelişme göstermemiş olan 291 EB izolatları ile virü lent bitki patojeni bakteri izolatı (*Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum*) patates dilimleri üzerine inokule edilmesi ve inokule edilen patates dilimlerinin 27 °C sıcaklıkta 24-48 saat inkubasyona bırakılması sonrası patates dilimlerinde inokulasyon noktasında yumuşama ve yumuşak bir çürüklük yönünden incelenmiştir. Test edilen 291 EB izolat arasında 50 izolat patates dilimlerinde yumuşak çürüklük oluşturmuştur (Şekil 4.4).



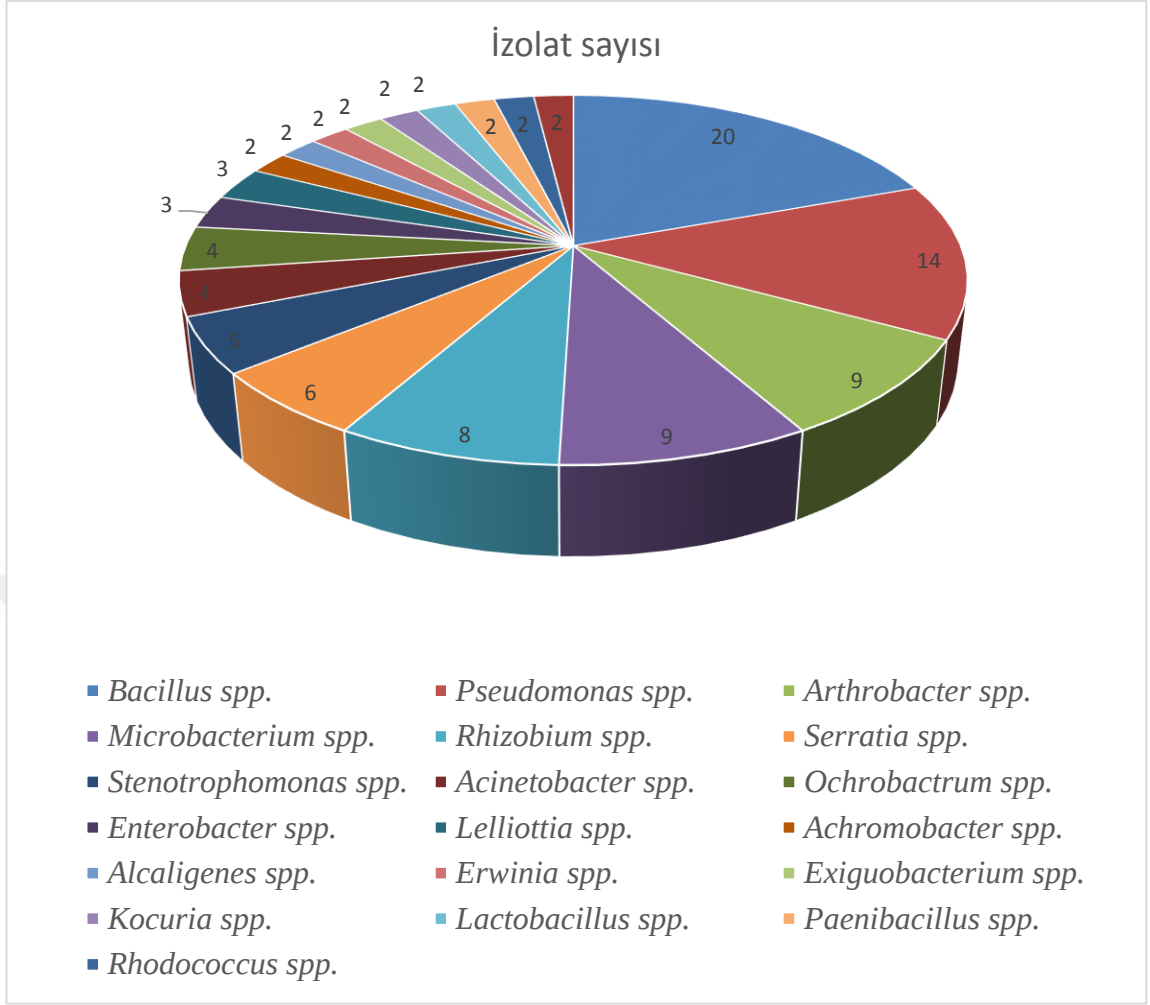
Şekil 4.4. Patates dilimlerinde pektolitik aktivite (yumuşak çürüklük) testi. (A) *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* tarafından oluşturulan yumuşak çürüklük belirtisi (ok). Düşük pektolitik aktivite gösteren (B) veya pektolitik aktivite gösteremeyen (C) EB izolatları (*)

Fasulye Meyvelerinde Patojenite Testi: +37 °C’de gelişme göstermemiş olan 291 EB izolatları ile virulent bitki patojeni bakteri izolatı (*Psp12* izolatı) fasulye meyvesi (cv Gina) üzerinde patojenite testine tabi turulmuştur. Test edilen 291 endofit bakteri izolatı arasında 23 endofit izolatın inokule edildikleri fasulye meyveleri üzerinde inokulasyondan 24-48 saat sonra tipik ıslaklık belirtisine neden olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.4). Bu izolatlar daha farklı çalışmalarda kullanılmak üzere çalışmalardan çıkartılmıştır.

4.4.1. Aday EB İzolatların Tanılanması

Aday EB izolatların belirlenmesi çalışmalarından Sörveyler sonucunda elde edilen 343 aday izolattan, insan (+37 °C gelişmeyen) ve bitki patojeni (tütün HR, patates pektolitik aktivite ve fasulye meyvelerinde patojenite testlerinde negatif sonuç veren) olmayan 131 adet aday EB izolatı, izole edildikleri konukçu, bitki kısmı, morfolojik ve bazı biyokimyasal özelliklerine göre [koloni rengi, King B besi ortamında fluoresan/nonfluoresan özelliği, koloni gelişimi (normal/mukoid), gram (+/-) yönlerinden] değerlendirilmiştir.

İzole edilen 131 adet endofit bakteri izolatı *in vitro* ve *in vivo* testler öncesi MALDI-TOF MS ile tanılanmış olup, bu izolatlardan 103 izolat MALDI-TOF analizleri sonucu “tür veya cins düzeyinde güvenilir” olarak tanılanmıştır (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Farklı bölgelerden elde edilen ve MALDI-TOF ile tanımlanmış aday EB izolatların cins düzeyinde dağılımları

Elde edilen bakterilerin cins düzeyinde dağılımına bakıldığında, 20 izolat ile *Bacillus* en fazla izole edilmiş olan cins olarak karşımıza çıkmaktadır. Bunu sırasıyla 14 izolat ile *Pseudomonas*, 9'ar izolat ile *Arthrobacter* ve *Microbacterium*, 8 izolat ile *Rhizobium*, 6 izolat ile *Serratia*, 5 izolat ile *Stenotrophomonas*, 4'er izolat ile *Acinetobacter* ve *Ochrobactrum*, 3'er izolat ile *Enterobacter* ve *Lelliottia*, 2'şer izolat ile *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Erwinia*, *Exiguobacterium*, *Kocuria*, *Lactobacillus*, *Paenibacillus* ve *Rhodococcus*, 1'er izolat ile de *Agromyces*, *Aromatoleum*, *Burkholderia*, *Curtobacterium*, *Micrococcus*, *Myroides*, *Sphingobacterium*, *Staphylococcus* ve *Streptomyces* cinsleri takip etmiştir (Şekil 4.5).

Bitkilerin kök, gövde, yaprak, çiçek ve meyve gibi birçok farklı organları üzerinde veya içinde yaşayan *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*,

Burkholderia, *Chelatobacter*, *Chromobacterium*, *Chryseomonas*, *Comamonas*, *Corynebacterium*, *Curtobacterium*, *Delftia*, *Derxia*, *Devosia*, *Erwinia*, *Exiguobacterium*, *Enterobacter*, *Flavimonas*, *Flavobacterium*, *Flexibacter*, *Frankia*, *Halomonas*, *Herbaspirillum*, *Kocuria*, *Lactobacillus*, *Lelliottia*, *Matsuebacter*, *Mesorhizobium*, *Methylobacterium*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Moraxella*, *Nevskia*, *Nocardia*, *Ochrobactrum*, *Pantoea*, *Paenibacillus*, *Pectobacterium*, *Phenylbacterium*, *Phyllobacterium*, *Photobacterium*, *Porphyrobacter*, *Pseudoalteromonas*, *Pseudomonas*, *Psychrobacter*, *Ralstonia*, *Renibacterium*, *Rhizobacter*, *Rhizobium*, *Rhizomonas*, *Rhodanobacter*, *Rhodococcus*, *Serratia*, *Shewanella*, *Sinorhizobium*, *Sphingobacterium*, *Sphingomonas*, *Spirillum*, *Stenotrophomonas*, *Streptomyces*, *Thauera*, *Variovorax*, *Vibrio*, *Xanthomonas*, *Xylella*, *Zoogloea*, *Zymobacter* ve *Zymomonas* gibi farklı bakteri cinslerine dahil bir çok bakteri türlerinin predominant endofit/epifit türler olduğunu bildirmiştir (Kobayashi ve Palumbo 2000; Lodewyckx ve ark., 2002). İzole edilip tanılanmış olan bu türlere ait bakteri izolatların gerek izole edildikleri bitkilerde gerekse farklı konukçularda bitki gelişimi, biyolojik mücadelede kullanılma potansiyelleri ile etki mekanizmaları farklı hastalık etmenine karşı araştırılmıştır (Sun ve ark., 2010; Romero ve ark., 2014).

Elde edilen tanı sonuçları değerlendirilerek MALDI-TOF indeks değeri 1.9'un altında olan izolatlar daha sonraki çalışmalarda değerlendirilmek üzere ayrılmış, "**tür düzeyinde teşhisleri güvenilir**" olarak belirlenen **56 izolat** çalışmalarda kullanılmak üzere seçilmiştir (Çizelge 4.2).

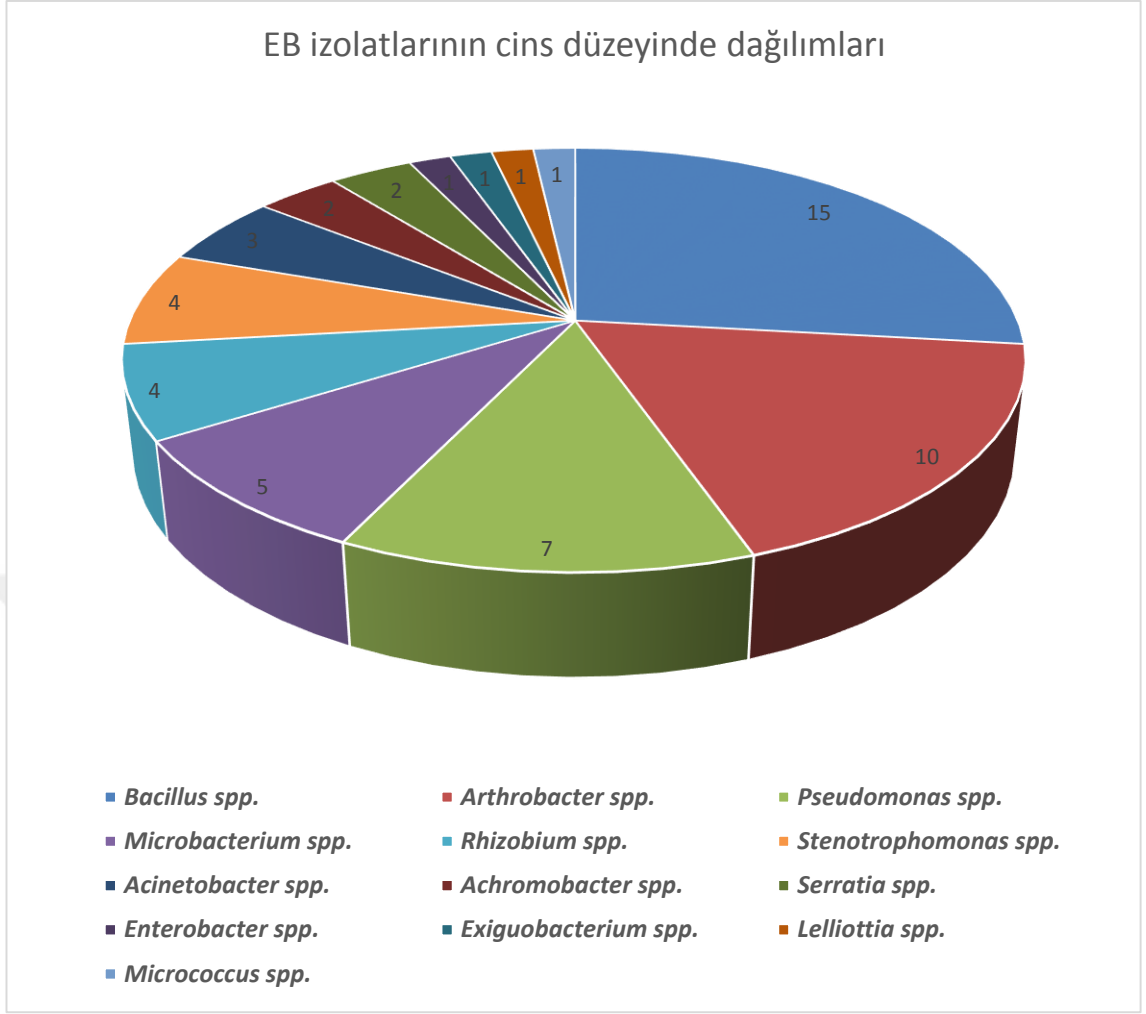
Yüksek indeks değerinde tanınması yapılan 56 endofit bakteri izolattan, 1 izolat Ankara'dan, 6 izolat Burdur'dan, 15 izolat Eskişehir'den, 10 izolat Konya'dan, geri kalan 24 izolat ise Niğde ilinde yetişen sağlıklı bitkilerden elde edilmiştir. Tanınması yapılan ve seçilen 56 izolattan 32 tanesi gram pozitif, 24 tanesi ise gram negatif bakteri özellik göstermiştir. Farklı *Pseudomonas* türlerine ait 7 izolatın tamamı floresans özellik göstermiştir.

Çizelge 4.2. Farklı illerden elde edilen aday EB izolatların MALDI-TOF tanı sonuçları

İzolat Adı	İzole Edildiği İl	MALDI-TOF İndeksi	FL (+/-)	Gram (+/-)
<i>Bacillus altitudinis</i> A5.3	Ankara	2.2	-	+
<i>Achromobacter spanius</i> B1.1	Burdur	2.1	-	-
<i>Stenotrophomonas</i> sp B3.7	Burdur	2.1	-	-
<i>Stenotrophomonas</i> sp B6.6	Burdur	2.2	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i> B9.1	Burdur	2.4	-	-
<i>Arthrobacter nicotinovorans</i> B11.2	Burdur	2.4	-	+
<i>Serratia plymuthica</i> B13.1	Burdur	2.1	-	-
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> E1.4	Eskişehir	2.2	-	-
<i>Bacillus simplex</i> E2.7	Eskişehir	2.3	-	+
<i>Lelliottia amnigena</i> E6.1	Eskişehir	2.6	-	-
<i>Pseudomonas brenneri</i> E6.5	Eskişehir	2.3	+	-
<i>Pseudomonas brenneri</i> E9.6	Eskişehir	2.3	+	-
<i>Stenotrophomonas</i> sp E13.1	Eskişehir	2.0	-	-
<i>Rhizobium radiobacter</i> E13.5	Eskişehir	2.4	-	-
<i>Bacillus altitudinis</i> E15.5	Eskişehir	2.2	-	+
<i>Arthrobacter gandavensis</i> E16.1	Eskişehir	2.5	-	+
<i>Arthrobacter gandavensis</i> E16.2	Eskişehir	2.2	-	+
<i>Acinetobacter johnsonii</i> E17.2	Eskişehir	2.3	-	-
<i>Bacillus megaterium</i> E19.7	Eskişehir	2.3	-	+
<i>Arthrobacter aureescens</i> E20.1	Eskişehir	2.4	-	+
<i>Bacillus simplex</i> E20.6	Eskişehir	2.1	-	+
<i>Rhizobium radiobacter</i> E22.5	Eskişehir	2.4	-	-
<i>Bacillus licheniformis</i> K1.1	Konya	2.3	-	+
<i>Bacillus simplex</i> K8.2	Konya	2.2	-	+
<i>Pseudomonas extremorientalis</i> K13.2	Konya	2.1	+	-
<i>Pseudomonas putida</i> K15.1	Konya	1.9	+	-
<i>Microbacterium maritopicum</i> K15.2	Konya	1.8	-	+
<i>Microbacterium hydrocarbonoxydans</i> K18.1	Konya	2.2	-	+
<i>Stenotrophomonas</i> sp K19.3	Konya	2.0	-	-
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> K20.1	Konya	1.9	-	-
<i>Microbacterium phyllosphaerae</i> K21.1	Konya	2.0	-	+
<i>Rhizobium radiobacter</i> K25.1	Konya	2.3	-	-
<i>Bacillus licheniformis</i> N1.1	Niğde	2.0	-	+
<i>Achromobacter spanius</i> N1.2	Niğde	2.0	-	-
<i>Arthrobacter nicotinovorans</i> N3.1	Niğde	2.2	-	+

Çizelge 4.2. (Devam) Farklı illerden elde edilen EB izolatların MALDI-TOF tanı sonuçları

İzolat Adı	İzole Edildiği İl	MALDI-TOF İndeksi	FL (+/-)	Gram (+/-)
<i>Microbacterium phyllosphaerae</i> N3.2	Niğde	2.0	-	+
<i>Bacillus cereus</i> N7.1	Niğde	2.3	-	+
<i>Arthrobacter ilicis</i> N11.3	Niğde	2.0	-	+
<i>Arthrobacter oxydans</i> N13.11	Niğde	2.1	-	+
<i>Rhizobium radiobacter</i> N15.1	Niğde	2.3	-	-
<i>Pseudomonas brassicacearum</i> N16.1	Niğde	2.1	+	-
<i>Exiguobacterium</i> sp. N16.2	Niğde	2.1	-	+
<i>Bacillus cereus</i> N17.1	Niğde	1.9	-	+
<i>Bacillus endophyticus</i> N17.2	Niğde	2.0	-	+
<i>Arthrobacter gandavensis</i> N19.1	Niğde	2.5	-	+
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> N21.5	Niğde	2.3	-	+
<i>Pseudomonas rhodesiae</i> N24.3	Niğde	2.1	+	-
<i>Arthrobacter histidinolovorans</i> N25.2	Niğde	2.2	-	+
<i>Arthrobacter woluwensis</i> N26.1	Niğde	2.4	-	+
<i>Bacillus pumilus</i> N26.2	Niğde	2.3	-	+
<i>Microbacterium maritopicum</i> N28.3	Niğde	2.1	-	+
<i>Bacillus siralis</i> N29.2	Niğde	2.0	-	+
<i>Micrococcus luteus</i> N31.3	Niğde	2.4	-	+
<i>Serratia liquefaciens</i> N34.1	Niğde	2.2	-	-
<i>Pseudomonas gessardii</i> N35.1	Niğde	1.9	+	-
<i>Bacillus thuringiensis</i> N36.1	Niğde	2.0	-	+



Şekil 4.6. Farklı bölgelerden elde edilen ve MALDI-TOF ile tanılanması yapılmış aday EB izolatların cins düzeyinde dağılımları

Elde edilen bakterilerin cins düzeyinde dağılımına bakıldığında, 15 izolat ile *Bacillus spp.* en fazla izole edilmiş cins olarak karşımıza çıkmaktadır. Bunu sırasıyla 10 izolat ile *Arthrobacter* cinsi, 7 izolat ile *Pseudomonas* cinsi, 5 izolat ile *Microbacterium* cinsi, 4'er izolat ile *Rhizobium* ve *Stenotrophomonas* cinsleri, 3 izolat ile *Acinetobacter* cinsi, 2'er izolat ile *Achromobacter* ve *Serratia* cinsleri, 1'er izolat ile *Enterobacter*, *Lelliottia*, *Micrococcus* ve *Exiguobacterium* cinsleri takip etmişlerdir (Şekil 4.6).

4.5. Fasulye Hale Yanıklığı Hastalığı Etmeni *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*'nın Tanınması

Endofit bakteri izolatlarının *in vitro* ve *in vivo* koşullarda etkinliği araştırılan *Psp* izolatının belirlenmesi amacıyla sörvey yapılan alanlardan hastalıklı bitki örnekleri toplanarak *Psp* etmeninin izolasyonu ve tanınması yapılmıştır. Ankara, Burdur, Eskişehir, Konya ve Niğde illerinde yapılan Sörvey çalışmaları sonucunda 110 farklı üretim alanından şüpheli “fasulye Hale Yanıklığı” hastalık belirtisi gösteren bitkilerden 40 adet *Psp* izolatı elde edilmiştir (Çizelge 4.3).

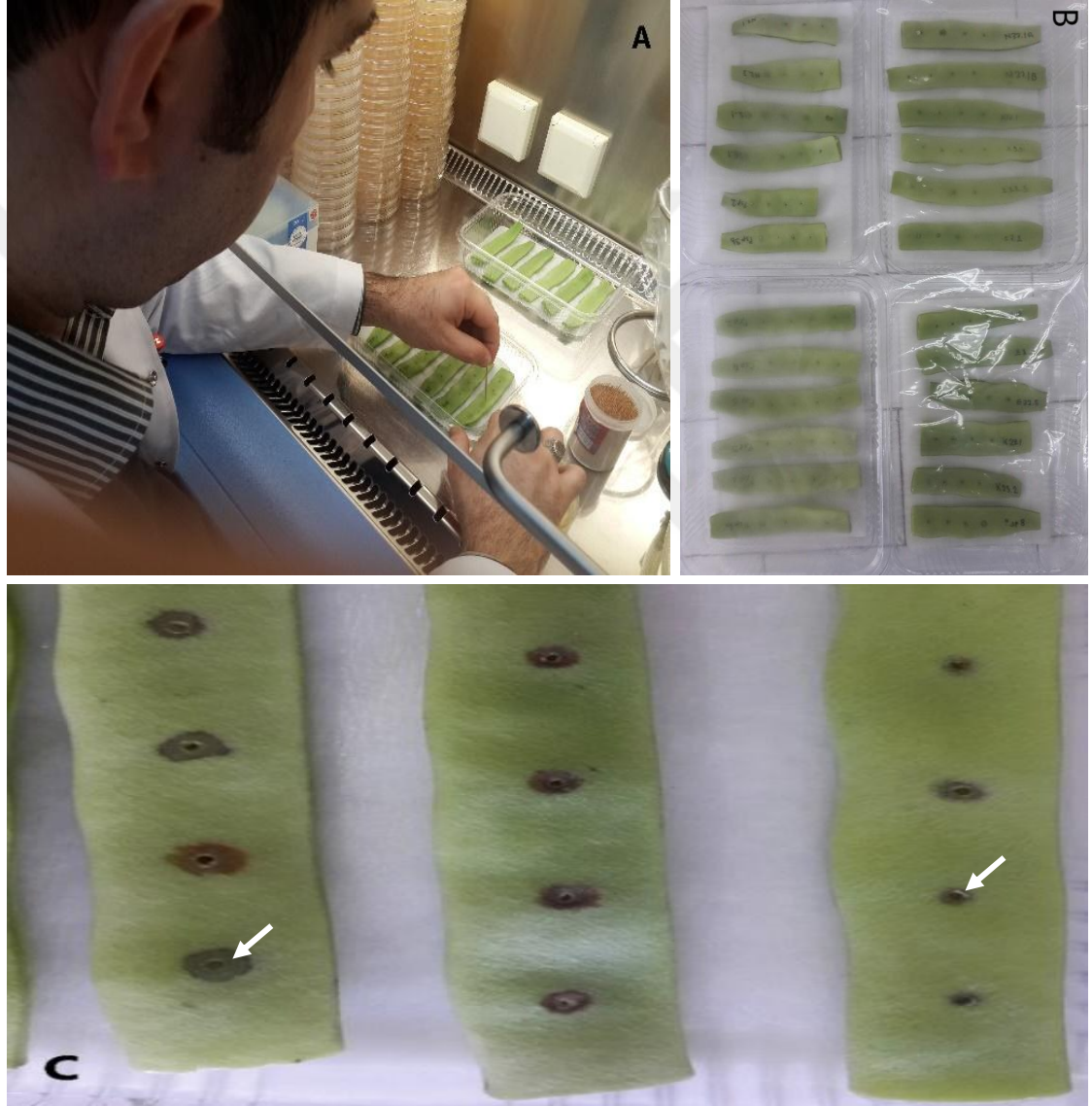


Şekil 4.7. Hastalık belirtisi gösteren yaprak ve meyvelerden hastalık etmeni *Psp*'nin izolasyonu

Çizelge 4.3. Fasulye üretim alanlarına yapılan Sörveylerde hastalıklı bitki örnekleri ve bu örneklerden izole edilen hastalık etmeni *Psp* izolat sayısı

Örnek Alınan İl	Ekiliş alanı (da)	İncelenen Toplam Alan (da)	Örnek Sayısı	Elde Edilen <i>Psp</i> İzolat Sayısı
Ankara	9,073	455	5	2
Burdur	15,086	755	18	6
Konya	172,303	8,617	28	10
Niğde	55,155	2,759	37	14
Eskişehir	4,265	215	22	8
TOPLAM	255.882	12.801	110	40

Elde edilen izolat sayılarına göre en fazla izolat Niğde ve Konya illerinden elde edilmiştir. En az hastalık etmeni ise Ankara ilindeki Sörveylerden elde edilmiştir. Elde edilen floresan özellikteki 40 izolatın tamamı meyvelerde ıslak lekelenmeler ile başlayan tipik hastalık belirtilerine neden olmuştur. Yapılan virülenslik testleri sonucunda 40 farklı izolat değişen değerlerde ıslaklık şeklinde ortaya çıkmış hastalık belirtisi oluşturmıştır (Şekil 4.8, Çizelge 4.4)



Şekil 4.8. (A) Fasulye meyvelerine inokule edilen aday *Psp* izolatlarının inokulasyonu, (B) 24 saat nem çemberinde bekletilmesi ve (C) *Psp* izolatlarının meyveler üzerinde farklı şiddetlerde oluşturdukları belirtilere (ok) göre virülenslik düzeylerinin (ıslaklık çapına göre) belirlenmesi

Çizelge 4.4. Farklı *Psp* izolatlarının fasulye meyveleri (cv. Gina) üzerinde yapılan virülenslik testleri sonucunda elde edilen lezyon çapı (mm)

İzolat no	İzole Edildiği İl	Virülenslik Değeri ^a	İzolat no	İzole Edildiği İl	Virülenslik Değeri ^a
1	Konya	10.9 ^A	21	Eskişehir	3.7 ^{G-N}
2	Konya	9.4 ^{AB}	22	Niğde	3.7 ^{G-N}
3	Ankara	9.1 ^{A-C}	23	Burdur	3.6 ^{G-M}
4	Eskişehir	7.6 ^{B-D}	24	Eskişehir	3.6 ^{G-O}
5	Konya	7.5 ^{B-D}	25	Eskişehir	3.5 ^{H-P}
6	Konya	7.3 ^{B-D}	26	Konya	2.5 ^{I-Q}
7	Niğde	6.7 ^{C-F}	27	Konya	2.2 ^{J-Q}
8	Niğde	6.2 ^{D-G}	28	Eskişehir	2.2 ^{J-Q}
9	Eskişehir	5.9 ^{D-H}	29	Eskişehir	2.1 ^{J-Q}
10	Eskişehir	5.9 ^{D-H}	30	Niğde	2.1 ^{J-Q}
11	Niğde	5.4 ^{D-H}	31	Burdur	2.0 ^{K-Q}
12	Niğde	5.4 ^{D-H}	32	Eskişehir	2.0 ^{K-Q}
13	Niğde	5.2 ^{D-H}	33	Niğde	2.0 ^{K-Q}
14	Burdur	5.0 ^{D-I}	34	Konya	1.6 ^{L-Q}
15	Niğde	4.7 ^{E-J}	35	Konya	1.5 ^{M-Q}
16	Eskişehir	4.3 ^{F-K}	36	Niğde	1.1 ^{N-Q}
17	Niğde	4.3 ^{F-K}	37	Konya	1.0 ^{O-Q}
18	Niğde	4.2 ^{F-L}	38	Niğde	1.0 ^{O-Q}
19	Burdur	4.0 ^{G-M}	39	Niğde	0.9 ^{PQ}
20	Eskişehir	3.9 ^{G-M}	40	Niğde	0.4 ^Q

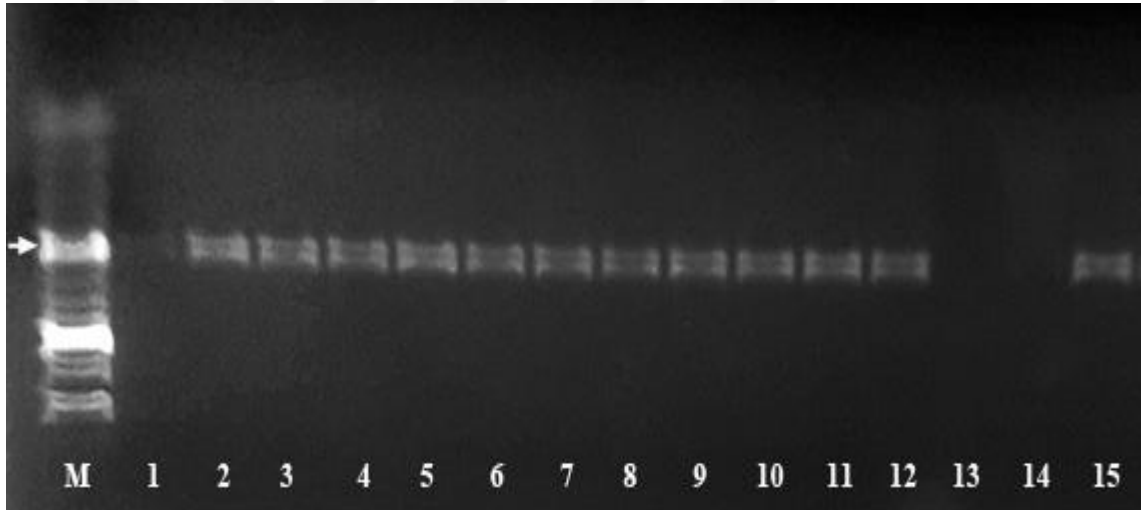
^aSütun içinde verilen ortalama lezyon çapı (mm) değerlerinin yanındaki benzer harfler izolatlar arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğunu gösterir (Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi, P<0.05)

Biyokimyasal (LOPAT, Levan, Oksidaz, Pektolitik aktivite, Arginine Dehisrolaz ve Tütünde hipersensitif reaksiyon) testleri yapılmış tüm izolatların (toplam 40 izolat) MALDI-TOF analizleri (Şekil 4.9) ve PCR çalışmaları sonucunda *Psp* etmeni olarak teyit edilmiştir. *Psp* etmeninin moleküler olarak tanımlanması çalışmalarında “Phaseolotoxin Geni”ne spesifik olarak tasarlanmış olan, P5.1 ve P3.1 primerleri kullanılmış olup, PCR çalışmaları sonucunda tüm izolatlar beklenen 500 bp bantlar oluşturmuştur (Şekil 4.10).

Analyte Name: D5
 Analyte Description: K13.1Psp
 Analyte ID: 2018-04-24T16:54:21.304
 Applied MSP Library(ies): Projects, Bruker Taxonomy, Taxonomy
 Applied Taxonomy Tree:

Rank (Quality)	Matched Pattern	Score Value	NCBI Identifier
1 (+++)	CFBP-3660_Pseudomonas savastanoi pv. phaseolicola race 9_2016082	2.511	100134258
2 (+++)	CFBP-3632_Pseudomonas savastanoi pv. phaseolicola race 1_2016082	2.444	100134258
3 (+++)	CFBP-2214-Pseudomonas syringae pv. glycinea_20170306	2.428	100134258
4 (+++)	CFBP-1390_Pseudomonas savastanoi pv. fraxini_20160818	2.41	100134258
5 (+++)	Pseudomonas syringae pv. phaseolicola_20160607	2.386	100134258
6 (++)	CFBP-3635_Pseudomonas savastanoi pv. phaseolicola race 2_2016082	2.288	100134258
7 (++)	CFBP-4219-Pseudomonas syringae pv. daphniophylli_20170223	2.282	100134258
8 (++)	Pseudomonas savastanoi ssp savastanoi LMG 5011 HAM	2.271	29438
9 (++)	CFBP-3641_Pseudomonas savastanoi pv. phaseolicola race 4_2016082	2.265	100134258

Şekil 4.9. K13.1 kodlu *Psp* izolatının MALDI-TOF ile yapılan teşhis sonucu elde edilen eşleşme ve indeks değerleri.

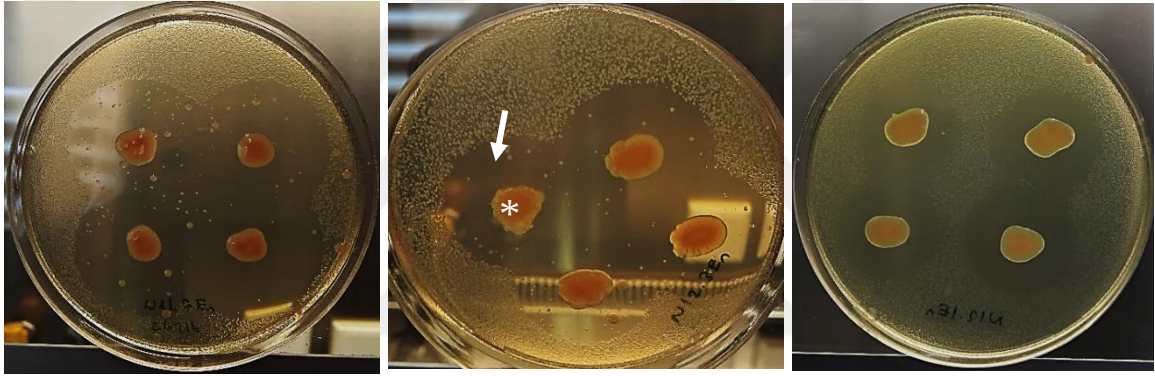


Şekil 4.10. Farklı bölgelerden izole edilmiş *Psp* izolatlarının spesifik primerler ile tanınması. Tüm izolatlar beklenen 500 bp bantlar (ok) oluşturmuştur. **M**: marker; **1-12**: farklı bölgelerden elde edilen *Psp* izolatları; **13**: *Pseudomonas gessardii* N35.1; **14**: *Pseudomonas putida* K15.1; **15**: Referans *Psp* izolatı, Psp12

En yüksek virülenslik gösteren *Psp* izolatı Konya ilinde yapılan sörvey çalışmalarında enfekteli fasulye meyvelerinde oluşturmuş olduğu tipik ıslaklık belirtisi gösteren örneklerden elde edilen K13.1Psp izolatı olarak belirlenmiştir. Hastalık etmeninin yüksek virülenslik gösteren K13.1Psp izolatı endofit bakterilerin *in vitro* ve *in vivo* etkinliklerinin belirlendiği çalışmalarda kullanılmak üzere seçilmiştir.

4.6. Aday EB İzolatlarının *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*'ya Karşı *in vitro* Antagonistik Etkinliklerinin Belirlenmesi

Ülkemizin fasulye yetiştiriciliği yapılan farklı illerindeki tarlalarda yetişen sağlıklı bitkilerden elde edilmiş olan *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Microbacterium*, *Acinetobacter*, *Stenotrophomonas*, *Achromobacter*, *Serratia*, *Exiguobacterium*, *Enterobacter*, *Lelliottia*, *Micrococcus* ve *Ochrobactrum* cinslerine ait toplam 56 adet EB izolatının Konya ilinden izole edilmiş ve virülensliği en yüksek olan *Psp* izolatına karşı *in vitro* koşullarda antagonistik etkinlikleri ikili kültür testlemeleri ile belirlenmiştir (Şekil 4.11). Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.5. de verilmiştir.



Şekil 4.11. EB izolatlarının (*) hastalık etmeni *Psp*'nin gelişimini engelleme (antagonistik) potansiyelleri (ok).

İkili kültür testlerinde en yüksek antagonistik etkinlik 4.85 antagonistik (engelleme) indeks değeri Niğde ilinden izole edilen *Pseudomonas gessardii* N35.1 izolatı tarafından gösterilmiş olup, bu izolatı sırası ile 4.23 indeks değeri ile *Arthrobacter ilicis* N11.3, 4.01 indeks değeri ile *Stenotrophomonas* sp. B6.6, 3.57 indeks değeri ile *Achromobacter spanius* B1.1, 5.56 indeks değeri ile *Pseudomonas putida* K15.1 ve 3.27 indeks değeri ile *Arthrobacter gandavensis* N19.1 izolatları takip etmiştir. İzolatlar arasında *Pseudomonas gessardi* dışında diğer izolatlar arasında istatistiksel olarak farklılık gözlenmemiştir (Çizelge 4.5). İzolatlar arasında en düşük etkinlik 1.22 indeks değeri ile *Bacillus thuringiensis* N36.1 izolatları tarafından gösterilmiştir.

Çizelge 4.5. Sağlıklı fasulye bitkilerinden elde edilmiş farklı türlere EB izolatlarının hastalık etmeni *Psp* izolatına karşısında göstermiş oldukları *in vitro* antagonistik etkinliği.

İzolat Adı	Antagonistik İndeksi ^a	İzolat Adı	Antagonistik İndeksi ^a
<i>Pseudomonas gessardii</i> N35.1	4.9 ^a	<i>Arthrobacter nicotinovorans</i> N3.1	2.2 ^{h-o}
<i>Arthrobacter ilicis</i> N11.3	4.2 ^{a-b}	<i>Arthrobacter gandavensis</i> E16.1	2.1 ^{i-p}
<i>Stenotrophomonas sp</i> B6.6	4.0 ^{b-c}	<i>Microbacterium phyllosphaerae</i> K21.1	2.1 ^{i-p}
<i>Achromobacter spanius</i> B1.1	3.6 ^{b-d}	<i>Bacillus licheniformis</i> K1.1	2.1 ^{i-p}
<i>Pseudomonas putida</i> K15.1	3.6 ^{b-d}	<i>Bacillus simplex</i> K8.2	2.1 ^{i-p}
<i>Arthrobacter gandavensis</i> N19.1	3.3 ^{c-e}	<i>Arthrobacter gandavensis</i> E16.2	2.0 ^{i-p}
<i>Stenotrophomonas sp</i> E13.1	3.2 ^{d-e}	<i>Pseudomonas rhodesiae</i> N24.3	2.0 ^{j-q}
<i>Exiguobacterium sp.</i> N16.2	3.2 ^{d-f}	<i>Stenotrophomonas sp</i> B3.7	1.9 ^{k-q}
<i>Bacillus altitudinis</i> A5.3	3.1 ^{d-f}	<i>Bacillus pumilus</i> N26.2	1.9 ^{k-q}
<i>Pseudomonas brenneri</i> E9.6	3.1 ^{d-f}	<i>Achromobacter spanius</i> N1.2	1.9 ^{k-q}
<i>Bacillus simplex</i> E2.7	3.1 ^{d-f}	<i>Serratia liquefaciens</i> N34.1	1.9 ^{k-q}
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> E1.4	3.1 ^{d-g}	<i>Bacillus siralis</i> N29.2	1.9 ^{k-q}
<i>Arthrobacter oxydans</i> N13.11	3.1 ^{d-g}	<i>Microbacterium phyllosphaerae</i> N3.2	1.8 ^{k-q}
<i>Pseudomonas brassicacearum</i> N16.1	3.1 ^{d-g}	<i>Bacillus endophyticus</i> N17.2	1.8 ^{l-q}
<i>Micrococcus luteus</i> N31.3	2.9 ^{d-h}	<i>Rhizobium radiobacter</i> K25.1	1.8 ^{l-q}
<i>Microbacterium maritipicum</i> K15.2	2.9 ^{d-h}	<i>Enterobacter cloacae</i> B9.1	1.7 ^{m-q}
<i>Pseudomonas brenneri</i> E6.5	2.8 ^{d-h}	<i>Microbacterium maritipicum</i> N28.3	1.7 ^{m-q}
<i>Acinetobacter johnsonii</i> E17.2	2.8 ^{e-i}	<i>Serratia plymuthica</i> B13.1	1.6 ^{n-q}
<i>Stenotrophomonas sp</i> K19.3	2.8 ^{e-i}	<i>Arthrobacter aureescens</i> E20.1	1.6 ^{n-q}
<i>Arthrobacter nicotinovorans</i> B11.2	2.7 ^{e-j}	<i>Rhizobium radiobacter</i> E22.5	1.6 ^{n-q}
<i>Microbacterium hydrocarbonoxydans</i> K18.1	2.5 ^{e-k}	<i>Bacillus cereus</i> N7.1	1.6 ^{n-q}
<i>Bacillus altitudinis</i> E15.5	2.5 ^{f-l}	<i>Rhizobium radiobacter</i> N15.1	1.6 ^{n-q}
<i>Pseudomonas extremorientalis</i> K13.2	2.4 ^{f-m}	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> K20.1	1.5 ^{o-q}
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> N21.5	2.3 ^{g-n}	<i>Rhizobium radiobacter</i> E13.5	1.4 ^{p-q}
<i>Bacillus cereus</i> N17.1	2.3 ^{h-n}	<i>Bacillus licheniformis</i> N1.1	1.3 ^{p-q}
<i>Arthrobacter histidinolovorans</i> N25.2	2.3 ^{h-n}	<i>Bacillus simplex</i> E20.6	1.3 ^{p-q}
<i>Lelliottia amnigena</i> E6.1	2.3 ^{h-o}	<i>Bacillus megaterium</i> E19.7	1.3 ^{p-q}
<i>Arthrobacter woluwensis</i> N26.1	2.2 ^{h-o}	<i>Bacillus thuringiensis</i> N36.1	1.2 ^q

^a TSA besi üzerinde patojen gelişiminin engellenmesi sonucu oluşan engelleme bölgeleri ile bakteri koloni çapları ölçülerek indeks değerleri hesaplanmıştır. Sütun içinde yer alan ortalama indeks değerlerin yanındaki farklı harfler izolatlar arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğunu göstermektedir (Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi, $P<0.05$).

Antagonist EB izolatların izole edildiği bitki aksamaları da değerlendirilmiş ve ortaya çıkan sonuçlar dikkat çekici olmuştur. Engelleme etkinliğine sahip 56 izolatın büyük bir çoğunluğu hastalık etmenlerinin görüldüğü tarlardaki sağlıklı bitkilerin meyve ve

gövdelerinden izole edilmiştir. Bitkinin meyve ve gövdelerinden yapılan izolasyonlar ile kök ve yapraklarından yapılan izolasyonlardan elde edilen bakterilerin göstermiş olduğu etkinlikleri karşılaştırıldığında, bitkinin gövde ve meyvelerinden yapılan izolasyonlarla daha çok sayıda etkinlik gösteren izolat elde edilmiş olup, bu durumun muhtemel burada yaşayan izolatların hastalık etmeni ile yakın etkileşimlerde bulunmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu nedenle hastalıklara karşı etkin biyolojik mücadele etmeni izolasyonlarında örneklemelerin özellikle hastalık belirtilerini yoğun bir şekilde gösteren bitkilerin hemem yanında gelişen hastalık belirtisi göstermeyen bitkilerden yapılmasının daha uygun olacağı önerilmiştir.

Test edilen antagonist EB izolatlar arasında yüksek düzeyde antagonistik etkinlik gösteren, *Pseudomonas gessardii*, *Arthrobacter ilicis*, *Stenotrophomonas sp.*, *Achromobacter spanius*, *Pseudomonas putida* ve *Arthrobacter gandavensis* gibi antagonist bakteri izolatların fasulye Hale Yanıklığı hastalığı etmeni *Psp*'ye karşı antagonistik etkinliği ilk kez bu çalışma ile ortaya konulmuştur.

Pseudomonas gessardii genetik olarak yakın akraba olduğu floresan *Pseudomonas fluorescent* altgrubuna dahil bir bakteri türü olup, sağlıklı buğday bitkilerin yapraklarından izole edilmişler ve ikili kültür testlerinde buğday hastalık etmenlerinden *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Alternaria alternata* ve *Alternaria tenuissima*'ya karşı antimikrobiyal bileşiklerden olan 2,4-diacetylphloroglucinol'ü üretmek suretiyle yüksek düzeylerde antagonistik etkinlik gösterdiği bildirilmiştir (Müller ve ark., 2016). Benzer şekilde Soylu ve Bozkurt (2019) tarafından sağlıklı elma kök ve kökboğazından izole edilen endofit antagonist izolatlardan *P. putida*'nın 4 izolatının taç gal hastalığı etmeni *Rhizobium radiobacter*'in (*Agrobacterium tumefaciens*) *in vitro* koşullarda gelişiminin yanısıra etmen tarafından neden olunan ur oluşumunu yarı *in vivo* koşullarda en yüksek düzeyde engelleyen izolatlar olduğunu bildirmişlerdir. Mesanza ve ark. (2016) tarafından çam köklerinden izole edilen *Pseudomonas fluorescens*, *Erwinia billingiae* ve *Bacillus simplex* izolatlarının fungal hastalık etmenleri olan *Heterobasidion annosum* (%68.6-99.3 oranında) ve *Armillaria mellea* (%64.8-94.2 oranında) misel gelişimlerini *in vitro* koşullarda yüksek düzeyde engelledikleri bildirilmiştir. Chandrasekaran ve ark. (2016) bakteriyel solgunluk etmeni *Ralstonia solanacearum* tarafından oluşturulan hastalık çıkışı ve şiddetinin antagonist bakteri izolatlarından *P. fluorescens*, *P. putida*, *B. cereus*, *B. subtilis* ve *B. amylotiquefaciens*'in

%49.3-53.7 oranlarında engellediğini bildirmişlerdir. Benzer şekilde Kheirandish ve Harighi (2015) bitki köklerinden izole ettikleri *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Paenibacillus sp.*, *Enterobacter sp.*, *Serratia sp.* antagonist bakteri izolatlarının *in vitro* ve *in vivo* koşullarda bakteriyel solgunluk etmeni *Ralstonia solanacearum* karşı oldukça yüksek düzeylerde antagonistik etkinlik gösterdiğini bildirmişlerdir.

4.7. EB İzolatların Hastalık Gelişimini Engelleme (Antagonistik) ve Bitki Gelişimini Teşvik Eden Mekanizmalarının Belirlenmesi

EB izolatların ikili kültür testinde kullanılan bakteri izolatların patojen gelişimini engellemede rol oynamış olası antagonistik (siderofor, proteaz, amonyak,) ve bitki gelişimini teşvik eden (indol-3-asetik asit [IAA], siderofor, fosfor çözünürlüğü) mekanizmaları *in vitro* koşullarda daha önceden bildirilmiş yöntemlere göre belirlenmiş ve değerlendirilmiştir.

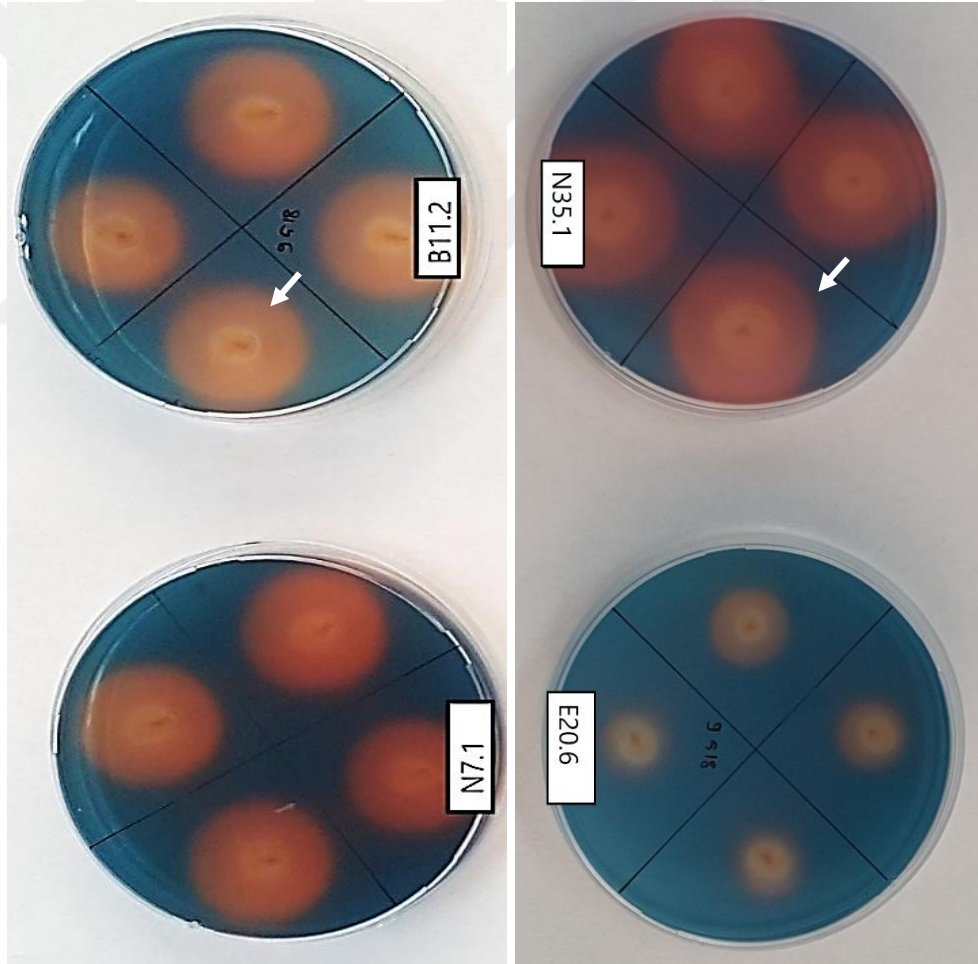
4.7.1. EB İzolatların Siderofor Üretme Potansiyellerinin Belirlenmesi

Endofit bakteri izolatlarının siderofor üretme potansiyelleri, Schwyn ve Neilands (1987) tarafından bildirilen Chrom Azurol S (CAS) içeren Blue-CAS Agar (EK-1) besi ortamı kullanılarak belirlenmiştir. İndikatör boya olan krom azurol'un indirgenmesi, bakterilerin ürettiği hydroxamate-tip siderofor'dan dolayı bakteri kolonisi etrafında meydana gelen zonun renginin maviden sarı-turuncu renge dönüşmesine neden olmuştur (Şekil 4.12). Bakterilerin siderofor üretme aktiviteleri, zon çapının ve bakteri kolonisinin çapına oranlanması sonucunda elde edilen indeks değerine (S-indeks) göre belirlenmiş, elde edilen sonuçlar Çizelge 4.6.' da verilmiştir.

Çizelge 4.6.'de görüldüğü gibi, besiyeri üzerinde en yüksek siderofor üretimi *Psp*'ye karşı antagonist etkinliği yüksek endofit izolatlar arasında yer almış türlerden 5.8 indeks değeri ile *Pseudomonas gessardii* N35.1 izolatı olmuştur, bu izolatı 3.88 indeks değeri ile *Bacillus cereus* N7.1 izolatı, 3.42 indeks değeri ile *Pseudomonas brenneri* E9.6 izolatı takip etmiştir. Test edilen 56 izolat içerisinde sadece 2 izolat (*Bacillus amyloliquefaciens* N21.5 ve *Bacillus cereus* N17.1) CAS Agar besiyerinde siderofor üretme aktivitesi göstermemiştir (Çizelge 4.6).

Yüksek siderofor etkinliği gösteren aynı türe ait izolatlar arasında (*Bacillus cereus*'un N7.1 ile N17.1 izolatlarında olduğu gibi) önemli düzeyde farklılıklar olduğu farklılığın sözkonusu izolatların izole edildiği farklı bitki, bitki kısmı, bitkinin yetiştiği coğrafya, toprak yapısı ve etkileşimde olduğu mikrobiyal topluluğa bağlı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Endofit bakteriler tarafından üretilen sideroforlar bitki gelişimini doğrudan veya dolaylı olarak etkiler. Sideroforun topraktaki bağlı demiri çözerek bitkiye faydalı hale getirmesi ve bitkinin bundan faydalanması sonucu gelişimini doğrudan teşvik eder (Sujatha ve Ammani, 2013). Siderofor aynı zamanda antagonist bakterilerin bitki patojeni fungal ve bakteriyel etmenlerin engellenmesinde antagonistik mekanizma olarak rol oynadığı yapılan önceki çalışmalarda da bildirilmiştir.



Şekil 4.12. EB izolatlarının CAS Agar besiyerinde siderofor üretme potansiyelleri ve EB izolatları tarafından siderofor üretimi sonucu koloni etrafında oluşan zonlar (ok).

Çizelge 4.6. Farklı türlere ait EB izolatlarının CAS Agar besiyeri üzerinde siderofor üretim aktiviteleri.

Bakteri İzolatı	Siderofor İndeksi ^a	Bakteri İzolatı	Siderofor İndeksi ^a
<i>Pseudomonas gessardii</i> N35.1	5.83 ^a	<i>Microbacterium phyllosphaerae</i> K21.1	1.68 ^{g-k}
<i>Bacillus cereus</i> N7.1	3.88 ^b	<i>Pseudomonas putida</i> K15.1	1.67 ^{g-k}
<i>Pseudomonas brenneri</i> E9.6	3.42 ^{bc}	<i>Microbacterium hydrocarbonoxydans</i> K18.1	1.65 ^{g-k}
<i>Arthrobacter nicotinovorans</i> B11.2	3.38 ^{b-d}	<i>Rhizobium radiobacter</i> K25.1	1.65 ^{g-k}
<i>Pseudomonas extremorientalis</i> K13.2	2.96 ^{b-e}	<i>Pseudomonas brenneri</i> E6.5	1.64 ^{g-k}
<i>Stenotrophomonas sp.</i> E13.1	2.93 ^{b-e}	<i>Bacillus pumilus</i> N26.2	1.62 ^{h-k}
<i>Stenotrophomonas sp.</i> K19.3	2.80 ^{b-f}	<i>Stenotrophomonas sp.</i> B3.7	1.59 ^{h-k}
<i>Microbacterium maritipicum</i> N28.3	2.79 ^{c-f}	<i>Serratia plymuthica</i> B13.1	1.58 ^{h-k}
<i>Exiguobacterium sp.</i> N16.2	2.71 ^{c-g}	<i>Rhizobium radiobacter</i> E22.5	1.58 ^{h-k}
<i>Microbacterium phyllosphaerae</i> N3.2	2.50 ^{c-h}	<i>Bacillus megaterium</i> E19.7	1.58 ^{h-k}
<i>Achromobacter spanius</i> N1.2	2.33 ^{d-i}	<i>Arthrobacter oxydans</i> N13.11	1.53 ^{h-k}
<i>Lelliottia amnigena</i> E6.1	2.26 ^{e-j}	<i>Bacillus endophyticus</i> N17.2	1.53 ^{h-k}
<i>Microbacterium maritipicum</i> K15.2	2.25 ^{e-j}	<i>Bacillus simplex</i> E20.6	1.41 ^{i-k}
<i>Bacillus siralis</i> N29.2	2.25 ^{e-j}	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> K20.1	1.40 ^{i-k}
<i>Stenotrophomonas sp.</i> B6.6	2.19 ^{e-j}	<i>Enterobacter cloacae</i> B9.1	1.38 ^{i-k}
<i>Micrococcus luteus</i> N31.3	2.08 ^{e-k}	<i>Rhizobium radiobacter</i> E13.5	1.38 ^{i-k}
<i>Arthrobacter gandavensis</i> E16.2	2.02 ^{e-k}	<i>Bacillus licheniformis</i> N1.1	1.37 ^{i-k}
<i>Bacillus altitudinis</i> E15.5	2.01 ^{e-k}	<i>Rhizobium radiobacter</i> N15.1	1.36 ^{i-k}
<i>Arthrobacter nicotinovorans</i> N3.1	1.97 ^{e-k}	<i>Serratia liquefaciens</i> N34.1	1.35 ^{i-k}
<i>Bacillus licheniformis</i> K1.1	1.96 ^{e-k}	<i>Bacillus altitudinis</i> A5.3	1.34 ^{i-k}
<i>Arthrobacter gandavensis</i> E16.1	1.93 ^{e-k}	<i>Bacillus simplex</i> E2.7	1.33 ^{i-k}
<i>Acinetobacter johnsonii</i> E17.2	1.91 ^{e-k}	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> E1.4	1.32 ^{i-k}
<i>Arthrobacter aureescens</i> E20.1	1.91 ^{e-k}	<i>Arthrobacter woluwensis</i> N26.1	1.27 ^{i-k}
<i>Achromobacter spanius</i> B1.1	1.77 ^{f-k}	<i>Pseudomonas rhodesiae</i> N24.3	1.23 ^{jk}
<i>Arthrobacter gandavensis</i> N19.1	1.76 ^{f-k}	<i>Bacillus thuringiensis</i> N36.1	1.21 ^{jk}
<i>Bacillus simplex</i> K8.2	1.73 ^{f-k}	<i>Pseudomonas brassicacearum</i> N16.1	1.09 ^k
<i>Arthrobacter ilicis</i> N11.3	1.69 ^{g-k}	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> N21.5	0.00 ^l
<i>Arthrobacter histidinovorans</i> N25.2	1.68 ^{g-k}	<i>Bacillus cereus</i> N17.1	0.00 ^l

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

Hassan ve ark. (2014) şeker kamışı bitkilerinin kök bölgesinden izole ettikleri *Ochrobactrum intermedium* NH-5, *S. maltophilia* NH-300, *Pseudomonas sp.* NH-203 ve NH-276 izolatlarının fungal etmen *Colletotrichum falcatum*'a karşı *in vitro* ve *in vivo*

koşullarda antagonistik etkinlik gösterdiği, tüm izolatların hydrogen cyanide (HCN) ve uçucu (volatile) antibiyotikler ürettiği, *Ochrobactrum intermedium* NH-5 izolatının ayrıca siderofor ve geniş spektrumlu antibiyotiklerden olan 2, 4-diacetylphloroglucinol (2,4-DAPG); *Pseudomonas* sp. NH-203 izolatının siderofor, *Pseudomonas* sp. NH-276 izolatının ise proteaz üretmek yoluyla hastalık etmenine karşı biyoetkinlik gösterdiğini bildirmiştir. Araştırmacılar ayrıca *Ochrobactrum intermedium* NH-5 ve *Stenotrophomonas maltophilia* NH300 izolatının hastalık çıkışını %44-52 oranında engellemek suretiyle en iyi etkinlik gösteren izolatlar olduğunu bildirmiştir.

Sazinas ve ark. (2019), Danimarka’da üzeri yapraklarla kaplı olan topraklardan çok nadir rastlanan “thioquinolobactin siderofor” üretimi yapan “*Pseudomonas* DTU12.1” izolatını elde etmiş olup, bu izolatın moleküler karakterizasyonu yapıldığında *Pseudomonas gessardii* ile aynı grupta yer aldığı belirlenmiştir. Çalışmamızda N35.1 kodlu *Pseudomonas gessardii* izolatının diğer floresan *Pseudomonad*’lardan farklı olarak kendine özgü bir proteini ve/veya toksini bulundurduğunu ve bu içeriği ve metabolik faaliyeti ile antibiyosis özelliği ile diğer endofit bakterilerin önüne geçebileceğini göstermiştir.

Cabello-Conejo ve ark., (2014) tarafından yapılan bir çalışmada Brassicaceae familyasına ait *Alyssum pintodasilvae* bitkisinden elde ettikleri mikroorgnizmalar arasında yer alan iki farklı *Arthrobacter nicotinovorans* izolatı da topraktaki ağır metalleri parçalamaları, bitki besin maddelerinin (PO₄) alınabilirliğinin sağlanması yanı sıra üretmiş oldukları siderofor ile diğer izolatların arasında fark oluşturmuştur. Her ne kadar B11.2 kodlu *Arthrobacter nicotinovorans* izolatının *Psp* üzerinde antagonistik etkisi düşük olsa da söz konusu çalışma antagonist bakterilerin doğal olarak bulundukları veya yaygın olarak kullanıldıkları alanlar dışında farklı bitkilerden veya farklı endüstriyel kullanım alanlarından da elde edilebileceğini, antagonist bakterilerin sağlamış oldukları çok yönlü destek ile bitkilere ve bitkilerin yetiştiği ekosisteme önemli derecede faydalar sağladıklarını göstermektedir.

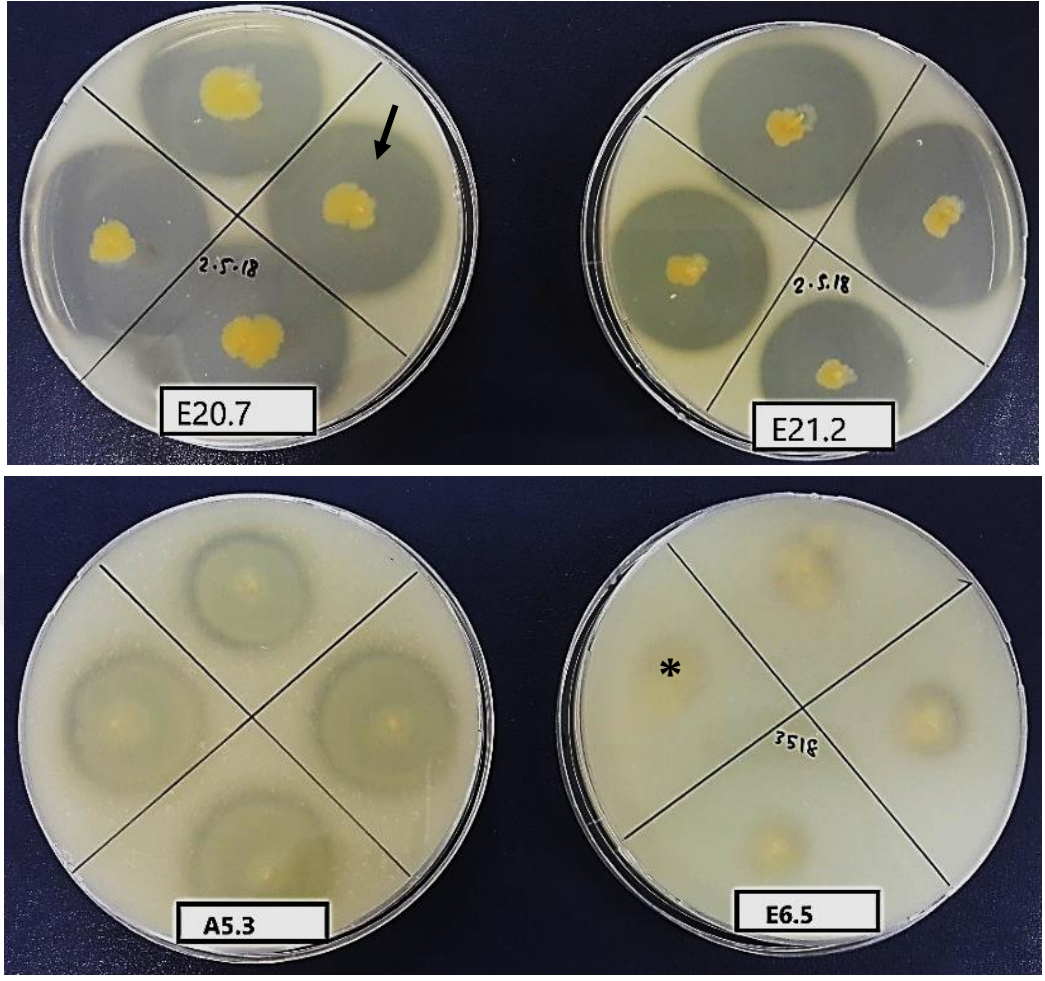
Daha önce yapılan birçok yüksek lisans tez ve biyolojik mücadele çalışmalarında özellikle *Aeromonas*, *Azadirachta*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Ochrobactrum*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Serratia*, *Stenotrophomonas* *Streptomyces* sp. ait bakteriyel EB türlerince siderofor üretildiği, üretilen siderofor’un bitki tarafından alınamayan formda olan topraktaki bağlı demiri çözmek suretiyle bitkiye yararlı hale çevirip, bitkinin

böylesine önemli bitki besin elementinden faydalanması sonucu gelişimini doğrudan teşvik ettiği bildirilmiştir (Sujatha ve Ammani, 2013; Aktan, 2018; Emdirme, 2019).

4.7.2. EB İzolatların Proteaz Enzimi Üretme Potansiyellerinin Belirlenmesi

EB izolatlarının SMLBA üzerinde proteaz üretme potansiyelleri (proteolitik aktivite), bakteri izolatının ürettiği proteaz enziminin besi yeri içindeki yağı alınmış süt tozundaki caseini çözerek koloni etrafında şeffaf bir engelleme bölgesinin oluşması ile karakterize edilmiştir. Bu aktiviteyi gösteren endofit bakteriler kolonilerinin etrafında belirgin şeffaf bir zon oluşturmuşlardır (Şekil 4.13). Bakteri izolatların proteaz üretim aktivitesi oluşturdukları zon çapının ve bakteri koloni çapına oranlanması ile elde edilen indeks değerine (Pro-indeks) göre değerlendirilmiş, elde edilen sonuçlar Çizelge 4.7’da verilmiştir.

Çizelge 4.7.’de görüldüğü gibi, test edilen toplam 56 endofit izolat arasından 23 izolat proteolitik enzim aktivitesi gösterirken, 33 izolat ise proteolitik enzim aktivitesi göstermemiştir. Endofit izolatlar arasında *Arthrobacter gandavensis* E16.1 izolatı 4.69 indeks değeri ile en yüksek proteolitik aktivite (proteaz enzimi salgılayan) gösteren izolat olmuştur. Bu izolatı sırası ile *Microbacterium maritopicum* K15.2 izolatı 4.10 indeks değeri ile *Serratia plymuthica* B13.1 izolatı 3.47 indeks değeri ile *Stenotrophomonas* sp K19.3 izolatı 3.30 indeks değeri ile takip etmişlerdir.



Şekil 4.13. EB izolatların SMLBA üzerinde proteaz üretme potansiyellerinin belirlenmesi. Bazı izolatlar engelleme bölgesi oluştururken (ok), bazı izolatlar (*) oluşturamamıştır

Çizelge 4.7. Farklı türlere ait EB izolatların proteolitik enzim (proteaz) üretme aktiviteleri (ppm)

Bakteri İzolatı	Proteaz İndeksi ^a	Bakteri İzolatı	Proteaz İndeksi ^a
<i>Arthrobacter gandavensis</i> E16.1	4.69 ^a	<i>Bacillus megaterium</i> E19.7	0.0 ¹
<i>Microbacterium maritipicum</i> K15.2	4.10 ^b	<i>Bacillus cereus</i> N7.1	0.0 ¹
<i>Serratia plymuthica</i> B13.1	3.47 ^c	<i>Arthrobacter nicotinovorans</i> B11.2	0.0 ¹
<i>Stenotrophomonas</i> sp K19.3	3.30 ^{cd}	<i>Stenotrophomonas</i> sp E13.1	0.0 ¹
<i>Pseudomonas brenneri</i> E9.6	3.09 ^{cd}	<i>Exiguobacterium</i> sp. N16.2	0.0 ¹
<i>Microbacterium maritipicum</i> N28.3	2.88 ^d	<i>Microbacterium phyllosphaerae</i> N3.2	0.0 ¹
<i>Stenotrophomonas</i> sp B3.7	2.86 ^d	<i>Achromobacter spanius</i> N1.2	0.0 ¹
<i>Arthrobacter aurescens</i> E20.1	2.34 ^e	<i>Lelliottia amnigena</i> E6.1	0.0 ¹
<i>Pseudomonas extremorientalis</i> K13.2	2.12 ^{ef}	<i>Bacillus siralis</i> N29.2	0.0 ¹
<i>Serratia liquefaciens</i> N34.1	2.08 ^{ef}	<i>Bacillus altitudinis</i> E15.5	0.0 ¹
<i>Stenotrophomonas</i> sp B6.6	1.96 ^{e-g}	<i>Bacillus licheniformis</i> K1.1	0.0 ¹
<i>Arthrobacter oxydans</i> N13.11	1.88 ^{e-h}	<i>Achromobacter spanius</i> B1.1	0.0 ¹
<i>Pseudomonas rhodesiae</i> N24.3	1.83 ^{f-i}	<i>Arthrobacter gandavensis</i> N19.1	0.0 ¹
<i>Rhizobium radiobacter</i> E13.5	1.78 ^{f-j}	<i>Bacillus simplex</i> K8.2	0.0 ¹
<i>Bacillus licheniformis</i> N1.1	1.69 ^{f-j}	<i>Arthrobacter ilicis</i> N11.3	0.0 ¹
<i>Arthrobacter nicotinovorans</i> N3.1	1.67 ^{f-k}	<i>Microbacterium phyllosphaerae</i> K21.1	0.0 ¹
<i>Arthrobacter histidinovorans</i> N25.2	1.67 ^{f-k}	<i>Pseudomonas putida</i> K15.1	0.0 ¹
<i>Arthrobacter gandavensis</i> E16.2	1.60 ^{g-k}	<i>Microbacterium hydrocarbonoxydans</i> K18.1	0.0 ¹
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> K20.1	1.48 ^{h-k}	<i>Rhizobium radiobacter</i> K25.1	0.0 ¹
<i>Micrococcus luteus</i> N31.3	1.38 ^{i-k}	<i>Pseudomonas brenneri</i> E6.5	0.0 ¹
<i>Bacillus simplex</i> E20.6	1.37 ^{i-k}	<i>Bacillus pumilus</i> N26.2	0.0 ¹
<i>Pseudomonas gessardii</i> N35.1	1.32 ^{jk}	<i>Rhizobium radiobacter</i> E22.5	0.0 ¹
<i>Acinetobacter johnsonii</i> E17.2	1.22 ^k	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> E1.4	0.0 ¹
<i>Bacillus endophyticus</i> N17.2	0.0 ¹	<i>Arthrobacter woluwensis</i> N26.1	0.0 ¹
<i>Enterobacter cloacae</i> B9.1	0.0 ¹	<i>Bacillus thuringiensis</i> N36.1	0.0 ¹
<i>Rhizobium radiobacter</i> N15.1	0.0 ¹	<i>Pseudomonas brassicacearum</i> N16.1	0.0 ¹
<i>Bacillus altitudinis</i> A5.3	0.0 ¹	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> N21.5	0.0 ¹
<i>Bacillus simplex</i> E2.7	0.0 ¹	<i>Bacillus cereus</i> N17.1	0.0 ¹

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

En yüksek proteolitik etkinlik gösteren *Arthrobacter* sp. oldukça geniş bir yaşam alanına sahip olup mikrobiyal zenginlik ve çeşitlilik olarak hem bitki hem toprak içerisinde sıklıkla karşılaşılan bakterilerdir. *Arthrobacter* sp. dahil, izolatların daha önceden yapılan çalışmalarda da yüksek düzeyde proteaz enzimi dahil IAA, fosforu

özme, siderofor üretme gibi birçok PGP mekanizmayı kullanmak suretiyle bitki gelişimini teşvik ettiği, insan ve bitki kökenli hastalık etmenlerine karşı ise antagonistik etkinlik gösterdiği bildirilmiştir (Barman ve ark., 2017; Patel ve Archana, 2017; Ghorbani ve Harighi, 2018; Ashitha ve ark., 2019). İzolatların etkinlikleri tür bazında incelendiğinde, *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Serratia*, *Stenotrophomonas* gibi cinslere ait aynı türlere ait izolatlar arasında proteolitik etkinlikler açısından diğer mekanizmalarda olduğu gibi önemli farklılıklar belirlenmiştir.

Proteaz enzimleri, bitki dayanıklılık sistemine entegre hücre duvarını çözebilen enzimlerdir. Aşırı duyarlılık, patojen tanıma, uyarılma ve peptit hormonu salımı dahil olmak üzere, bitkilerde hastalıklara karşı savunmanın birçok yönü “proteaz” enzimleri tarafından düzenlenir. Bu işlemler, farklı hücre altı konumlarında bulunan bağımsız proteazlar tarafından düzenlenir (Thomas ve ark. 2018). Proteolitik aktivite ise salgılanan proteaz enzimi veya karşı karşıya kaldıkları proteaz enzimini etkisiz hale getirmeleri şeklinde bilinmektedir. Bu aktivite genelde bitki korumada bitki hastalıklarından ziyade bitki zararlısı böcekler ve nematodlar ile mücadelede zararlıların sindirim sisteminde veya iç organlarında yer alan entomopatojen mikroorganizmaların proteaz enzimi salgılayarak zararlıları etkisiz hale getirmeleri şeklinde karşımıza çıkmaktadır (Harrison ve ark., 2010).

Yapmış olduğumuz çalışmada, farklı izolatların farklı oranlarda proteaz enzim aktivitesi gösterdiği tespit edilmiş ve bu enzimlerin her birinin konukçu-patojen/konukçu-zararlı ilişkisinde farklı yönde etki mekanizması olarak görev yaptığı tahmin edilmektedir. Bu nedenle proteaz enzim aktivitesi olan her bir izolat yapılacak olan ileri çalışmalarda referans olarak kabul edilebilir değerdedir.

4.7.3. EB İzolatlarının Amonyak (NH₃) Üretim Potansiyellerinin Belirlenmesi

Peptonlu besi yeri içerisinde bakteriler tarafından üretilen amonyak üretimi Nessler solüsyonunun tüplerdeki besi yerine eklenmesine müteakiben besi yeri renginin açık sarıdan kahverengi-koyu sarı renge dönüşmesiyle belirginleşmiştir. Bakteri ile bulaştırılmış tüplerdeki sıvı besi yerinde oluşturulan amonyak miktarı spektrofotometrede 530 nm dalga boyunda ölçümleri yapılmış konsantasyonu bilinen standartların değerleri ile karşılaştırmalı olarak her bir endofit izolatın Amonyak (NH₃) üretim değerleri hesaplanmış elde edilen değerler Çizelge 4.8’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.8. Farklı türlere ait EB izolatların amonyak (NH₃) üretme aktiviteleri (ppm)

Bakteri İzolatı	Amonyak Üretimi ^a	Bakteri İzolatı	Amonyak Üretimi ^a
<i>Stenotrophomonas</i> sp B3.7	174.07 ^a	<i>Arthrobacter nicotinovorans</i> B11.2	96.67 ^{e-n}
<i>Stenotrophomonas</i> sp K19.3	167.41 ^{ab}	<i>Pseudomonas brenneri</i> E6.5	96.67 ^{e-n}
<i>Arthrobacter oxydans</i> N13.11	167.41 ^{ab}	<i>Pseudomonas brassicacearum</i> N16.1	96.36 ^{e-n}
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> K20.1	139.91 ^{bc}	<i>Rhizobium radiobacter</i> E22.5	96.06 ^{f-n}
<i>Bacillus altitudinis</i> A5.3	134.24 ^{cd}	<i>Bacillus licheniformis</i> N1.1	95.45 ^{f-n}
<i>Enterobacter cloacae</i> B9.1	129.39 ^{c-e}	<i>Bacillus altitudinis</i> E15.5	95.45 ^{f-n}
<i>Arthrobacter ilicis</i> N11.3	126.06 ^{c-f}	<i>Bacillus licheniformis</i> K1.1	95.45 ^{f-n}
<i>Microbacterium hydrocarbonoxydans</i> K18.1	126.06 ^{c-f}	<i>Bacillus simplex</i> E2.7	95.15 ^{f-n}
<i>Stenotrophomonas</i> sp E13.1	123.64 ^{c-g}	<i>Achromobacter spanius</i> B1.1	91.82 ^{g-o}
<i>Microbacterium maritipicum</i> K15.2	121.82 ^{c-g}	<i>Micrococcus luteus</i> N31.3	85.19 ^{h-p}
<i>Bacillus cereus</i> N7.1	121.82 ^{c-g}	<i>Arthrobacter woluwensis</i> N26.1	84.26 ^{h-p}
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> E1.4	118.79 ^{c-g}	<i>Arthrobacter gandavensis</i> E16.2	81.52 ^{h-p}
<i>Microbacterium phyllosphaerae</i> N3.2	113.94 ^{c-h}	<i>Bacillus cereus</i> N17.1	81.52 ^{h-p}
<i>Pseudomonas putida</i> K15.1	113.94 ^{c-h}	<i>Arthrobacter histidinolovorans</i> N25.2	81.02 ^{h-p}
<i>Arthrobacter gandavensis</i> E16.1	110.91 ^{c-h}	<i>Acinetobacter johnsonii</i> E17.2	77.58 ^{i-p}
<i>Lelliottia amnigena</i> E6.1	109.39 ^{c-i}	<i>Serratia liquefaciens</i> N34.1	77.27 ^{i-p}
<i>Pseudomonas brenneri</i> E9.6	108.18 ^{c-j}	<i>Bacillus megaterium</i> E19.7	75.46 ^{j-p}
<i>Pseudomonas extremorientalis</i> K13.2	107.88 ^{c-j}	<i>Rhizobium radiobacter</i> K25.1	71.00 ^{k-p}
<i>Arthrobacter nicotinovorans</i> N3.1	107.88 ^{c-j}	<i>Bacillus pumilus</i> N26.2	70.91 ^{k-p}
<i>Achromobacter spanius</i> N1.2	105.45 ^{d-j}	<i>Arthrobacter gandavensis</i> N19.1	68.52 ^{l-p}
<i>Bacillus simplex</i> K8.2	105.45 ^{d-j}	<i>Exiguobacterium</i> sp. N16.2	68.18 ^{l-p}
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> N21.5	103.64 ^{d-k}	<i>Bacillus endophyticus</i> N17.2	68.18 ^{l-p}
<i>Arthrobacter aurescens</i> E20.1	102.12 ^{d-k}	<i>Bacillus siralis</i> N29.2	67.58 ^{l-p}
<i>Bacillus simplex</i> E20.6	99.70 ^{e-l}	<i>Microbacterium maritipicum</i> N28.3	66.97 ^{l-p}
<i>Rhizobium radiobacter</i> E13.5	99.39 ^{e-l}	<i>Pseudomonas gessardii</i> N35.1	64.55 ^{m-p}
<i>Serratia plymuthica</i> B13.1	98.18 ^{e-l}	<i>Rhizobium radiobacter</i> N15.1	63.89 ^{n-p}
<i>Stenotrophomonas</i> sp B6.6	97.58 ^{e-m}	<i>Microbacterium phyllosphaerae</i> K21.1	61.11 ^{op}
<i>Bacillus thuringiensis</i> N36.1	97.27 ^{e-m}	<i>Pseudomonas rhodesiae</i> N24.3	55.56 ^p

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

Amonyak (NH₃) bulunduğu ortamda sıvı ve gaz formlarında rastlanılan ve genel anlamda antimikrobiyal özelliği ile ön plana çıkan bir bileşen olup aynı zamanda bakteriler tarafından da üretilebilmektedir (Fravel, 1988). Amonyak üreten bakteriler

üretmiş oldukları bu bileşen sayesinde bulundukları ortamda aynı besin ve çevresel gereksinimlere ihtiyaç duyan rakiplerini kendilerinden uzak tutabilmekte ve bu durum yoğun bir şekilde amonyak üretebilen bakterilerin, fitopatojen mikroorganizmalarla bitki paraziti nematodların mücadelesinde kullanılabileceği bildirilmiştir (McSorley 1998).

Çizelge 4.8’de de görüleceği gibi, test edilen tüm izolatlar 174.07-55.6 ppm arasında değişen miktarlarda amonyak üretmişlerdir. İzolatlar arasında en yüksek amonyak üretme etkinliği 174.07 ppm ile *Stenotrophomonas* sp B3.7 izolatı tarafından gösterilmiş olup, bu izolatı 167.41 ppm ile bir diğer *Stenotrophomonas* sp K19.3 izolatı ile *Arthrobacter oxydans* N13.11 izolatları, 139.91 ppm ile *Acinetobacter calcoaceticus* K20.1, 134.24 ppm ile *Bacillus altitudinis* A5.3 izolatları takip etmiştir. Bu izolatlar arasında üretim değeri açısından istatistiksel farklılıklar bulunmaktadır (Çizelge 4.8). İzolatlar arasında en düşük amonyak üretimi 55.6 ppm konsantrasyonu ile *Pseudomonas rhodesiae* N24.3 izolatı tarafından üretilmiştir. Çalışmamızda yüksek düzeylerde amonyak üreten *Stenotrophomonas* sp, *Arthrobacter oxydans*, *Acinetobacter calcoaceticus* ve *Bacillus altitudinis* gibi farklı türlere ait antagonistik potansiyele sahip izolatların amonyak ürettiği son yıllarda yapılmış birçok çalışmalarda bildirilmiştir (Aktan, 2018).

4.7.4. EB İzolatlarının Indol Asetik Asit (IAA) Üretme Potansiyellerinin Belirlenmesi

EB izolatlarının IAA üretme potansiyelleri L-tryptophane içeren LB sıvı besi yerinde belirlenmiş, elde edilen sonuçlar Çizelge 4.9.’da verilmiştir. Test edilen tüm izolatlar besi yeri içerisinde 161.39-41.34 ppm arasında değişen konsantrasyonlarda IAA üretmişlerdir. İzolatlar arasında *Pseudomonas gessardii* N35.1 ve *Pseudomonas brenneri* E6.5 izolatları 161.39 ppm ile en yüksek konsantrasyonda IAA üreten EB izolatları olurken, bu izolatları sırasıyla 160.44 *Achromobacter spanius* N1.2 izolatı ve 155.79 ppm ile *Bacillus licheniformis* N1.1 izolatları takip etmişlerdir. Farklı türlere ait izolatlar arasındaki farkın istatistiksel olarak önemsiz seviyede olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.9). Aynı türe ait izolatlar arasında çok yakın benzerlikler olabildiği gibi (E16.1 ve E16.2) oldukça önemli farklılıklar da olabildiği (B3.7 ve B6.6) gözlenmiştir (Çizelge 4.9).

Çizelge 4.9. Farklı türlere ait EB izolatlarının IAA üretim miktarları (ppm)

Bakteri İzolatı	IAA Üretimi ^a	Bakteri İzolatı	IAA Üretimi ^a
<i>Pseudomonas gessardii</i> N35.1	161.39 ^a	<i>Arthrobacter nicotinovorans</i> N3.1	103.87 ^{i-m}
<i>Pseudomonas brenneri</i> E6.5	161.39 ^a	<i>Stenotrophomonas sp</i> B6.6	102.05 ^{j-m}
<i>Achromobacter spanius</i> N1.2	160.44 ^{a-b}	<i>Arthrobacter ilicis</i> N11.3	101.75 ^{j-n}
<i>Bacillus licheniformis</i> N1.1	155.79 ^{a-c}	<i>Lelliottia amnigena</i> E6.1	100.66 ^{k-n}
<i>Bacillus altitudinis</i> A5.3	148.03 ^{a-d}	<i>Acinetobacter johnsonii</i> E17.2	93.64 ^{l-o}
<i>Arthrobacter gandavensis</i> N19.1	148.03 ^{a-d}	<i>Arthrobacter oxydans</i> N13.11	92.11 ^{l-p}
<i>Stenotrophomonas sp</i> B3.7	147.15 ^{a-d}	<i>Bacillus megaterium</i> E19.7	89.47 ^{m-q}
<i>Pseudomonas putida</i> K15.1	145.4 ^{a-e}	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> N21.5	89.47 ^{m-q}
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> E1.4	145.04 ^{a-e}	<i>Bacillus licheniformis</i> K1.1	88.52 ^{m-r}
<i>Microbacterium maritipicum</i> K15.2	138.76 ^{b-f}	<i>Rhizobium radiobacter</i> N15.1	80.04 ^{n-s}
<i>Microbacterium hydrocarbonoxydans</i> K18.1	137.01 ^{c-f}	<i>Arthrobacter woluwensis</i> N26.1	75.74 ^{o-s}
<i>Stenotrophomonas sp</i> K19.3	135.4 ^{c-f}	<i>Arthrobacter aurescens</i> E20.1	75 ^{o-s}
<i>Bacillus altitudinis</i> E15.5	133.14 ^{d-g}	<i>Pseudomonas rhodesiae</i> N24.3	75 ^{o-s}
<i>Bacillus simplex</i> E20.6	132.34 ^{d-g}	<i>Bacillus pumilus</i> N26.2	74.26 ^{o-s}
<i>Bacillus thuringiensis</i> N36.1	132.34 ^{d-g}	<i>Pseudomonas brassicacearum</i> N16.1	73.04 ^{o-s}
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> K20.1	131.53 ^{d-g}	<i>Exiguobacterium sp.</i> N16.2	71.81 ^{o-s}
<i>Serratia liquefaciens</i> N34.1	131.39 ^{d-g}	<i>Microbacterium maritipicum</i> N28.3	70.83 ^{p-s}
<i>Stenotrophomonas sp</i> E13.1	131.09 ^{d-g}	<i>Bacillus siralis</i> N29.2	69.61 ^{q-s}
<i>Microbacterium phyllosphaerae</i> K21.1	129.2 ^{d-g}	<i>Arthrobacter histidinovorans</i> N25.2	69.52 ^{q-s}
<i>Bacillus simplex</i> E2.7	128.69 ^{d-g}	<i>Bacillus cereus</i> N17.1	69.12 ^{q-s}
<i>Arthrobacter gandavensis</i> E16.2	126.28 ^{d-h}	<i>Bacillus simplex</i> K8.2	68.35 ^{q-s}
<i>Rhizobium radiobacter</i> K25.1	124.53 ^{e-i}	<i>Achromobacter spanius</i> B1.1	67.69 ^{q-s}
<i>Arthrobacter gandavensis</i> E16.1	123.68 ^{e-j}	<i>Micrococcus luteus</i> N31.3	67.4 ^{rs}
<i>Enterobacter cloacae</i> B9.1	118.35 ^{f-k}	<i>Microbacterium phyllosphaerae</i> N3.2	65.69 ^s
<i>Serratia plymuthica</i> B13.1	117.32 ^{f-k}	<i>Bacillus endophyticus</i> N17.2	62.25 st
<i>Arthrobacter nicotinovorans</i> B11.2	112.79 ^{g-l}	<i>Pseudomonas extremorientalis</i> K13.2	61.68 st
<i>Rhizobium radiobacter</i> E13.5	112.35 ^{g-l}	<i>Bacillus cereus</i> N7.1	60.78 st
<i>Pseudomonas brenneri</i> E9.6	105.41 ^{h-m}	<i>Rhizobium radiobacter</i> E22.5	41.34 ^t

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

Aktan (2018) tarafından yapılan endofit-epifit bakterilerin bazı fungal patojenlere karşı *in vitro* antagonistik etkinliklerinin araştırıldığı yüksek lisans tez çalışması kapsamında, endofit-epifit bakteri izolatların ürettiği IAA konsantrasyon değerleri incelendiğinde, gram negatif bakteri türlerinin gram pozitif bakterilere oranla daha

yüksek IAA ürettiği belirlenmiştir (Aktan, 2018). Saini ve ark. (2017) yapmış oldukları çalışmada çalışmamızda da en yüksek IAA üreten izolat olan *Ochrobactrum intermedium*'un ürettiği yüksek siderofor, amonyak, IAA konsantrasyonu ve fosfat çözme etkinliği nedenleri ile mung fasulyesinde önemli düzeyde verim artışına neden olduğunu bildirmişlerdir.

Üretim oranlarına bakıldığında en yüksek antagonistik indeks değerini veren izolatımız *Pseudomonas gessardii* N35.1 izolatı şaşırtıcı bir biçimde IAA üretimi sıralamasında en başarılı izolat olmuştur. Floresan *Pseudomonad*'ların IAA üretimi konusunda pek çok çalışma yapılmış ve bu çalışmalarda farklı *Pseudomonas* türlerinin farklı değerlerde IAA üreterek (Ahmad ve ark., 2005; Khare et. al., 2010; Malik ve ark., 2011) bazen hastalık gelişimi için bitkiyi duyarlı hale getirdiklerini, bazen de bitkinin gelişimini teşvik ederek hastalık etmenlerine daha duyarlı ve hassas olduğu erken dönemleri daha hızlı atlatmasını sağlayarak dolaylı bir şekilde bitkileri hastalık etmenlerinden koruduğu bilinmektedir. Çalışmamızda elde etmiş olduğumuz *Pseudomonas gessardii* izolatı bu yönü ile büyük önem taşımaktadır.

4.7.5. EB İzolatlarının Fosforu (P) Çözme Potansiyellerinin Belirlenmesi

EB izolatlarının kolonisi etrafında ürettirmiş oldukları enzimler sayesinde trikalsiyum fosforun çözülmesiyle şeffaf bir engelleme zonu meydana gelmiştir (Şekil 4.14). Bakteri izolatların fosforu çözme etkinlikleri PVK besiyeri üzerinde oluşturdukları zon çapının bakteri kolonisinin çapına oranlanması ile elde edilen indeks değerine (F-indeks) göre değerlendirilmiş olup elde edilen sonuçlar Çizelge 4.10.'da verilmiştir.

Çizelge 4.10.'da da görüldüğü gibi, test edilen toplam 56 endofit izolat arasından sadece 12 izolat PVK besiyerinde fosforu çözme etkinliği göstermiş geriye kalan 44 endofit izolat fosforu çözme etkinliği göstermemiştir. Etkinlik gösteren 12 izolat içerisinde *Acinetobacter calcoaceticus* E1.4 izolatı 2.63 çözünürlük indeks değeri ile fosforu çözmede en etkili izolat olmuştur. Bu izolatı sırası 2.5 indeks değeri ile *Arthrobacter oxydans* N13.11, 2.43 indeks değeri ile *Microbacterium maritopicum* K15.2 ve 2.25 indeks değeri ile *Serratia liquefaciens* N34.1 izolatları izlemiştir (Çizelge 4.10).

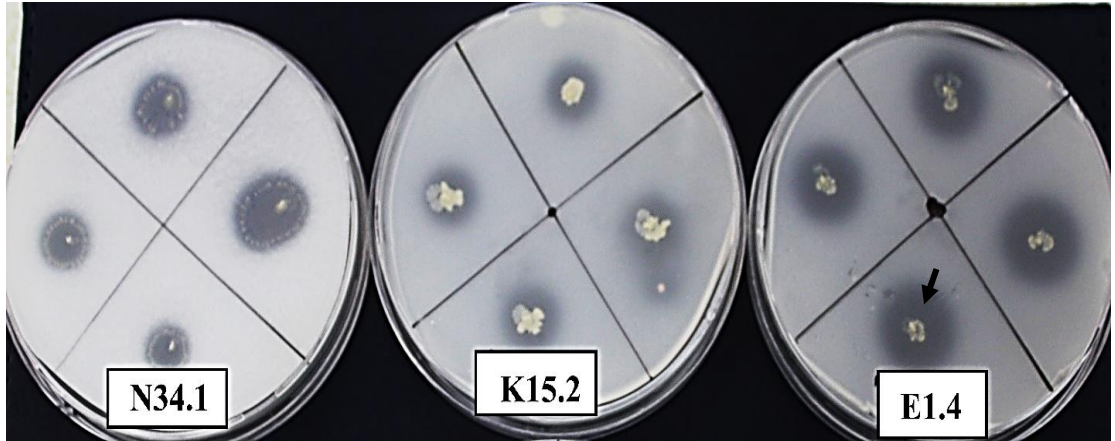
Fosforu çözme etkinliği gösteren 12 izolat arasında *Bacillus thuringiensis* N36.1 izolatı dışında genelde izolatların *Psp*'ye karşı yüksek düzeyde *in vitro* antagonistik

etkinlik gösterdiği (1.89 ile 3.27 arasında değişen indeks değerleri ile), *Pseudomonas gessardii* N35.1, *Arthrobacter ilicis* N11.3, *Stenotrophomonas sp.* B6.6 ve *Achromobacter spanius* B1.1 gibi yüksek düzeyde antagonistik etkinlik göstermiş olan izolatların (Çizelge 4.5) ise söz konusu fosforu çözme aktivitesi göstermediği belirlenmiştir (Çizelge 4.10).

İzolatların etkinlikleri tür bazında incelendiğinde, *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Serratia*, *Stenotrophomonas* gibi cinslere ait aynı türlerin fosforu çözme etkinlikleri arasında diğer *in vitro* etkinliklerde olduğu gibi önemli farklılıklar belirlenmiştir. En yüksek çözünürlük indeksine sahip *Acinetobacter calcoaceticus* E1.4 izolatının aksine aynı türe ait bir diğer izolat K20.1 fosforu çözmede etkinlik göstermemiştir.

Yapılan pek çok çalışmada *Acinetobacter* cinsine ait bakterilerin doğal toprak düzenleyici ve fosfat çözücü bakterileri olduğu ortaya konmuştur. Bu bakterilerin doğal yaşam alanları da genellikle meşe ormanları ve fosfat kayaçlarınca zengin bölgeler olduğu ortaya çıkmaktadır (Ohtake ve ark., 1985; Srivastava ve ark., 2006; Kang ve ark., 2009). Çalışmalarımızda yer alan biri Konya (K20.1) diğeri Eskişehir (E1.4) den izole edilmiş olan iki farklı *Acinetobacter calcoaceticus* izolatı gerek bitki gelişimini teşvik edici mekanizmaların kullanımı, gerekse de antagonistik mekanizmaların kullanımı açısından büyük karakteristik farklılıklar göstermiştir.

Çalışmalarımızda ön plana çıkan bir diğer EB ise Niğde ilinden izole edilen *Arthrobacter oxydans* N13.11 izolatı olmuştur. *Arthrobacter* spp ait izolatların gerek toprakta gerek bitki bünyesinde varlıkları ve biyo-çeşitlilikleri ile en fazla karşımıza çıkan bakteriyel mikroorganizmalardır. Bu bakteriler genelde doğal afetler ve yangınlar sonrasında ortaya çıkarak doğayı onarıcı ve yeniden yapıcı bir etki göstermektedirler (Busse ve ark. 2014; Fernández-González ve ark. 2017). Bu nedenle bu bakterilerin bitki bünyesinde veya rizosferinde bulunmaları, bitkilerin doğal olarak karşı karşıya kalabilecekleri her türlü beklenmedik olumsuz durumlara karşı hazırlıklı olmalarını sağlayacaktır. Çalışmalarımızda elde etmiş olduğumuz diğer *Arthrobacter* türleri de göze alındığında *Arthrobacter* lerin bitkilere ve bitkilerin karşı karşıya kaldıkları biyotik-abiyotik stres etmenlerine karşı gözardı edilemeyecek bir miktarda pozitif katkısı olduğu görülmektedir.



Şekil 4.14. EB izolatlarının PVK besiyeri üzerinde fosfor çözme (ok) potansiyellerinin belirlenmesi

Çizelge 4.10. Farklı türlere ait EB izolatların fosfor çözme etkinliğinin belirlenmesi

Bakteri İzolatı	Fosfor İndeksi ^a	Bakteri İzolatı	Fosfor İndeksi ^a
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> E1.4	2.63 ^a	<i>Bacillus cereus</i> N7.1	0 ^f
<i>Arthrobacter oxydans</i> N13.11	2.50 ^{ab}	<i>Rhizobium radiobacter</i> E22.5	0 ^f
<i>Microbacterium maritypicum</i> K15.2	2.43 ^{ab}	<i>Pseudomonas brenneri</i> E6.5	0 ^f
<i>Serratia liquefaciens</i> N34.1	2.25 ^{a-c}	<i>Pseudomonas gessardii</i> N35.1	0 ^f
<i>Bacillus licheniformis</i> K1.1	2.12 ^{b-d}	<i>Achromobacter spanius</i> N1.2	0 ^f
<i>Pseudomonas brassicacearum</i> N16.1	2.06 ^{b-d}	<i>Bacillus licheniformis</i> N1.1	0 ^f
<i>Bacillus siralis</i> N29.2	1.88 ^{cd}	<i>Stenotrophomonas</i> sp B3.7	0 ^f
<i>Bacillus thuringiensis</i> N36.1	1.79 ^{c-e}	<i>Pseudomonas putida</i> K15.1	0 ^f
<i>Micrococcus luteus</i> N31.3	1.75 ^{de}	<i>Microbacterium hydrocarbonoxydans</i> K18.1	0 ^f
<i>Bacillus pumilus</i> N26.2	1.74 ^{de}	<i>Stenotrophomonas</i> sp K19.3	0 ^f
<i>Arthrobacter gandavensis</i> N19.1	1.73 ^{de}	<i>Bacillus altitudinis</i> E15.5	0 ^f
<i>Bacillus altitudinis</i> A5.3	1.34 ^e	<i>Bacillus simplex</i> E20.6	0 ^f
<i>Acinetobacter johnsonii</i> E17.2	0 ^f	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> K20.1	0 ^f
<i>Bacillus megaterium</i> E19.7	0 ^f	<i>Stenotrophomonas</i> sp E13.1	0 ^f
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> N21.5	0 ^f	<i>Microbacterium phyllosphaerae</i> K21.1	0 ^f

Çizelge 4.10. (Devam) Farklı türlere ait EB izolatların fosforu çözme etkinliğinin belirlenmesi

Bakteri İzolatı	Fosfor İndeksi ^a	Bakteri İzolatı	Fosfor İndeksi ^a
<i>Rhizobium radiobacter</i> N15.1	0 ^f	<i>Bacillus simplex</i> E2.7	0 ^f
<i>Arthrobacter woluwensis</i> N26.1	0 ^f	<i>Arthrobacter gandavensis</i> E16.2	0 ^f
<i>Arthrobacter aureescens</i> E20.1	0 ^f	<i>Rhizobium radiobacter</i> K25.1	0 ^f
<i>Pseudomonas rhodesiae</i> N24.3	0 ^f	<i>Arthrobacter gandavensis</i> E16.1	0 ^f
<i>Exiguobacterium</i> sp. N16.2	0 ^f	<i>Enterobacter cloacae</i> B9.1	0 ^f
<i>Microbacterium maritipicum</i> N28.3	0 ^f	<i>Serratia plymuthica</i> B13.1	0 ^f
<i>Arthrobacter histidinovorans</i> N25.2	0 ^f	<i>Arthrobacter nicotinovorans</i> B11.2	0 ^f
<i>Bacillus cereus</i> N17.1	0 ^f	<i>Rhizobium radiobacter</i> E13.5	0 ^f
<i>Bacillus simplex</i> K8.2	0 ^f	<i>Pseudomonas brenneri</i> E9.6	0 ^f
<i>Achromobacter spanius</i> B1.1	0 ^f	<i>Arthrobacter nicotinovorans</i> N3.1	0 ^f
<i>Microbacterium phyllosphaerae</i> N3.2	0 ^f	<i>Stenotrophomonas</i> sp B6.6	0 ^f
<i>Bacillus endophyticus</i> N17.2	0 ^f	<i>Arthrobacter ilicis</i> N11.3	0 ^f
<i>Pseudomonas extremorientalis</i> K13.2	0 ^f	<i>Lelliottia amnigena</i> E6.1	0 ^f

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

Çalışmamızda izole edilen farklı türlere ait EB izolatlarının hastalık etmenlerini engellemede kullandıkları biyokontrol ve bitki gelişimini teşvik eden mekanizmalarına yönelik *in vitro* test sonuçlarının tamamı Çizelge 4.11’de genel bir tablo halinde verilmiştir. Elde edilen veriler birlikte değerlendirildiğinde, genellikle hastalık etmeni *Psp*’ya karşı yüksek engelleme etkinliğine sahip olan izolatların değişen oranlarda siderofor, proteaz ve amonyak gibi antagonistik mekanizmalarından bir veya birkaçını kullanmak suretiyle antagonisitlik etkinlik gösterdiği belirlenmiştir.

En yüksek oranda antagonisitlik etkinlik gösteren izolatların tamamı yüksek oranlarda antimikrobiyal etkinlik mekanizmalarından olan siderofor ve uçucu amonyak üretme etkinliği gösterirken, *Pseudomonas gessardi* N35.1 ve *Stenotrophomonas* sp. B6.6 izolatları bu mekanizmalara ilave olarak bir diğer antagonistik mekanizma olan proteaz enzimi üretme potansiyeline sahip olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.11).

Yüksek düzeyde antagonistik etkinlik gösteren izolatlardan olan *Arthrobacter gandavensis* N19.1, *Bacillus altitudinis* A5.3, *Acinetobacter calcoaceticus* E1.4, *Arthrobacter oxydans* N13.11 ve *Pseudomonas brassicacearum* N16.1 izolatları *in vitro*

koşullarda bitki gelişimini teşvik eden mekanizmalarının tamamını üreten izolatlar olarak belirlenmiştir.

Arthrobacter oxydans N13.11, *Micrococcus luteus* N31.3, *Microbacterium maritypicum* K15.2 ve *Serratia liquefaciens* N34.1 izolatları ise yapılan tüm çalışmalar sonunda antagonistik ve bitki gelişimini teşvik edici tüm özelliklerde başarılı sonuç veren izolatlar olmuştur.

Çalışmada genel olarak, antagonistik ve bitki gelişimini teşvik eden mekanizmalarının karakterize edildiği tüm *in vitro* testlerde aynı türe ait izolatların etkinliklerinde istatistiksel açıdan farklılık bulunduğu tespit edilmiştir. Bu farklılığın söz konusu bakteriyel mikrobiyomların genetik çeşitliliğinin yanısıra, bakterinin elde edildiği bitki türü ve organları, izolatın bitkide bulunduğu bölge (epifit/endofit), konukçusunun yetiştiği toprağın fiziksel ve kimyasal yapısı, bitkinin yetiştirildiği alanlarda sulama gübreleme gibi kültürel faaliyetlerdeki farklılıklar gibi birçok faktörün rol oynadığı yapılan önceki çalışmalarda da bildirilmiştir (Loper ve Schroth 1986; Krebs ve ark., 1993; Bernal ve ark., 2002; Araujo ve ark., 2005; Aktan, 2018; Emdirme, 2019).

Çizelge 4.11. EB izolatların, patojeni engellemede kullandıkları biyokontrol (antagonistik engelleme, siderofor, proteaz, amonyak) ve bitki gelişimini teşvik eden (IAA ve fosfat çözünürlük) mekanizmalar

İzolat	Ant-indeks	S-indeks	Pro-indeks	Amon-Üretimi (ppm)	IAA-Üretimi (ppm)	F-indeks
<i>Pseudomonas gessardii</i> N35.1	4.85 ^a	5.83 ^a	1.32 ^{jk}	64.55 ^{m-p}	161.39 ^a	0 ^f
<i>Arthrobacter ilicis</i> N11.3	4.23 ^{a-b}	1.69 ^{g-k}	0 ^l	126.06 ^{c-f}	101.75 ^{j-n}	0 ^f
<i>Stenotrophomonas sp</i> B6.6	4.01 ^{b-c}	2.19 ^{e-j}	1.96 ^{e-g}	97.58 ^{e-m}	102.05 ^{j-m}	0 ^f
<i>Achromobacter spanius</i> B1.1	3.57 ^{b-d}	1.77 ^{f-k}	0 ^l	91.82 ^{g-o}	67.69 ^{q-s}	0 ^f
<i>Pseudomonas putida</i> K15.1	3.56 ^{b-d}	1.67 ^{g-k}	0 ^l	113.94 ^{c-h}	145.4 ^{a-e}	0 ^f
<i>Arthrobacter gandavensis</i> N19.1	3.27 ^{c-e}	1.76 ^{f-k}	0 ^l	68.52 ^{l-p}	148.03 ^{a-d}	1.73 ^{de}
<i>Stenotrophomonas sp</i> E13.1	3.25 ^{d-e}	2.93 ^{b-e}	0 ^l	123.64 ^{c-g}	131.09 ^{d-g}	0 ^f
<i>Exiguobacterium sp.</i> N16.2	3.18 ^{d-f}	2.71 ^{c-g}	0 ^l	68.18 ^{l-p}	71.81 ^{o-s}	0 ^f
<i>Bacillus altitudinis</i> A5.3	3.14 ^{d-f}	1.34 ^{i-k}	0 ^l	134.24 ^{cd}	148.03 ^{a-d}	1.34 ^e
<i>Pseudomonas brenneri</i> E9.6	3.13 ^{d-f}	3.42 ^{bc}	3.09 ^{cd}	108.18 ^{c-j}	105.41 ^{h-m}	0 ^f
<i>Bacillus simplex</i> E2.7	3.11 ^{d-f}	1.33 ^{i-k}	0 ^l	95.15 ^{f-n}	128.69 ^{d-g}	0 ^f
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> E1.4	3.08 ^{d-g}	1.32 ^{i-k}	0 ^l	118.79 ^{c-g}	145.04 ^{a-e}	2.63 ^a
<i>Arthrobacter oxydans</i> N13.11	3.07 ^{d-g}	1.53 ^{h-k}	1.88 ^{e-h}	167.41 ^{ab}	92.11 ^{l-p}	2.50 ^{ab}
<i>Pseudomonas brassicacearum</i> N16.1	3.05 ^{d-g}	1.09 ^k	0 ^l	96.36 ^{e-n}	73.04 ^{o-s}	2.06 ^{b-d}
<i>Micrococcus luteus</i> N31.3	2.90 ^{d-h}	2.08 ^{e-k}	1.38 ^{i-k}	85.19 ^{h-p}	67.4 ^{rs}	1.75 ^{de}
<i>Microbacterium maritopicum</i> K15.2	2.88 ^{d-h}	2.25 ^{e-j}	4.10 ^b	121.82 ^{c-g}	138.76 ^{b-f}	2.43 ^{ab}
<i>Pseudomonas brenneri</i> E6.5	2.84 ^{d-h}	1.64 ^{g-k}	0 ^l	96.67 ^{e-n}	161.39 ^a	0 ^f
<i>Acinetobacter johnsonii</i> E17.2	2.79 ^{e-i}	1.91 ^{e-k}	1.22 ^k	77.58 ^{i-p}	93.64 ^{l-o}	0 ^f
<i>Stenotrophomonas sp</i> K19.3	2.77 ^{e-i}	2.80 ^{b-f}	3.30 ^{cd}	167.41 ^{ab}	135.4 ^{c-f}	0 ^f
<i>Arthrobacter nicotinovorans</i> B11.2	2.68 ^{e-j}	3.38 ^{b-d}	0 ^l	96.67 ^{e-n}	112.79 ^{g-l}	0 ^f
<i>Microbacterium hydrocarbonoxydans</i> K18.1	2.52 ^{e-k}	1.65 ^{g-k}	0 ^l	126.06 ^{c-f}	137.01 ^{c-f}	0 ^f

Çizelge 4.11. (Devam) EB izolatların, patojeni engellemede kullandıkları biyokontrol (antagonistik engelleme, siderofor, proteaz, amonyak) ve bitki gelişimini teşvik eden (IAA ve fosfat çözünürlük) mekanizmalar

İzolat	Ant-indeks	S-indeks	Pro-indeks	Amon-Üretimi (ppm)	IAA-Üretimi (ppm)	F-indeks
<i>Bacillus altitudinis</i> E15.5	2.49 ^{f-l}	2.01 ^{e-k}	0.0 ^l	95.45 ^{f-n}	133.14 ^{d-g}	0.0 ^f
<i>Pseudomonas extremorientalis</i> K13.2	2.45 ^{f-m}	2.96 ^{b-e}	2.12 ^{ef}	107.88 ^{c-j}	61.68 st	0.0 ^f
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> N21.5	2.33 ^{g-n}	0.0 ^l	0.0 ^l	103.64 ^{d-k}	89.47 ^{m-q}	0.0 ^f
<i>Bacillus cereus</i> N17.1	2.28 ^{h-n}	1.68 ^{g-k}	1.67 ^{f-k}	81.02 ^{h-p}	69.52 ^{q-s}	0.0 ^f
<i>Arthrobacter histidinovorans</i> N25.2	2.28 ^{h-n}	0.00 ^l	0.0 ^l	81.52 ^{h-p}	69.12 ^{q-s}	0.0 ^f
<i>Lelliottia amnigena</i> E6.1	2.26 ^{h-o}	2.26 ^{e-j}	0.0 ^l	109.39 ^{c-i}	100.66 ^{k-n}	0.0 ^f
<i>Arthrobacter woluwensis</i> N26.1	2.24 ^{h-o}	1.27 ^{i-k}	0.0 ^l	84.26 ^{h-p}	75.74 ^{o-s}	0.0 ^f
<i>Arthrobacter nicotinovorans</i> N3.1	2.22 ^{h-o}	1.97 ^{e-k}	1.67 ^{f-k}	107.88 ^{c-j}	103.87 ^{i-m}	0.0 ^f
<i>Arthrobacter gandavensis</i> E16.1	2.07 ^{i-p}	1.68 ^{g-k}	0 ^l	61.11 ^{op}	129.2 ^{d-g}	0.0 ^f
<i>Microbacterium phyllosphaerae</i> K21.1	2.07 ^{i-p}	1.93 ^{e-k}	4.69 ^a	110.91 ^{c-h}	123.68 ^{e-j}	0.0 ^f
<i>Bacillus licheniformis</i> K1.1	2.06 ^{i-p}	1.96 ^{e-k}	0.0 ^l	95.45 ^{f-n}	88.52 ^{m-r}	2.12 ^{b-d}
<i>Bacillus simplex</i> K8.2	2.06 ^{i-p}	1.73 ^{f-k}	0.0 ^l	105.45 ^{d-j}	68.35 ^{q-s}	0.0 ^f
<i>Arthrobacter gandavensis</i> E16.2	2.04 ^{i-p}	2.02 ^{e-k}	1.60 ^{g-k}	81.52 ^{h-p}	126.28 ^{d-h}	0.0 ^f
<i>Pseudomonas rhodesiae</i> N24.3	1.98 ^{j-q}	1.23 ^{jk}	1.83 ^{f-i}	55.56 ^p	75.0 ^{o-s}	0.0 ^f
<i>Stenotrophomonas sp</i> B3.7	1.92 ^{k-q}	1.62 ^{h-k}	0.0 ^l	70.91 ^{k-p}	74.26 ^{o-s}	1.74 ^{de}
<i>Bacillus pumilus</i> N26.2	1.92 ^{k-q}	1.59 ^{h-k}	2.86 ^d	174.07 ^a	147.15 ^{a-d}	0.0 ^f
<i>Achromobacter spanius</i> N1.2	1.91 ^{k-q}	1.35 ^{i-k}	2.08 ^{ef}	77.27 ^{i-p}	131.39 ^{d-g}	2.25 ^{a-c}
<i>Serratia liquefaciens</i> N34.1	1.91 ^{k-q}	2.33 ^{d-i}	0.0 ^l	105.45 ^{d-j}	160.44 ^{a b}	0.0 ^f
<i>Bacillus siralis</i> N29.2	1.89 ^{k-q}	2.25 ^{e-j}	0.0 ^l	67.58 ^{l-p}	69.61 ^{q-s}	1.88 ^{cd}
<i>Microbacterium phyllosphaerae</i> N3.2	1.82 ^{k-q}	2.50 ^{c-h}	0.0 ^l	113.94 ^{c-h}	65.69 ^s	0.0 ^f

Çizelge 4.11. (Devam) EB izolatların, patojeni engellemede kullandıkları biyokontrol (antagonistik engelleme, siderofor, proteaz, amonyak) ve bitki gelişimini teşvik eden (IAA ve fosfat çözünürlük) mekanizmalar

İzolat	Ant-indeks	S-indeks	Pro-indeks	Amon-Üretimi (ppm)	IAA-Üretimi (ppm)	F-indeks
<i>Bacillus endophyticus</i> N17.2	1.77 ^{l-q}	1.53 ^{h-k}	0.0 ^l	68.18 ^{l-p}	62.25 st	0.0 ^f
<i>Rhizobium radiobacter</i> K25.1	1.76 ^{l-q}	1.65 ^{g-k}	0.0 ^l	71.00 ^{k-p}	124.53 ^{e-t}	0.0 ^f
<i>Enterobacter cloacae</i> B9.1	1.73 ^{m-q}	2.79 ^{c-f}	2.88 ^d	66.97 ^{l-p}	70.83 ^{p-s}	0.0 ^f
<i>Microbacterium maritipicum</i> N28.3	1.73 ^{m-q}	1.38 ^{l-k}	0.0 ^l	129.39 ^{c-e}	118.35 ^{f-k}	0.0 ^f
<i>Serratia plymuthica</i> B13.1	1.63 ^{n-q}	1.58 ^{h-k}	3.47 ^c	98.18 ^{e-l}	117.32 ^{f-k}	0.0 ^f
<i>Arthrobacter aurescens</i> E20.1	1.62 ^{n-q}	1.91 ^{e-k}	2.34 ^e	102.12 ^{d-k}	75.0 ^{o-s}	0.0 ^f
<i>Rhizobium radiobacter</i> E22.5	1.60 ^{n-q}	1.58 ^{h-k}	0.0 ^l	96.06 ^{f-n}	41.34 ^t	0.0 ^f
<i>Bacillus cereus</i> N7.1	1.59 ^{n-q}	3.88 ^b	0.0 ^l	121.82 ^{c-g}	60.78 st	0.0 ^f
<i>Rhizobium radiobacter</i> N15.1	1.58 ^{n-q}	1.36 ^{l-k}	0.0 ^l	63.89 ^{n-p}	80.04 ^{n-s}	0.0 ^f
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> K20.1	1.51 ^{o-q}	1.40 ^{l-k}	1.48 ^{h-k}	139.91 ^{bc}	131.53 ^{d-g}	0.0 ^f
<i>Rhizobium radiobacter</i> E13.5	1.39 ^{pq}	1.38 ^{l-k}	1.78 ^{f-j}	99.39 ^{e-l}	112.35 ^{g-l}	0.0 ^f
<i>Bacillus licheniformis</i> N1.1	1.35 ^{pq}	1.37 ^{l-k}	1.69 ^{f-j}	95.45 ^{f-n}	155.79 ^{a-c}	0.0 ^f
<i>Bacillus simplex</i> E20.6	1.33 ^{pq}	1.41 ^{l-k}	1.37 ^{l-k}	99.70 ^{e-l}	132.34 ^{d-g}	0.0 ^f
<i>Bacillus megaterium</i> E19.7	1.32 ^{pq}	1.58 ^{h-k}	0.0 ^l	75.46 ^{j-p}	89.47 ^{m-q}	0.0 ^f
<i>Bacillus thuringiensis</i> N36.1	1.22 ^q	1.21 ^{jk}	0.0 ^l	97.27 ^{e-m}	132.34 ^{d-g}	1.79 ^{c-e}

Ant-indeks: Antagonistik engelleme; **S-indeks:** Siderofor üretim indeksi; **Pro-indeks:** Proteaz üretim; **Amon-Üretim:** Amonyak üretim miktarı (ppm/24s); **IAA-Üretim:** Indol-3 Acetic Acid üretim miktarı (ppm/24s); **F- indeks:** Fosforu indirgeme indeksi

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

4.8. EB İzolatlarının *in vivo* Hastalık Çıkışı ve Bitki Gelişimine Etkilerinin Belirlenmesi

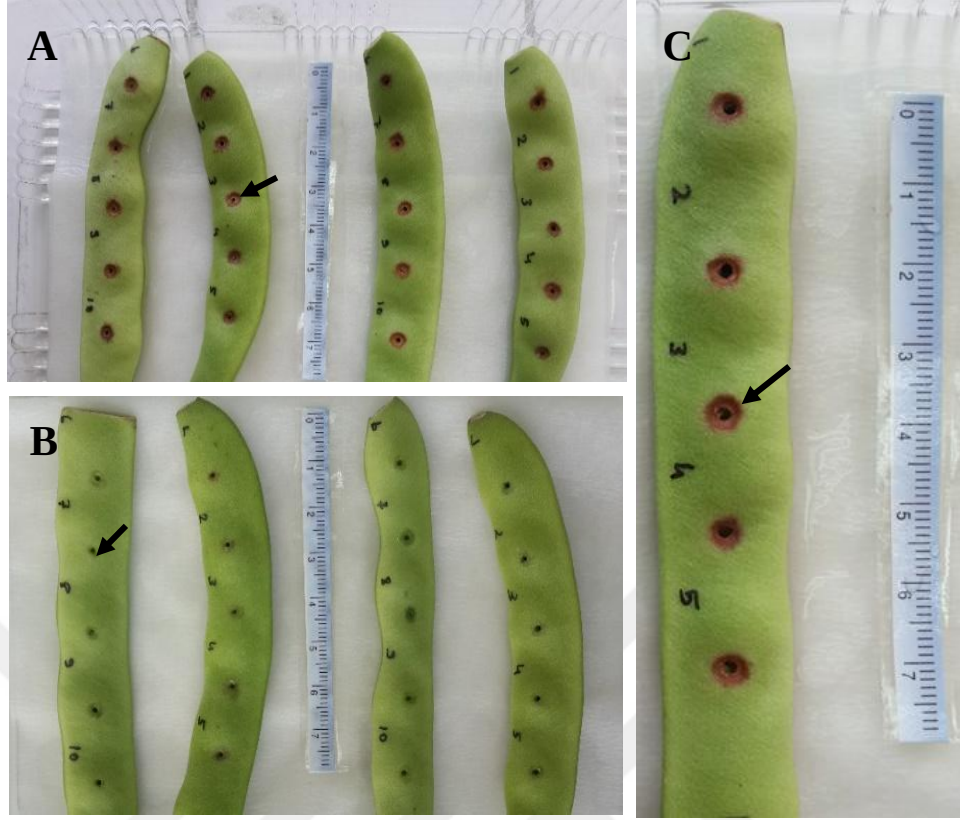
4.8.1. EB İzolatlarının Hastalık Çıkışını Engelleme Potansiyellerinin Belirlenmesi

EB izolatları ile yapılan *in vitro* antagonistik ve bitki gelişimini teşvik edici mekanizmaların belirlendiği çalışmalarda elde edilen tüm veriler (Çizelge 4.11) değerlendirilmiş ve toplam 32 adet EB izolat *in vivo* hastalık çıkışını engelleme ve bitki gelişimini teşvik etkinliğini belirleme çalışmalarında kullanılmak amacıyla seçilmiştir. EB izolatlarının *in vivo* koşullarda hastalık çıkışının engellenmesi üzerine olan etkinlikleri koparılmış fasulye meyveleri (Şekil 4.15 ve Şekil 4.16) üzerinde ve tohuma kaplamak suretiyle gerçek yapraklarına hastalık etmenin püskürtülmesi ile belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.12 ve Çizelge 4.13’de verilmiştir.

Yapılan çalışmalarda, EB izolatların uyarıcı (koruyucu) etkisinin belirlendiği çalışmada fasulye meyveleri üzerinde açılan inokulasyon noktalarına önce EB izolatları verildikten 24 saat sonra hastalık etmeni bulaştırılmıştır (Şekil 4.15). Sonuçta tüm izolatlar hastalık gelişiminin engellenmesi üzerinde %26.9-100 oranında etkilerde bulunmuştur.

İzolatlar arasında *Pseudomonas gessardii* N35.1, *Arthrobacter nicotinovorans* B11.2, *Stenotrophomonas sp* B6.6, *Arthrobacter ilicis* N11.3, *Achromobacter spanius* B1.1 ve *Pseudomonas putida* K15.1 izolatları inokulasyon noktalarında bulunan dokuları nekrotize ederek inokulasyon noktalarının kahverengileşmesine (HR) neden olmak suretiyle ıslaklık belirtisi oluşumunu tamamen (%100) engel olmuştur (Çizelge 4.12, Şekil 4.15A). İzolatlar arasında istatistiksel olarak önemli farklılıklar gözlenmiş olup, hastalık çıkışını en az engelleyen EB izolatı %29 engelleme oranı ile *Achromobacter spanius* N1.2 olmuştur.

Söz konusu reaksiyon yerlerinde dayanıklılığın uyarılması sonucunda kahverengi nekrotik doku ölümleri şeklinde ortaya çıkan belirtilere benzer belirtilerde yüksek düzeyde antibakteriyel etkinliğe sahip fitoaleksinin faseolin (phaseolin) birikiminin olduğu Bozkurt ve Soylu (2011) tarafından yapılmış farklı *Psp* ırkı/dayanıklı fasulye çeşit reaksiyonlarının belirlendiği çalışmada bildirilmiştir.



Şekil 4.15. EB izolatlarının koparılmış fasulye meyveleri üzerinde hastalık çıkışını engelleme potansiyelleri. (A ve B) Meyve üzerinde açılan noktalara önce EB izolatlarının sonra *Psp* etmeninin uygulanması. (C) Hastalığın tamamen engellendiği inokulasyon noktalarında EB izolatlarının teşvik ettiği HR reaksiyonları (ok)



Şekil 4.16. EB izolatlarının koparılmış fasulye meyveleri üzerinde hastalık çıkışını engelleme potansiyelleri. Meyve üzerinde açılan noktalara (ok) farklı önce *Psp* etmeninin sonra EB izolatlarının uygulanması.

Çizelge 4.12. EB izolatlarının yarı *in vivo* koşullarda koparılmış fasulye meyveleri üzerinde hastalık çıkışını engelleme etkinliklerinin belirlenmesi

İzolat	EB+Psp		Psp+EB	
	LÇ (mm)	Engelleme (%)	LÇ (mm)	Engelleme (%)
<i>Pseudomonas gessardii</i> N35.1	0.0 ^l	100.0	0.0 ^m	100.0
<i>Arthrobacter ilicis</i> N11.3				
<i>Stenotrophomonas</i> sp B6.6	0.0 ^l	100.0	0.0 ^m	100.0
<i>Achromobacter spanius</i> B1.1	0.0 ^l	100.0	0.0 ^m	100.0
<i>Arthrobacter nicotinovorans</i> B11.2	0.0 ^l	100.0	0.0 ^m	100.0
<i>Pseudomonas putida</i> K15.1	0.0 ^l	100.0	1.7 ^l	81.7
<i>Stenotrophomonas</i> sp E13.1	1.9 ^k	80.0	1.9 ^{kl}	79.6
<i>Arthrobacter gandavensis</i> N19.1	1.9 ^k	80.0	0 ^m	100.0
<i>Exiguobacterium</i> sp. N16.2	2.3 ^{jk}	75.0	2.3 ^{j-l}	75.3
<i>Bacillus altitudinis</i> A5.3	2.4 ^{i-k}	74.0	2.6 ^{i-l}	72.0
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> E1.4	2.6 ^{i-k}	72.0	2.6 ^{i-l}	72.0
<i>Pseudomonas brenneri</i> E9.6	2.6 ^{i-k}	72.0	2.6 ^{i-l}	72.0
<i>Arthrobacter oxydans</i> N13.11	2.7 ^{h-k}	71.0	2.6 ^{i-l}	72.0
<i>Pseudomonas brassicacearum</i> N16.1	2.8 ^{h-k}	70.0	2.6 ^{i-l}	72.0
<i>Bacillus altitudinis</i> E15.5	3.0 ^{g-k}	68.0	2.8 ^{h-l}	69.9
<i>Microbacterium maritopicum</i> K15.2	3.3 ^{g-k}	65.0	3.3 ^{g-l}	64.5
<i>Micrococcus luteus</i> N31.3	3.3 ^{g-k}	65.0	3.4 ^{g-k}	63.4
<i>Microbacterium maritopicum</i> N28.3	3.4 ^{g-j}	63.0	3.4 ^{g-k}	63.4
<i>Acinetobacter johnsonii</i> E6.5	3.6 ^{f-j}	61.0	3.8 ^{f-j}	59.1
<i>Pseudomonas brenneri</i> E17.2	3.6 ^{f-j}	61.0	3.6 ^{g-j}	61.3
<i>Stenotrophomonas</i> sp K19.3	3.8 ^{e-i}	59.0	3.8 ^{f-j}	59.1
<i>Pseudomonas extremorientalis</i> K13.2	4.1 ^{e-h}	56.0	4.2 ^{f-i}	54.8
<i>Bacillus cereus</i> N17.1	4.4 ^{d-g}	53.0	4.4 ^{e-h}	52.7
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> N21.5	4.4 ^{d-g}	53.0	4.1 ^{f-i}	55.9
<i>Lelliottia amnigena</i> E6.1	4.9 ^{c-f}	47.0	4.9 ^{d-g}	47.3
<i>Arthrobacter gandavensis</i> E16.1	5.2 ^{b-e}	44.0	5.9 ^{b-e}	36.6
<i>Bacillus simplex</i> K8.2	5.7 ^{b-d}	39.0	5.4 ^{c-f}	41.9
<i>Bacillus licheniformis</i> K1.1	5.8 ^{b-d}	38.0	6.7 ^{bc}	28.0
<i>Arthrobacter gandavensis</i> E16.2	5.9 ^{bc}	37.0	6.3 ^{b-d}	32.3
<i>Microbacterium phyllosphaerae</i> N3.2	6.2 ^{bc}	33.0	6.2 ^{b-d}	33.3
<i>Achromobacter spanius</i> N1.2	6.6 ^b	29.0	7.4 ^b	20.4
<i>P. s. pv. phaseolicola</i> PC	9.3 ^a	0.0	9.3 ^a	0.0

LÇ: Lezyon Çapı (ıslaklık) (mm)

* Hastalık şiddeti 0.0 olarak belirlenmiş inokulasyon noktalarında tipik hastalık belirtisi görülmemiş, EB izolatı dayanıklılığı uyararak bitki dokularında aşırı duyarlılığı neden olmuş, bu noktalarda nekrotik belirtiler oluşmuştur. İnokulasyon yapılan bölgeden alınan doku kesitleri KB besiyerine ekildiğinde *Psp* gelişmemiştir.

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

EB izolatları fasulye meyvelerinde hastalık çıkışı üzerine tedavi edici özelliği açısından da incelenmiş, %100 koruyucu etkinliği sahip olan *Pseudomonas gessardii* N35.1, *Arthrobacter ilicis* N11.3, *Stenotrophomonas sp.* B6.6, *Achromobacter spanius* B1.1, *Arthrobacter nicotinovorans* B11.2, izolatları aynı zamanda %100 tedavi edici özelliğinede sahip olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.12, Şekil 4.16). Bu izolatların yanısıra *Arthrobacter gandavensis* N19.1 izolatıda hastalık çıkışını %100 engellemiştir. Aynı türe ait farklı izolatların diğer testlerde olduğu gibi koruyucu ve tedavi edici etkinlikleri açısından istatistiksel olarak önemli farklılıklar gözlenmiştir. En düşük tedavi edici etkinlik %20.4-36.6 engelleme oranları ile *Achromobacter spanius* N1.2, *Arthrobacter gandavensis* E16.1, *Bacillus simplex* K8.2, *Bacillus licheniformis* K1.1, *Arthrobacter gandavensis* E16.2 ve *Microbacterium phyllosphaerae* N3.2 izolatları tarafından gösterilmiştir.

Yarı *in vivo* etkinlik çalışmalarında gerek tedavi edici gerekse koruyucu etkinliği yüksek olan izolatların *in vitro* antagonistik etkinlik indeks değerlerinin oldukça yüksek olması *in vitro* ve yarı *in vivo* deneme sonuçlarının birbirlerini desteklediğini göstermiştir.

Saksı Denemeleri

Koparılmış meyve testinden sonra test edilen endofit izolatların *in vivo* hastalık çıkışını engelleme etkinlikleri saksı denemeleri ile bitki yaprakları üzerinde de araştırılmıştır (Şekil 4.17). Saksı denemeleri Bozkurt (2009) tarafından belirlenen yöntem ve kullanılan skala modifiye edilerek gerçekleştirilmiştir. Tüm uygulamalar sonucunda elde edilen sonuçlar Çizelge 4.13 de verilmiştir.



Şekil 4.17. Tohum EB ile kaplaması sonrası yapraktan *Psp* uygulaması, bulaştırılan bitkilerin nem çemberinde bekletilmesi ve denemelerin değerlendirilmesi .

EB izolatları ile kaplanmış bitkilerden gelişen yapraklara patojenin püskürtüldüğü uygulamalarda, EB izolatlarının hastalık çıkışını engelleme etkinlikleri çok düşük düzeylerde (%10.2 ile %36.7 engelleme oranları arasında) gerçekleşmiştir (Çizelge 4.13). Hastalık çıkışının engellenmesinde en yüksek etkinlik %36.7 engelleme oranı ile *Pseudomonas gessardii* N35.1 izolatı tarafından gösterilmiş olup (Şekil 4.18B), bu izolatı %35.4 engelleme oranı ile *Arthrobacter ilicis* N11.3, %32.7 engelleme oranı ile *Stenotrophomonas sp.* B6.6, %30.6 engelleme oranı ile *Achromobacter spanius* B1.1 izolatları izlemiştir. En düşük etkinlik ise %10.2 engelleme oranı ile *Microbacterium maritypicum* E14.6 izolatı tarafından gösterilmiştir. En yüksek etkinlik gösteren izolatla düşük etkinlik gösteren izolatlar arasında istatistiksel olarak çok önemli farklılıklar gözlenmemiştir.

Çizelge 4.13. Bitki yapraklarında EB izolatlarının yapraklarda hastalık çıkışını engelleme potansiyellerinin belirlenmesi^a. Uygulamalar; **a)** tohumun EB ile kaplamasının ardından yapraktan *Psp* uygulaması (TEB+*Psp*), **b)** Tohumun EB ile kaplaması sonrası yapraktan önce *Psp* etmeni ardından EB uygulaması (TEB+*Psp*+YEB), **c)** Yapraktan önce EB ardından *Psp* uygulanması (YEB+*Psp*), **d)** Yapraktan önce *Psp* ardından yaprağa EB uygulanması (*Psp*+YEB) şeklinde düzenlenmiştir

Bakteri Türü	TEB+ <i>Psp</i>	%HE	TEB+ <i>Psp</i> +YEB	%HE	YEB+ <i>Psp</i>	%HE	<i>Psp</i> +YEB	%HE
<i>Pseudomonas gessardii</i> N35.1	4.65 ^g	36.7	2.7 ^h	63.0	3.35 ^e	54.4	3.55 ^f	51.7
<i>Arthrobacter ilicis</i> N11.3	4.75 ^{e-g}	35.4	2.9 ^{gh}	61.0	3.6 ^{de}	51.0	3.8 ^{ef}	48.3
<i>Achromobacter spanius</i> B1.1	5.1 ^{c-g}	30.6	3 ^{f-h}	59.0	3.6 ^{de}	51.0	4.05 ^{c-f}	44.9
<i>Stenotrophomonas sp</i> B6.6	4.95 ^{d-g}	32.7	3 ^{f-h}	59.0	3.6 ^{de}	51.0	3.85 ^{d-f}	47.6
<i>Pseudomonas putida</i> K15.1	5.3 ^{c-g}	27.9	3.1 ^{e-h}	58.0	3.7 ^{c-e}	49.7	4.3 ^{b-f}	41.5
<i>Stenotrophomonas sp</i> E13.1	5.1 ^{c-g}	30.6	3.1 ^{e-h}	58.0	3.65 ^{c-e}	50.3	4.05 ^{c-f}	44.9
<i>Arthrobacter gandavensis</i> N19.1	5.35 ^{b-g}	27.2	3.1 ^{e-h}	58.0	3.75 ^{b-e}	49.0	4.3 ^{b-f}	41.5
<i>Exiguobacterium sp.</i> N16.2	5.25 ^{c-g}	28.6	3.1 ^{e-h}	58.0	3.65 ^{c-e}	50.3	4.2 ^{c-f}	42.9
<i>Bacillus altitudinis</i> A5.3	5.4 ^{b-g}	26.5	3.2 ^{d-h}	56.0	3.75 ^{b-e}	49.0	4.35 ^{b-f}	40.8
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> E1.4	5.45 ^{b-g}	25.9	3.2 ^{d-h}	56.0	3.8 ^{b-e}	48.3	4.35 ^{b-f}	40.8
<i>Pseudomonas brenneri</i> E9.6	5.45 ^{b-g}	25.9	3.2 ^{d-h}	56.0	3.75 ^{b-e}	49.0	4.35 ^{b-f}	40.8
<i>Arthrobacter oxydans</i> N13.11	5.55 ^{b-g}	24.5	3.3 ^{c-h}	55.0	3.9 ^{b-e}	46.9	4.55 ^{b-f}	38.1
<i>Pseudomonas brassicacearum</i> N16.1	5.5 ^{b-g}	25.2	3.3 ^{c-h}	55.0	3.85 ^{b-e}	47.6	4.4 ^{b-f}	40.1
<i>Microbacterium maritipicum</i> K15.2	5.5 ^{b-g}	25.2	3.3 ^{c-h}	55.0	3.85 ^{b-e}	47.6	4.45 ^{b-f}	39.5
<i>Micrococcus luteus</i> N31.3	5.55 ^{b-g}	24.5	3.3 ^{c-h}	55.0	3.9 ^{b-e}	46.9	4.5 ^{b-f}	38.8
<i>Arthrobacter nicotinovorans</i> B11.2	5.7 ^{b-g}	22.4	3.4 ^{c-h}	54.0	3.95 ^{b-e}	46.3	4.7 ^{b-f}	36.1
<i>Pseudomonas brenneri</i> E6.5	5.7 ^{b-g}	22.4	3.4 ^{c-h}	54.0	3.95 ^{b-e}	46.3	4.55 ^{b-f}	38.1
<i>Acinetobacter johnsonii</i> E17.2	5.65 ^{b-g}	23.1	3.4 ^{c-h}	54.0	3.95 ^{b-e}	46.3	4.55 ^{b-f}	38.1
<i>Stenotrophomonas sp</i> K19.3	5.7 ^{b-g}	22.4	3.4 ^{c-h}	54.0	3.95 ^{b-e}	46.3	4.7 ^{b-f}	36.1
<i>Bacillus altitudinis</i> E15.5	5.85 ^{b-g}	20.4	3.5 ^{b-h}	52.0	4.15 ^{b-e}	43.5	4.7 ^{b-f}	36.1

Çizelge 4.13. (Devam) Bitki yapraklarında EB izolatlarının yapraklarda hastalık çıkışını engelleme potansiyellerinin belirlenmesi^a. Uygulamalar; **a)** tohumun EB ile kaplamasının ardından yapraktan *Psp* uygulaması (TEB+*Psp*), **b)** Tohumun EB ile kaplaması sonrası yapraktan önce *Psp* etmeni

ardından EB uygulaması (TEB+Psp+YEB), **c)** Yapraktan önce EB ardından Psp uygulanması (YEB+Psp), **d)** Yapraktan önce Psp ardından yaprağa EB uygulanması (Psp+YEB) şeklinde düzenlenmiştir

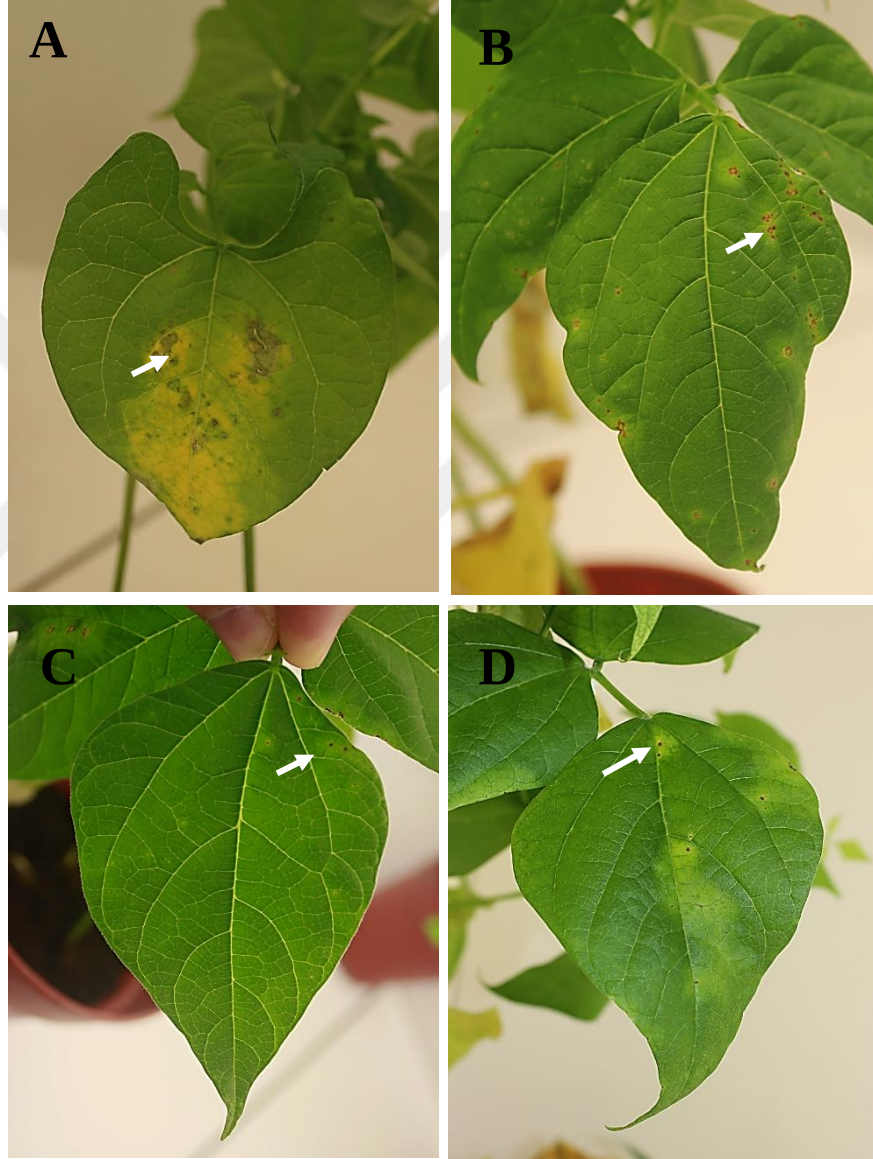
Bakteri Türü	TEB+Psp	%HE	TEB+Psp+YEB	%HE	YEB+Psp	%HE	Psp+YEB	%HE
<i>Microbacterium hydrocarbonoxydans</i> K18.1	5.85 ^{b-g}	20.4	3.5 ^{b-h}	52.0	4 ^{b-e}	45.6	4.7 ^{b-f}	36.1
<i>Pseudomonas extremorientalis</i> K13.2	5.9 ^{b-g}	19.7	3.6 ^{b-h}	51.0	4.15 ^{b-e}	43.5	4.7 ^{b-f}	36.1
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> N21.5	5.9 ^{b-g}	19.7	3.6 ^{b-h}	51.0	4.2 ^{b-e}	42.9	4.8 ^{b-f}	34.7
<i>Bacillus cereus</i> N17.1	5.9 ^{b-g}	19.7	3.8 ^{b-h}	48.0	4.25 ^{b-e}	42.2	4.8 ^{b-f}	34.7
<i>Lelliottia amnigena</i> E6.1	5.95 ^{b-f}	19.0	4 ^{b-g}	46.0	4.4 ^{b-e}	40.1	4.9 ^{b-f}	33.3
<i>Arthrobacter gandavensis</i> E16.1	6 ^{b-e}	18.4	4.1 ^{b-g}	44.0	4.5 ^{b-e}	38.8	4.9 ^{b-f}	33.3
<i>Bacillus licheniformis</i> K1.1	6 ^{b-e}	18.4	4.1 ^{b-g}	44.0	4.55 ^{b-d}	38.1	5.05 ^{b-e}	31.3
<i>Bacillus simplex</i> K8.2	6.15 ^{a-d}	16.3	4.2 ^{b-f}	43.0	4.75 ^{b-d}	35.4	5.2 ^{b-d}	29.3
<i>Arthrobacter gandavensis</i> E16.2	6 ^{b-e}	18.4	4.2 ^{b-f}	43.0	4.55 ^{b-d}	38.1	5.15 ^{b-e}	29.9
<i>Achromobacter spanius</i> N1.2	6.35 ^{a-c}	13.6	4.3 ^{b-e}	41.0	4.8 ^{bc}	34.7	5.3 ^{bc}	27.9
<i>Microbacterium phyllosphaerae</i> N3.2	6.35 ^{a-c}	13.6	4.4 ^{b-d}	40.0	4.8 ^{bc}	34.7	5.3 ^{bc}	27.9
<i>Microbacterium maritypicum</i> N28.3	6.6 ^{ab}	10.2	4.5 ^{bc}	39.0	4.9 ^b	33.3	5.6 ^b	23.8
SUNCOP	4.7 ^{fg}	36.1	4.7 ^b	36.1	4.7 ^{b-d}	36.1	4.7 ^{b-f}	36.1
<i>P. s. pv. phaseolicola</i> PC	7.35 ^a	0.0	7.35 ^a	0.0	7.35 ^a	0.0	7.35 ^a	0.0

^a Yapraklarda oluşan hastalık belirtileri inokulasyondan 21 gün sonra 0-9 skalasına göre değerlendirilmiştir (Bozkurt, 2009 modifiye)

TEB: Tohumun EB ile kaplanması; **Psp:** Yaprğa *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* püskürtülmesi; **YEB:** Yaprğa EB guskürtülmesi; **%HE:** Hastalık çıkışının Engelleme Oranı (%)

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

Endofitle kaplı tohumdan çıkan yapraklara önce patojen daha sonra EB izolatu uygulanan yapraklarda hastalık çıkışı ise *Pseudomonas gessardii* N35.1 izolatu tarafından %63.0 gibi yüksek oranda engellenmiştir (Şekil 4.18C). Hastalık çıkışını engelleyen izolatların etkinliği karşılaştırıldığında birçok izolat arasında istatistiksel farklılık gözlenmezken, en düşük etkinlik %39.0 etkinlik ile *Microbacterium maritopicum* E14.6 izolatu tarafından gösterilmiştir (Çizelge 4.13).



Şekil 4.18. Farklı EB uygulamalarının bitki yapraklarında hastalık çıkışı (ok) üzerine olan etkinliği.

EB kaplaması yapılmadan ekilen tohumlardan çıkan yapraklara önce EB izolatı sonra patojen püskürtülmüş bitkilerin yapraklarında hastalık çıkışı %33.3 ile %54.4 oranları arasında engellenmiştir (Çizelge 4.13). Bu tür uygulamada hastalık çıkışı en etkili antagonist izolat olan *Pseudomonas gessardii* N35.1 izolatı tarafından %54.4 gibi yüksek oranda engellenmiştir (Şekil 4.18D). Tohum kaplaması yapılmadan ekilmiş tohumlardan çıkan yapraklara önce patojen sonra EB izolatı püskürtülmüş bitkilerin yapraklarında hastalık çıkışı %23.8 ile %51.7 oranları arasında engellenmiştir. Bu uygulama şeklinde de en yüksek antagonistik etkinlik %51.7 engelleme oranı ile *Pseudomonas gessardii* N35.1 izolatı tarafından, en düşük etkinlik %23.8 etkinlik ile *Microbacterium maritypicum* E14.6 izolatı tarafından gösterilmiştir (Çizelge 4.13).

In vivo saksı deneme sonuçları birlikte değerlendirildiğinde; en etkili uygulamanın tohuma kaplama şeklinde EB uygulaması sonrasında, bu tohumlardan gelişen bitki yapraklarına aynı izolatın bir kez daha püskürtülmesi şeklindeki uygulama olmuş, hastalık çıkışı bu tip uygulamada önemli düzeyde engellendiği belirlenmiştir. İzolatlar arasında önemli farklılıkların gözlenmediği, kontrol ile kıyaslandığında hastalık çıkışını en yüksek oranda engelleyen izolatın %63.0 lük engelleme oranı ile *Pseudomonas gessardii* N35.1, %61.0 engelleme oranı ile *Arthrobacter ilicis* N11.3 ve %59.0 engelleme oranı ile *Stenotrophomonas sp* B6.6 ve *Achromobacter spanius* B1.1 izolatları olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.13).

4.8.2. EB İzolatların *in vivo* Bitki Gelişimine Etkileri

EB izolatların *in vivo* hastalık çıkışını engelleme etkinliklerinin belirlendiği çalışmalarda kullanılan izolatlar tohuma kaplama şeklinde uygulanıp, steril torf-toprak karışımına ekimi yapıldıktan sonra 28 gün gelişmeye bırakılmış ve bitki gelişimi (toplam bitki uzunluğu, kök, gövde uzunlukları ve bitki yaş ağırlığı) üzerine olan etkileri değerlendirilmiştir (Şekil 4.19, Şekil 4.20 ve Çizelge 4.14).



Şekil 4.19. Tohuma EB kaplamasının bitki gelişimi üzerine olan etkinliği

Elde edilen sonuçlara bakıldığında bitki gelişimini en çok teşvik eden 54.8 cm bitki boyu ve 39.8 g bitki yaş ağırlığı ile *Stenotrophomonas sp.* E13.1 izolatı olurken, bu izolatı 48.4 cm bitki boyu 41,4 g bitki ağırlığı ile *Pseudomonas gessardii* N35.1, 47,7 cm bitki boyu 36,05 g bitki ağırlığı ile *Arthrobacter nicotinovorans* B11.2 izolatları takip etmiştir (Şekil 4.20). Bu 3 izolat arasında istatistiksel farklılık görülmemiştir. Söz konusu 3 izolatın aynı zamanda yüksek düzeyde IAA ürettiği (Çizelge 4.9) belirlenmiş olup (izolatlar sırasıyla 131.09, 161.39 ve 112.79 ppm IAA üretilmiş), bu izolatların fosforu çözme etkinliğinin olmadığı belirlenmiştir (Çizelge 4.10).



Şekil 4.20. Farklı EBler ile kaplanan (A) ve kaplanmayan (B) tohumlardan gelişen bitkiler

Çizelge 4.14. Tohuma kaplama şeklinde uygulanmış EB izolatların bitki gelişimine (kök, gövde, toplam bitki uzunluğu ve bitki yaş ağırlığı) olan etkileri

İzolat	Bitki Boy. (cm)	Kök Uz. (cm)	Gövde Uz. (cm)	Yaş Bitki Ağırlığı (g)
<i>Stenotrophomonas sp</i> E13.1	54.8 ^a	14.8 ^{c-f}	40 ^a	39.8 ^{ab}
<i>Pseudomonas gessardii</i> N35.1	48.4 ^{ab}	24.4 ^a	24 ^{e-k}	41.4 ^a
<i>Arthrobacter nicotinovorans</i> B11.2	47.7 ^{a-c}	14.4 ^{c-f}	33.3 ^b	36.05 ^{a-c}
<i>Bacillus simplex</i> K8.2	44.8 ^{b-d}	12 ^{e-h}	32.8 ^{bc}	33.4 ^{c-g}
<i>Bacillus cereus</i> N17.1	44.5 ^{b-e}	12 ^{e-h}	32.5 ^{b-d}	33.25 ^{c-g}
<i>Achromobacter spanius</i> N1.2	43.0 ^{b-e}	16.8 ^{bc}	26.2 ^{e-l}	34.9 ^{b-e}
<i>Bacillus altitudinis</i> E15.5	42.4 ^{b-f}	14.8 ^{c-f}	27.6 ^{c-f}	33.6 ^{c-f}

Çizelge 4.14. (Devam) Tohuma kaplama şeklinde uygulanmış EB izolatların bitki gelişimine (kök, gövde, toplam bitki uzunluğu ve bitki yaş ağırlığı) olan etkileri

İzolat	Bitki Boy. (cm)	Kök Uz. (cm)	Gövde Uz. (cm)	Yaş Bitki Ağırlığı (g)
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> E1.4	42.3 ^{b-f}	15.2 ^{c-f}	27.1 ^{d-g}	33.75 ^{c-e}
<i>Pseudomonas putida</i> K15.1	42.2 ^{b-f}	15.4 ^{c-f}	26.8 ^{e-h}	33.8 ^{c-e}
<i>Arthrobacter gandavensis</i> N19.1	41.7 ^{b-g}	16.6 ^{b-d}	25.1 ^{e-j}	34.15 ^{b-e}
<i>Microbacterium hydrocarbonoxydans</i> K18.1	41.6 ^{b-g}	15 ^{c-f}	26.6 ^{e-i}	33.3 ^{c-g}
<i>Microbacterium maritropicum</i> K15.2	41.4 ^{b-g}	15 ^{c-f}	26.4 ^{e-i}	33.2 ^{c-g}
<i>Pseudomonas brenneri</i> E6.5	41.1 ^{b-g}	19.7 ^b	21.4 ^{h-l}	35.4 ^{b-d}
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> N21.5	40.8 ^{c-g}	13 ^{c-h}	27.8 ^{c-f}	31.9 ^{c-h}
<i>Stenotrophomonas sp</i> B6.6	40.2 ^{c-g}	13.8 ^{c-g}	26.4 ^{e-i}	32 ^{c-g}
<i>Microbacterium maritropicum</i> N28.3	40.2 ^{c-g}	12.1 ^{e-h}	28.1 ^{b-e}	31.15 ^{c-i}
<i>Arthrobacter gandavensis</i> E16.1	40.0 ^{d-g}	14.4 ^{c-f}	25.6 ^{e-i}	32.2 ^{c-g}
<i>Stenotrophomonas sp</i> K19.3	39.9 ^{d-g}	14.9 ^{c-f}	25 ^{e-j}	32.4 ^{c-g}
<i>Acinetobacter johnsonii</i> E17.2	38.4 ^{d-g}	13.2 ^{c-h}	25.2 ^{e-j}	30.8 ^{c-i}
<i>Lelliottia amnigena</i> E6.1	38.4 ^{d-g}	13.6 ^{c-g}	24.8 ^{e-j}	31 ^{c-i}
<i>Pseudomonas brenneri</i> E9.6	38.0 ^{d-h}	14 ^{c-g}	24 ^{e-k}	31 ^{c-i}
<i>Bacillus licheniformis</i> K1.1	37.9 ^{d-h}	12.6 ^{d-h}	25.3 ^{e-i}	30.25 ^{d-i}
<i>Bacillus altitudinis</i> A5.3	37.4 ^{d-i}	15.6 ^{b-e}	21.8 ^{g-l}	31.5 ^{c-i}
<i>Arthrobacter oxydans</i> N13.11	37.2 ^{e-i}	13.2 ^{c-h}	24 ^{e-k}	30.2 ^{d-i}
<i>Exiguobacterium sp.</i> N16.2	37.0 ^{e-i}	12.2 ^{e-h}	24.8 ^{e-j}	29.6 ^{e-j}
<i>Microbacterium phyllosphaerae</i> N3.2	35.4 ^{f-i}	10.2 ^{gh}	25.2 ^{e-j}	27.8 ^{g-j}
<i>Arthrobacter ilicis</i> N11.3	35.2 ^{f-i}	13.8 ^{c-g}	21.4 ^{h-l}	29.5 ^{e-j}
<i>Arthrobacter gandavensis</i> E16.2	34.6 ^{g-i}	14.8 ^{c-f}	19.8 ^{j-l}	29.7 ^{e-i}
<i>Achromobacter spanius</i> B1.1	34.2 ^{g-i}	11.8 ^{e-h}	22.4 ^{e-l}	28 ^{f-j}
<i>Pseudomonas extremorientalis</i> K13.2	30.5 ^{hi}	9.2 ^h	21.3 ^{i-l}	24.35 ^j
<i>Micrococcus luteus</i> N31.3	30.5 ^{hi}	11.3 ^{f-h}	19.2 ^{kl}	25.9 ^{ij}
<i>Pseudomonas brassicacearum</i> N16.1	30.0 ⁱ	12.5 ^{d-h}	17.5 ^l	26.25 ^{h-j}
Negatif Kontrol	37.7 ^{d-h}	13.4 ^{c-g}	24.3 ^{e-k}	30.55 ^{c-i}

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

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L) ve baklagiller (*Leguminosae*) artan Dünya nüfusu ve küresel ısınma nedeni ile karşılaşılan kuraklık sorunları nedeni ile gelecekte karşı karşıya kalacağımız açlık ve beslenme sorunlarının aşılabilmesi için büyük önem taşımaktadır. Gerek içermiş olduğu yüksek protein ve lif oranı, gerekse de karbohidrat ve şeker ihtivasının yüksek olması fasulye bitkisini diğer sebze ve endüstri bitkilerinin önüne çıkarmaktadır.

Fasulye üretim alanlarında sıklıkla görülen ve neredeyse tüm fasulye alanlarında karşımıza çıkabilecek olan bakteriyel hastalıkların başında Hale Yanıklığı Hastalığı ve etmeni *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (Burk) Young, Dye and Wilkie (*Psp*) gelmektedir. Ülkemizde ve dünyada fasulye üretimi yapılan tüm alanlarda hızla yayılan bu etmen kullanılan tohumluğun kontrolsüz olması, yetiştiricilik esnasında bitki sağlığı kurallarına dikkat edilmemesi ve yetiştiricilik yapılan alanda münavebe yapılmaması nedeni ile hızla yayılmaya devam etmektedir.

Hale yanıklığı etmeni *Psp* bitkilere bulaştığında eğer erken dönemde ise bitkilerde hastalık belirtilerinin gözlenmesi ve erken mücadelesi çok zor nerede ise imkansızdır. Hastalık belirtilerinin ortaya çıkabilmesi için hava sıcaklığının ve bağıl nemin optimum seviyede olması gerekmektedir. Bu durum üretim alanlarında özellikle açık alanda yapılan üretimin erken dönemlerinde pek mümkün olmamaktadır. Hastalık etmenine dayanıklı çeşit kullanımına yönelik araştırmalar ise halen devam olup tamamen aşılamamış ve ticari olarak yetiştirilen çeşitlerin büyük bir çoğunluğu hastalık etmenine karşı hassas durumdadır.

Bakteriyel hastalıkların mücadelesine yönelik dünyada ve ülkemizde yapılan pek çok çalışma hastalığa dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesi ve bakteriyel hastalıklarla biyolojik mücadele olanaklarının araştırılması doğrultusunda gerçekleştirilmektedir. Bu bağlamda biyolojik mücadele etmenlerinin ön plana çıkarılması ve bu etmenlerin *in-vitro* ve *in-vivo* koşullarda etkinliklerinin belirlenerek üretici koşullarında uygulanabilir hale getirilmeleri büyük önem taşımaktadır.

Biyolojik mücadele çalışmaları incelendiğinde; yapılan çalışmaların ağırlıklı olarak fungal hastalıkların biyolojik mücadelesi ağırlıklı gerçekleştirildiğini, bakteriyel hastalıklarla mücadelenin ise çok sınırlı kaldığını görmekteyiz. Özellikle fasulye

hastalıklarının mücadelesinde ise bu durum dünyada ve ülkemizde ve gerçekleştirilen birkaç çalışma ile sınırlı kalmaktadır.

Hale yanıklığı etmeni *Psp* 'ye karşı gerçekleştirilen biyolojik mücadele çalışmaları ise bakteriyofaj kullanımı ile sınırlı kalmış devamı gelmemiştir. Bu açıdan doktora çalışması ve çalışma sonucunda elde edilecek veriler hastalık etmeninin biyolojik mücadelesinde köşetaşı olacak niteliktedir.

Bu çalışmada, Fasulye Hale Yanıklığı Hastalığı etmeni *Psp* ile kimyasal mücadeleye alternatif “biyolojik mücadele” imkânları araştırılmıştır. Bu kapsamda Ankara, Burdur, Eskişehir, Konya ve Niğde illerinin farklı ilçelerinde fasulye üretiminin yoğun olarak gerçekleştirildiği üretim alanlarından sağlıklı fasulye bitkilerinin farklı kısımlarından antagonist potansiyele sahip endofit bakteri türlerinin izolasyonu, tanısı ve hastalık *Psp* ya karşı *in vitro* ve *in vivo* koşullarda biyokontrol etkinliği araştırılmıştır. Hastalık etmenine karşı etkinliği araştırılan endofit bakteri izolatların hastalık etmenin gelişimini engellemede rol oynayan olası antagonistik etkinlik mekanizmalarının yanı sıra bitki gelişimini teşvik etmede rol oynayan mekanizmaları da karakterize edilmiştir.

Ankara, Burdur, Eskişehir, Konya ve Niğde illeri ve ilçelerinde gerçekleştirilen sörveylerde, sağlıklı fasulye bitkilerinin farklı aksamlarından (kök boğazı, gövde, yaprak ve meyve) 343 endofit bakteri izole edilmiştir. Yapılan değerlendirme sonucunda, izole edildiği şehir, bitki aksamı, morfolojik ve biyokimyasal açıdan benzerlik gösteren izolatlardan yapılan ön seçim neticesinde, 131 bakteri izolatı belirlenmiştir. Ön seçimi yapılan 131 bakteri ile yapılan MALDI-TOF analizleri sonucu tanılama indeks değeri 1.9 ve üzerinde olan toplam 56 izolat cins ve tür düzeyinde belirlenmiştir. Tür düzeyinde teşhisi yapılan 56 adet farklı izolat türleri ile çalışılmaya karar verilmiştir.

Elde edilen bakterilerin cins düzeyinde dağılımına bakıldığında, 15 izolat ile *Bacillus* spp. en fazla izole edilmiş cins olarak karşımıza çıkmaktadır. Bunu sırasıyla 10 izolat ile *Arthrobacter* cinsi, 7 izolat ile *Pseudomonas* cinsi, 5 izolat ile *Microbacterium* cinsi, 4 er izolat ile *Rhizobium* ve *Stenotrophomonas* cinsleri, 3 izolat ile *Acinetobacter* cinsi, 2 şer izolat ile *Achromobacter* ve *Serratia* cinsleri, 1 er izolat ile *Enterobacter*, *Lelliottia*, *Micrococcus* ve *Exiguobacterium* cinsleri takip etmişlerdir Tanısı yapılan izolatlar göz önüne alındığında, önceden yapılmış birçok biyolojik mücadele çalışmalarında elde edilen sonuçlara benzer şekilde *Pseudomonas* spp. ve *Bacillus* spp.

ait izolatlar dışında *Microbacterium*, *Stenotrophomonas*, *Acinetobacter* ve *Achromobacter* cinslerine ait pek çok bakteriyel izolat ile çalışılmıştır.

Endofit izolatların *in vitro* antagonisitik etkinliğine bakıldığında 56 izolat 4.85-1.22 arasında antagonisitik etkinlik indeks değerleri elde edilmiş ve izolatlar arasında değişken oranlarda engelleme etkinlikleri göstermişlerdir. Bu izolatların 32 tanesi Gram pozitif 24 tanesi Gram negatif özellik göstermiştir. İzolatların illere göre dağılımı ise Ankara 1 izolat, Burdur 6 izolat, Eskişehir 15 izolat, Konya 10 izolat ve Niğde 24 izolat ile karşımıza çıkmaktadır. Bu duruma göre Eskişehir ve Niğde illeri en çok endofit plant growth promoting bacteria (EB) izolatı elde edilen iller olmuştur. Tüm izolatlar farklı seviyelerde antagonistik-indeks değeri göstermişlerdir. Antagonistik etkinlik göstermeyen endofit bakteri izolatı olmamıştır.

İkili kültür testlerinde en yüksek antagonisitik etkinlik 4.85 antagonistik (engelleme) indeks değeri Niğde ilinden izole edilen *Pseudomonas gessardii* N35.1 izolatı tarafından gösterilmiş olup, bu izolatı sırası ile 4.23 indeks değeri ile *Arthrobacter ilicis* N11.3, 4.01 indeks değeri ile *Stenotrophomonas* sp. B6.6, 3.57 indeks değeri ile *Achromobacter spanius* B1.1, 5.56 indeks değeri ile *Pseudomonas putida* K15.1 ve 3.27 indeks değeri ile *Arthrobacter gandavensis* N19.1 izolatları takip etmiştir.

Test edilen antagonist EB izolatlar arasında yüksek düzeyde antagonistik etkinlik gösteren, *Pseudomonas gessardii*, *Arthrobacter ilicis*, *Stenotrophomonas* sp., *Achromobacter spanius*, *Pseudomonas putida* ve *Arthrobacter gandavensis* gibi antagonist bakteri izolatların fasulye Hale Yanıklığı hastalığı etmeni *Psp*'ye karşı antagonistik etkinliği ilk kez bu çalışma ile ortaya konulmuştur.

Gerek *in vitro* gerekse *in vivo* etkinlik çalışmalarında en etkili endofit bakteri izolatı olarak belirlenene *Pseudomonas gessardii* daha önceden *Pseudomonas* cinsinde bildirilen, bu türe ait izolatların farklı bitkilerde farklı hastalıklara karşı biyolojik etkinliklerine dair bildirimler olmuştur. Yapılan bu çalışma içerik olarak *Pseudomonas gessardii* ile ilgili yapılmış en kapsamlı çalışmadır. Çalışmalarımız esnasında gerek *in vitro* gerekse *in vivo* çalışmalarda etkinliği tespit edilen bir diğer tür ise *Arthrobacter ilicis* olmuştur.

Biyolojik mücadelede en etkili kriterlerden biri de antagonist bakterilerin siderofor üretmesidir. Kök bölgesindeki zararlı fungus ve bakteri populasyonlarında önemli ölçüde azalmalara neden olan faktörlerden biri olan siderofor üretimi, ortamda sınırlı oranda bulunan demir iyonları için mikroorganizmaların birbiri ile rekabete girmesinde önemli rol oynamaktadır. Endofit bakteriler içersinde en yüksek siderofor üretimi *Psp*'ye karşı antagonist etkinliği yüksek endofit izolatlar arasında yer almış türlerden 5.8 indeks değeri ile *Pseudomonas gessardii* N35.1 izolatı tarafından oluşturulmuş, bu izolatı 3.88 indeks değeri ile *Bacillus cereus* N7.1 izolatı, 3.42 indeks değeri ile *Pseudomonas brenneri* E9.6 izolatı takip etmiştir.

Bir diğer önemli antagonistik mekanizmalarından olan proteaz üretimi 56 endofit izolat arasından sadece 23 izolat tarafından oluşturulmuştur. Endofit izolatlar arasında *Arthrobacter gandavensis* E16.1 izolatı 4.69 indeks değeri ile en yüksek proteolitik aktivite (proteaz enzimi salgılayan) gösteren izolat olmuştur. Bu izolatı sırası ile *Microbacterium maritipicum* K15.2 izolatı 4.10 indeks değeri ile *Serratia plymuthica* B13.1 izolatı 3.47 indeks değeri ile *Stenotrophomonas* sp K19.3 izolatı 3.30 indeks değeri ile takip etmişlerdir. Diğer yandan bakterilerin büyük çoğunluğu amonyak üretmiş olmakla birlikte, antagonistik etkinliği yüksek izolatların daha yüksek konsantrasyonda amonyak ürettiği tespit edilmiştir.

Endofit bakteri izolatları antagonistik özelliklerinin yanısıra bitki gelişimini teşvik edici özellikleri IAA üretme ve fosforu çözme etkinlikleri yönüyle de araştırılmıştır. Çalışma sonuçlarına göre *Pseudomonas gessardii* N35.1 ve *Pseudomonas brenneri* E6.5 izolatları 161.39 ppm ile en yüksek konsantrasyonda IAA üreten EB izolatları olurken, bu izolatları sırasıyla 160.44 *Achromobacter spanius* N1.2 izolatı ve 155.79 ppm ile *Bacillus licheniformis* N1.1 izolatları takip etmişlerdir. Genelde yüksek düzeyde IAA üreten endofit izolatların benzer şekilde yüksek konsantrasyonda IAA de ürettiği belirlenmiştir.

Fosfor, alkali topraklarda kalsiyum, asidik topraklarda ise demir ve alüminyum tarafından bağlanmaktadır. Tohum ya da toprağa uygulanan fosfat çözebilen bakterilerin topraktaki çözünemez/bitki tarafından kullanılamaz durumda olan fosforu çözebildiği ve verim artışına neden olduğu bilinmektedir. Çalışmamızda kullandığımız EB bakterilerden 56 endofit izolat arasından sadece 12 izolat PVK besiyerinde fosforu çözme etkinliği göstermiş geriye kalan 44 endofit izolat fosforu çözme etkinliği göstermemiştir. Etkinlik

gösteren 12 izolat içerisinde *Acinetobacter calcoaceticus* E1.4 izolatı 2.63 çözünürlük indeks değeri ile fosforu çözmede en etkili izolat olmuştur. Bu izolatı sırası 2.5 indeks değeri ile *Arthrobacter oxydans* N13.11, 2.43 indeks değeri ile *Microbacterium maritypicum* K15.2 ve 2.25 indeks değeri ile *Serratia liquefaciens* N34.1 izolatları izlemiştir. Bu durum bitki gelişimini teşvik edici mekanizmalar arasında fosforu çözebilmenin ne kadar önemli ve gerekli bir husus olduğunu bir kez daha gözler önüne sermektedir. Fosforu çözme etkinliği gösteren 12 izolat arasında *Bacillus thuringiensis* N36.1 izolatı dışında genelde izolatların *Psp*'ye karşı yüksek düzeyde *in vitro* antagonistik etkinlik gösterdiği (1.89 ile 3.27 arasında değişen indeks değerleri ile), *Pseudomonas gessardii* N35.1, *Arthrobacter ilicis* N11.3, *Stenotrophomonas sp.* B6.6 ve *Achromobacter spanius* B1.1 gibi yüksek düzeyde antagonistik etkinlik göstermiş olan izolatların ise söz konusu fosforu çözme aktivitesi göstermediği belirlenmiştir. Farklı türlere ait bu izolatlar tarafından üretilen IAA miktarları istatistiksel olarak karşılaştırıldığında izolatlar arasındaki farkın istatistiksel olarak önemsiz seviyede olduğu belirlenmiştir. EB bakterilerin antimikrobiyal özelliklerinin yanı sıra bitki gelişimini teşvik edici özelliklerinin de olması, bunların sürdürülebilir tarım sistemlerinde kullanımını da sağlayacaktır.

EB izolatları fasulye meyvelerinde hastalık çıkışı üzerine tedavi edici özelliği açısından da incelenmiş, %100 koruyucu etkinliği sahip olan *Pseudomonas gessardii* N35.1, *Arthrobacter ilicis* N11.3, *Stenotrophomonas sp.* B6.6, *Achromobacter spanius* B1.1, *Arthrobacter nicotinovorans* B11.2, izolatları aynı zamanda %100 tedavi edici özelliğine de sahip olduğu belirlenmiştir. Bu izolatların yanısıra *Arthrobacter gandavensis* N19.1 izolatıda hastalık çıkışını %100 engellemiştir. Aynı türe ait farklı izolatların diğer testlerde olduğu gibi koruyucu ve tedavi edici etkinlikleri açısından istatistiksel olarak önemli farklılıklar gözlenmiştir. Yarı *in-vivo* testlerde *Pseudomonas gessardii* N35.1, *Arthrobacter nicotinovorans* B11.2, *Stenotrophomonas sp.* B6.6, *Arthrobacter ilicis* N11.3, *Achromobacter spanius* B1.1 ve *Pseudomonas putida* K15.1 izolatları inokulasyon noktalarında bulunan dokuları nekrotize ederek inokulasyon noktalarının kahverengileşmesine (HR) neden olmak suretiyle ıslaklık belirtisi oluşumuna tamamen (%100) engel olmuştur. EB bakterilerin konukçu bitkide patojene karşı ISR mekanizmalarını harekete geçirme özelliklerinin saptanmış olması bunların etki spektrumunun ve süresinin uzun olmasını sağlayabilir.

In vivo saksı deneme sonuçları birlikte değerlendirildiğinde; en etkili uygulamanın tohumla kaplama şeklinde EB uygulaması ve sonrasında, bu tohumlardan gelişen bitki yapraklarına aynı izolata bir kez daha püskürtülmesi şeklindeki uygulama olmuştur. İzolatlar arasında önemli farklılıkların gözlenmediği, kontrol ile kıyaslandığında hastalık çıkışını en yüksek oranda engelleyen izolata %63.0 ile *Pseudomonas gessardii* N35.1, %61.0 ile *Arthrobacter ilicis* N11.3 ve %59.0 ile *Stenotrophomonas sp* B6.6 ve *Achromobacter spanius* B1.1 izolatları olduğu belirlenmiştir.

Çalışmada elde edilen tüm sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde;

1. Bitki dokularında hastalık etmeni patojenlerle yakın temasta olan ve birbirleri ile çeşitli şekillerde etkileşime giren endofit bakteriler Psp karşı yüksek düzeyde antagonsitik etkinlik göstermiştir.
2. Etkinliği ortaya konulan bir çok türün Psp'ye karşı biyolojik mücadele etmeni olarak kullanılma potansiyeline sahip olduğu ilk kez bu çalışma ile ortaya konulmuştur.
3. Yüksek antagonistik etkinlik gösteren izolatların birden fazla antagonsitik etki mekanizmasına sahip olduğu, *Arthrobacter oxydans* N13.11, *Micrococcus luteus* N31.3, *Microbacterium maritopicum* K15.2 ve *Achromobacter spanius* N1.2 gibi bazı izolatların ise gerek antagonistik gerekse bitki gelişimini teşvik eden mekanizmaların tamamını kullanabildiği tespit edilmiştir.
4. Özellikle *Pseudomonas* spp ve *Bacillus* spp. ait izolatların diğer türlere kıyasla çok daha etkin olduğu, hastalık etmenlerin engellemesinde antagonistik ve bitki gelişimini teşvik eden etki mekanizmalarından bir veya birkaçını birden kullanmak suretiyle etkili olduğu belirlenmiştir. Antagonist izolatlar arasında yüksek düzeyde birden fazla antagonistik ve bitki gelişimini teşvik eden etki mekanizmalarını kullanan ve Psp gelişimini yüksek düzeyde engelleyen *Pseudomonas gessardii* N35.1, *Arthrobacter ilicis* N11.3, *Stenotrophomonas sp*, B6.6, *Achromobacter spanius* B1.1, *Arthrobacter nicotinovorans* B11.2 izolatların fasulye üretim alanlarında sorun olan tohum kökenli bakteriyel hastalıklara karşı sentetik kimyasallara alternatif olabilecek çevre dostu biyopreparat olarak hastalıkla mücadelede kullanılabilecek izolatlar olarak değerlendirilmiştir. Bu izolatların sahip oldukları birden fazla etki mekanizmaları sayesinde antimikrobiyal etkinlik göstermesi, söz konusu etmenin etkili olarak

değerlendirilen bu tip mücadele yöntemine karşı direnç geliştirmesinin önüne geçilebileceği belirtilebilir.

5. Söz konusu etkili izolatların farklı şekillerde uygulandıkları *in vivo* etkinlik çalışmalarındaki etkilerine göre endofit bakterilerin tohuma kaplama şeklinde uygulanmaların yanısıra hastalığın doğada çıkış yaptığı dönemde yapraktan yeniden uygulanması etkinliğini önemli düzeyde artırması nedeniyle söz konusu izolatların praparat haline getirilerek yaprağa püskürtme şeklinde uygulanması büyük önem arz etmektedir.

6. Aynı türe ait bakteri izolatlar arasında hastalık etmeninin antagonistik ve bitki gelişimini teşvik eden etkinlikleri arasındaki farklılıklar gözlenmiştir. Benzer şekilde izolatların *in vitro* koşullarda etmenin gelişiminin engellenmesinde gösterdikleri antagonistik etkinlik ile *in vivo* hastalık çıkışının engellenmesinde gösterdiği (biyokontrol) etkinlikler arasında her zaman benzerlik gözlenmemiştir. Bu durumun antagonist bakteri izolatların genetik çeşitliliği, izole edildikleri yer (epifitik veya endofit oluşu) ve bulundukları ortamdaki çevre koşullarının (yetiştigi ortamlardaki bitki besin madde içeriği ve hastalık etmenlerinin bulunuş durumu gibi) izolatların genetik çeşitliliğine etkide bulunmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

7. *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*'ya karşı *in vitro* ve *in vivo* antibakteriyel etkinliğin yanısıra bitki gelişimini teşvik edici etkinliğe sahip olan bakteriyel izolatların tekli ve/veya karışım halinde formülasyonlarının hazırlanarak farklı bakteriyel ve fungal hastalık etmenlere karşı *in vitro* ve *invivo* koşullarda denenmesi büyük önem arz etmektedir.

8. Yapılan bu çalışma ile elde edilen sonuçlar, fasulye Hale Yanıklığı hastalığı ile antagonist endofit bakteriler ile biyolojik mücadelenin etkili bir yöntem olduğu, kullanılan antagonist bakteri izolatlarının gerek biyokontrol gerekse bitki gelişimini teşvik edici etkide farklı etki mekanizmaları ile hastalık gelişimini engellediği gibi bitki gelişimini teşvik eden mekanizmalara sahip olmaları nedeni ile aynı zamanda birim alanda fasulye veriminde de artışa neden olabileceğini ortaya koymuştur.

KAYNAKLAR

- Abdel-Rahman, H.M., Salem, A.A., and Moustafa, M.M.A., 2017. A novice *Achromobacter* sp. EMCC1936 strain acts as a plant-growth-promoting agent. **Acta Physiol. Plant**, 39: 61
- Agarwal, V.K. and Sinclair, J. B., 1997. **Principles of Seed Pathology**, 2.ed. Boca Raton: CRC, 538p.
- Ağsakallı, A. ve Olgun, M., 2001. Kuru Fasulyede İklim, Hastalık ve Verim İlişkisi. **Anadolu, J. of AARI**, 11 (1): 80-90.
- Ahmad, F., Ahmad, I., Khan, M., 2005. Indole acetic acid production by the indigenous isolates of azotobacter and fluorescent pseudomonas in the presence and absence of tryptophan. **Turkish Journal of Biology**, 29 (1) : 29-34
- Akbaş, D., 2005. Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L) çeşitlerinde *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* ve *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*' ye dayanıklılığın belirlenmesi. **Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü**, Erzurum.
- Aktan, Z.C., 2018. Badem ağaçlarında sorun olan toprak kökenli fungal hastalık etmenlerine karşı antagonist ve bitki gelişimini teşvik eden bakterilerin *in vitro* etkinliklerinin belirlenmesi. **Yüksek lisans Tezi, Hatay Mustafa Kemal Üniv. Fen Bilimleri Ens. Bitki Koruma ABD**, 102 sayfa.
- Allen, R. G., Pereira, L. S., Raes, D., and Smith, M., 1998. Crop evapotranspiration guidelines for computing crop water requirements. **FAO Irrigation and drainage paper** 56. Food and Agriculture Organization, Rome.
- Anand, A.A., Vennison S.J., Sankar S.G., Prabhu, D.I.G., Vasan, P.T., Raghuraman, T., Geoffrey, C.J., and Vendan, S.E., 2010. Isolation and characterization of bacteria from the gut of *Bombyx mori* that degrade cellulose, xylan, pectin and starch and their impact on digestion. **J. Insect Sci.**, 10: article 107.
- Anonymous, 2017. <http://www.fao.org> (Erişim tarihi: 10.07.2019)
- Anonim, 2018. Bitkisel Üretim İstatistikleri", Kaynak: <http://biruni.tuik.gov.tr/bitkiselapp/bitkisel.zul> (Erişim Tarihi: 14.10.2019)
- Anonim, 2018. FAOSTAT, Word Production data, 2018. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> (Erişim Tarihi 02.04.2019)
- 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.
- Arora, P.K., Sharma A., Mehta R., Shenoy, D.B., Srivastava, A., and Singh, V.P., 2012. Metabolism of 4-chloro-2-nitrophenol in a gram-positive bacterium, *Exiguobacterium* sp. **PMA. Microb Cell Fact.**, 11: 150.
- Ashitha, A., Midhun, S.J., Sunil, M.A., Nithin, T.U., Radhakrishnan, E.K., Jyothis, M., 2019. Bacterial endophytes from *Artemisia nilagirica* (Clarke) Pamp., with

- antibacterial efficacy against human pathogens. **Microbial Pathogenesis**, 135: 103624,
- Aysan, Y., ve Çınar, Ö., 2002. Tohum kökenli *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*'ya karşı antagonistlerin etkisi. **Türkiye V. Biyolojik Mücadele Kongresi Bildirileri Kitabı**. 4-7 Eylül 2002, Erzurum. sayfa: 409-416.
- Balkaya, A., Yanmaz, R., Bozoglu, H., Gulumser, A., 1999. Samsun İlinin Taze Fasulye Yetiştiriciliği Yönünden Durumunun Belirlenmesi. **Karadeniz Bölgesi Tarım Sempozyumu**, Cilt 1, 51-62, Samsun
- Barman, M., Srijita, P., Choudhury, A. G., Pinaki, R., and Jahnavi, S. 2017. Biofertilizer as prospective input for sustainable agriculture in India. **Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.**, 6(11): 1177-1186.
- Benlioğlu, K. ve Ozakman, M., 1991. Fasulyelerde hale lekesi etmeni *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*'nın serolojik teşhisi üzerine çalışmalar. **VI. Türkiye Fitopatoloji Kongresi**, İzmir.
- Benlioğlu, K., Ozakman, M. ve Önceler, Z., 1994. Bacterial blights of beans in türkiye and resistance to halo blight and common blight. 9th **Congress of the Mediterranean Phytopathological Union**, Kuşadası-Aydın, 574-550.
- Berg, G. and Hallmann, J., 2006. Control of plant pathogenic fungi with bacterial endophytes. pp. 53–69. **Springer-Verlag**
- Bernal, G., Illanes, A. and Ciampi, L., 2002. Isolation and partial purification of a metabolite from a mutant strain of *Bacillus* sp. with antibiotic activity against plant pathogenic agents. **Electronic Journal of Biotechnology**, 5 (1): full4
- Bestwick, C. S, Brown, I. R, Bennett, M. H. and Mansfield, J. W., 1997. Localization of Hydrogen Peroxide Accumulation During the Hypersensitive Reaction of Lettuce Cells to *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*. **Plant Cell**, 9: 209–221.
- Bhardwaj, D., Ansari, M.W., Sahoo, R.K., 2014. Biofertilizers function as key player in sustainable agriculture by improving soil fertility, plant tolerance and crop productivity. **Microb Cell Fact.**, 13: 66-76.
- Bora, T. ve Özaktan, H., 1998, **Bitki Hastalıklarıyla Biyolojik Savaş**, Prizma Matbaacılık, İzmir, 205s.
- Bozkurt, İ.A., 2002. Farklı fasulye çeşitlerinin hale yanıklığı etmeni *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*'nın çeşitli ırklarına karşı tepkileri ve dayanıklı çeşitlerdeki dayanıklılık mekanizmalarının belirlenmesi. **Yüksek Lisans Tezi, Mustafa Kemal Üniversitesi, Bitki Koruma ABD**, Antakya.
- Bozkurt, İ.A., 2009. The control possibilities against bean common blight (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*) with antagonistic bacteria. **PhD. Thesis, Ege University, Institute of Science**, İzmir, pp. 153.
- Bozkurt, İ.A. ve Soylu S., 2011. Determination of responses of different bean cultivars against races of *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*, causal agent of halo blight of bean. **Euphytica**, 179: 417-425.
- Bradbury, J. F., 1986, **Guide to Plant Pathogenic Bacteria**, 233-234p.

- Busse, HJ., and Wieser M., 2014. The Genus *Arthrobacter*. In: Rosenberg E., DeLong E.F., Lory S., Stackebrandt E., Thompson F. (eds) **The Prokaryotes**. Springer, Berlin, Heidelberg
- Cabello-Conejo, M. I., Becerra-Castro, C., Prieto-Fernández, A., Monterroso, C., Saavedra-Ferro, A., Mench, M. and Kidd, P.S., 2014. Rhizobacterial inoculants can improve nickel phytoextraction by the hyperaccumulator *Alyssum pintodasilvae*. **Plant and Soil**, 379(1-2): 35–50.
- Callan, N.W., Mathre, D.E., Miller, J.B. and Vavrina, C.S., 1997. Biological seed treatments: Factors involved in efficacy. **Hort- Science**, 32:179-183.
- Cappuccino, J.C. and Sherman N., 1992. In: Microbiology: A laboratory Manual, third ed. Benjamin Cummings Pub. Co, New York, pp. 125-179.
- Chandrasekaran, J., Brumin M., Wolf D., Leibman D., Klap C. and Pearlsman M., 2016. Development of broad virus resistance in non-transgenic cucumber using CRISPR/Cas9 technology. **Mol. Plant Pathol.**, 17: 1140–1153.
- Chen, C., Bauske, E. M., Musson, G., Rodríguez-Kábana, R. and Kloepper, J.W., 1995. Biological control of Fusarium wilt on cotton by use of endophytic bacteria. **Biol. Control**, 5: 83–91.
- Çakır, S., Küçük, Ç., Kıvanç, M. and Atmaca, E., 2007. Farklı fasulye çeşit ve hatlarının *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* ve *Xanthomonas campestris* pv *phaseoli*'ye karşı duyarlılıklarının belirlenmesi, **Türkiye II. Fitopatoloji Kongresi**, 27-29 Ağustos 2007, Isparta, 266s.
- Çetinkaya-Yıldız, R. ve Aysan, Y., 2016. Domates bakteriyel solgunluk hastalığının bitki büyüme düzenleyici kökbakterileri ile biyolojik mücadelesi. **Türkiye Biyolojik Mücadele Dergisi**, 5: 9-22
- Darrasse, A., Bureau, C., Samson, R., Morris, C.E. and Jacques, M.A., 2007. Contamination of bean seeds by *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* associated with low bacterial densities in the phyllosphere under field and greenhouse conditions. **Eur J Plant Pathol.**, 119: 203-215.
- Demir, G. and Gündoğdu, M., 1994. Bacterial diseases of food legumes in aegean region of Turkey and effectivity of some seed treatments against bean halo blight. **J. Turk. Phytopath.**, 23: 57-66.
- Dias, A, Costa F, Andreote F, Lacava P, Teixeira M, Assumpcao L., 2009. Isolation of micropropagated strawberry endophytic bacteria and assessment of their potential for plant growth promotion. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, 25: 189-195.
- Diem, G., Rougier, M., Hamad-Fares, I., Balandreau, J. P. and Dommergues, Y.R., 1978. Colonization of rice roots by a diazotroph bacteria. **Ecol. Bull.**, 26: 305–311.
- Dobbelaere, S. Vanderleyden, J. and Okon, Y., 2003. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**, 22(2): 107–149.
- Dönmez, M.F., 2004. Erzurum ve Erzincan illerinde fasulye bitkisinde (*Phaseolus vulgaris* L) görülen bakteriyel hastalık etmenlerinin tanılanması ve *Pseudomonas*

- syringae* pv. *phaseolicola* ve *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*' ye karşı çeşitli fasulye genotip /varyetlerinin duyarlılıklarının belirlenmesi. **Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma A.B.D.**, Erzurum, 297 sayfa.
- Egamberdieva, D., 2011. Comparative study of antagonistic activity of scots pine root associated mycorrhizal fungus-bacteria and wheat associated bacteria against plant pathogenic fungi. **Journal of the Institute of Science and Technology**, 1 (2): 57-60.
- Egamberdieva D., Wirth S., Behrendt U., Ahmad P., Berg G., 2017. Antimicrobial activity of medicinal plants correlates with the proportion of antagonistic endophytes. **Front Microbiol.**; 8: 199.
- Elkoca, E. ve Cınar, T., 2015. Bazı Kuru Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L) çeşit ve hatlarının Erzurum ekolojik koşullarına adaptasyonu, tarımsal ve kalite özellikleri. **Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi/ Anadolu Agr. Sci.**, 30: 141-153.
- El-Sayed, W.S., Abdellah A., El-Naggar Moustafa Y., Elbadry M., 2014. In vitro antagonistic activity, plant growth promoting traits and phylogenetic affiliation of rhizobacteria associated with wild plants grown in arid soil. **Frontiers in Microbiology**, 5: 651
- Emdirme, N., 2019. Farklı bitki dokularından izole edilen bakterilerin bazı bitki patojeni funguslara karşı *in vitro* antifungal etkinlikleri ve mekanizmalarının belirlenmesi **Yüksek lisans Tezi, Hatay Mustafa Kemal Üniv. Fen Bilimleri Ens. Bitki Koruma ABD, Antakya, Hatay**. 91 sayfa.
- Fernández-González, A.J., Martínez-Hidalgo, P., Cobo-Díaz, J.F., 2017. The rhizosphere microbiome of burned holm-oak: potential role of the genus *Arthrobacter* in the recovery of burned soils. **Sci. Rep.**, 7: 6008
- Forchetti, G., Masciarelli, O., Alemanno, S., Alvarez, D., Abdala G., 2007. Endophytic bacteria in sunflower (*Helianthus annuus* L): isolation, characterization, and production of jasmonates and abscisic acid in culture medium. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 76: 1145-1152
- Fourie, D., 2002. Distribution and severity of bacterial diseases on dry beans (*Phaseolus vulgaris* L) in South Africa. **J. Phytopathol.**, 150: 220–226.
- Fravel, D.R., 1988. Role of antibiosis in the biocontrol of plant diseases. **Annu Rev phytopathol.**;26:75–91.
- Fritz, E., Fekete, A., Lintelmann, J., Schmitt-Kopplin, P. and Meckenstock, R.U., 2009. Isolation of two *Pseudomonas* strains producing pseudomonic acid A. **Systematic and Applied Microbiology**, 32: 56-64.
- Fürnkranz, M., Müller, H. and Berg, G., 2009. Characterization of plant growth promoting bacteria from crops in Bolivia. **Journal of Plant Diseases and Protection**, 116:149-155.
- Garcia-Espinosa, R., 1997. Breeding for horizontal resistance in bean an example from Mexico. **Biotechnology and Development Monitor**, No. 33:5.

- Gardan, L., Bollet M., Abughorrah F., Grimont F., Grimont P.A.D., 1992. DNA relatedness among the pathovar strains of *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* Janse (1982) and proposal of *Pseudomonas savastanoi* sp. nov. **Int J Syst Bacteriol** 42: 606-612
- Ghorbani, S. and Harighi, B., 2018. Characterization of endophytic bacteria with plant growth promotion and biological control potential isolated from walnut trees. **For Path.**; 48:e12403.
- Glick, B.R., 1995. The enhancement of plant growth by free living bacteria. **Can. J. Microbiol.**, 41: 109–117.
- Glick, B.R, Liu, C., Ghosh, S. and Dumbroff, E.B., 1997. Early development of canola seedlings in the presence of the plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR 12–2. **Soil Biol. Biochem.**, 29: 1233–1239
- Glick, B.R., Penrose, D.M. and Li, J., 1998. A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth promoting bacteria. **J. Theor. Biol.**, 190: 63–68.
- Glickman, E. and Y. Dessaux., 1995. A critical evaluation of the specificity of Salkowski reagent for indole compounds produced by phytopathogenic bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, 61: 793–796
- Goszczynska, T. and Serfontein, J., 1998. Milk-Tween Agar, A Semiselective Medium for Isolation and Differentiation of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. **Journal of Microbiological Methods**, 32: 65-72.
- Goto, M., 1992. Fundamentals of Bacterial Plant Pathology. Academic Pres, California, Inc., P635.
- Graham, P. and Ranalli, P., 1997. Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L). **Field Crops Research**, 53: 131-146.
- Gupta, H., Saini, R.V., Pagadala, V., Kumar, N., Sharma, D.K. and Saini, A.K., 2016. Analysis of plant growth promoting potential of endophytes isolated from *Echinacea purpurea* and *Lonicera japonica*. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, 16: 558-577.
- Guthrie, J.W., Huber, D.M. and Fenwick, H.S., 1965. Serological detection of halo blight. **Plant Diseases. Rep.**, 49: 297-299.
- Güven, K., 2000. Bacteriocin Typing of Some Turkish Isolates of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. **Turk J. Biol.**, 24: 795.
- Güven, K., Jones, J. B., Momol, M. T. and Dickstein, E.R., 2004. Phenotypic and genetic diversity among *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. **J. Phytopathology**, 152: 638-666.
- Hagedorn, D.J. and Inglis, D.A., 1986. Handbook of Bean Disease, Wisconsin, p.28.
- Hallmann, J., Quadt-Hallmann, A., Mahaffee, W.F., and Kloepper, J.W., 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Can. J. Microbiol.** 43: 895–914
- Hallmann, J, Quadt, H.A., Rodriguez, R, Kloepper, J.W., 1998. Interactions between *Meloidogyne incognita* and endophytic bacteria in cotton and cucumber. **Soil Biol Biochem.**, 30: 925–937

- Hardoim, P., 2011. Bacterial endophytes of rice – their diversity, characteristics and perspectives. PhD thesis book. Ridderkerk. Netherlands. Chapter 1. p. 10-38.
- Harper, S., Zewide, N., Brown, I.R. and Mansfield, J.W., 1987. Histological, physiological and genetic studies of the responses of leaves and pods of *Phaseolus vulgaris* to the races of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* and *Pseudomonas syringae* pv. *coronafaciens*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 31: 153-172.
- Harrison, R.L., and Bonning, B.C., 2010. Proteases as insecticidal agents. **Toxins**, 2(5): 935–953.
- Hartmann, A., F.U. and Burris, R.H., 1986. Regulation of nitro-genase activity by ammonium chloride in *Azospirillum* spp. **J. Bacteriol.**, 165: 864-870.
- Hassan, M., Afghan S., Hassan Z., Hafeez F., 2014. Biopesticide activity of sugarcane associated rhizobacteria: *Ochrobactrum intermedium* strain NH-5 and *Stenotrophomonas maltophilia* strain NH-300 against red rot under field conditions. **Phytopathologia Mediterranea**, 53 (2): 229-39.
- Hassan Eman, O. and El-Meneisy Afaf, Z.A., 2014. Biocontrol of halo blight of bean caused by *Pseudomonas phaseolicola*. **International Journal of Virology**, 10: 235-242.
- Hirano, S., Rouse, D., Clayton, O. and Upper, C., 1995. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* bacterial brown spot of bean: A study of epiphytic phytopathogenic bacteria and associated disease. **Plant Diseases**, 79: 1085-1093.
- Höflich, G., Wiehe, W. and Kühn, G., 1994. Plant growth stimulation by inoculation with symbiotic and associative rhizosphere mechanisms. **Experientia**, 50: 897–905.
- Hsieh, T.F., Huang, H.C. and Erickson, R.S., 2005. Biological control of bacterial wilt of bean using a bacterial endophyte, *Pantoea agglomerans*. **J. Phytopathology**, 153: 608-614.
- Jetiyanon, K. and Kloepper, J.W., 2002. Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria for induction of systemic resistance against multiple plant diseases. **Biol. Control**, 24: 285-291
- Kahveci, E. and Maden, S., 1994. Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* by Bacteriophages. **J. Turk Phytopath.**, 23: 79-85.
- Kang, S., Joo, G., Hamayun, M., 2009. Gibberellin production and phosphate solubilization by newly isolated strain of *Acinetobacter calcoaceticus* and its effect on plant growth. **Biotechnol. Lett.**, 31, 277–281
- Karaca, I., 1977. Fitobakteriyoloji ve Bakteriyel Hastalıklar, Ege Üniversitesi Matbaası, Bornova-İzmir, 270.
- Kendi, D., 2009. İç Anadolu bölgesinde fasulye tohumlarında *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* bulaşıklığının biyokimyasal ve moleküler yöntemlerle belirlenmesi. **Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya.**

- Khare, E., Arora, N.K., 2010. Effect of indole-3-acetic acid (IAA) produced by *Pseudomonas aeruginosa* in suppression of charcoal rot disease of chickpea. **Curr. Microbiol.**, 61: 64–68
- Kheirandish Z., Harighi B., 2015. Evaluation of bacterial antagonists of *Ralstonia solanacearum*, causal agent of bacterial wilt of potato, **Biological Control**, 86: 14-19,
- Kikoka, L.P., Katunzi, A.L. and Teri, J.M., 1989. Evaluation of effect of cropping systems on bean diseases and yield. **Proceedings Integrated Pest Management in Tropical and Subtropical Cropping Systems**, 3: 853-858.
- Klement, Z., 1963. Rapid Detection of the Pathogenicity of Phytopathogenic *Pseudomonas*. **Nature**, 199: 299-300.
- Klement, Z., Rudolph, K. and Sands, D.C., 1990. Methods in Phytobacteriology. Akademia Kiado, Budapest, XIV-568s.
- Kloepper, J.W. and Schroth, M.N., 1978, Plant growth promoting rhizobacteria on radishes. **Prov. IV Int. Conf. Plant pathol. Bacteria, Angers**, 2: 879-882.
- Kloepper, J.W., Tipping, E.M. and Lifshitz, R., 1991. Plant growth promotion mediated by bacterial rhizosphere colonizers. **In: The Rhizosphere and Plant Growth**. pp.315–326. Keister, D.L. and Cregan, P.B., Eds., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Kloepper, J.W. and Ryu, C.M., 2006. Bacterial endophytes as elicitors of induced systemic resistance. In: B. Schulz, C.Boyle & T. N. Sieber (Eds), **Soil biology, microbial root endophytes**. (Vol. 9, 33–52). Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.
- Kobayashi, D.Y. and Palumbo, J.D., 2000. Bacterial Endophytes and Their Effects on Plants and Uses in Agriculture. In Bacon, C.W. and White, J.F., Eds., **Microbial Endophytes**, Marcel Dekker, New York, 99-233.
- Koenraad, H., 1999. Comparative test for the detection of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in bean seeds. **Seed Science and Technology**, 33: 115–125.
- Krebs, B., Junge, H., Ockhardt, A., Hoding, B., Heubner, D. and Erben, U., 1993. *Bacillus subtilis*: An effective biocontrol agent. **Pesticide Science**, 37: 427-429
- Krechel, A., Faupel, A., Hallmann, J., Ulrich, A., and Berg, G., 2002. Potato-associated bacteria and their antagonistic potential towards plant-pathogenic fungi and the plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood. **Can. J. Microbiol.**, 48: 772–786
- 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.
- Lelliott, R.A. and Stead, D.E., 1987. Methods for The Diagnosis of Bacterial Diseases Plants. **Blackwell Scientific Publications**, Oxford, UK.
- Li, L., Mohamad, O.A.A., Ma, J., 2018. Synergistic plant–microbe interactions between endophytic bacterial communities and the medicinal plant *Glycyrrhiza uralensis* F.. **Antonie van Leeuwenhoek**, 111: 1735–1748.

- Lilley, A.K., Fry J.C., Bailey, M.J., Day, M.J., 1996. Comparison of aerobic heterotropic taxa isolated from four root domains of mature sugar beet (*Beta vulgaris*). **FEMS Microbiol. Ecol.**, 21: 231–242.
- Lodewyckx, C., Vangronsveld, J., Porteous, F., Moore, E.R.B., Taghavi, S., Mezgeay, M., and van der Lelie, D., 2002. Endophytic bacteria and their potential applications. **Crit. Rev. Plant Sci.**, 21: 583–606.
- Loper, J.E. and Schroth, M.N., 1986. Influence of bacterial sources of indole-3-acetic acid on root elongation of sugar beet. **Phytopathology**, 76(4): 386–389.
- Mahaffee, W. and Kloepper, J., 1997. Bacterial communities of soil, rhizosphere, and endorhiza associated with field-grown cucumber (*Cucumis sativus* L). **Canadian Journal of Microbiology**, 43: 344–353.
- Malik, D.K., and Sindhu, S.S., 2011. Production of indole acetic acid by *Pseudomonas* sp.: effect of coinoculation with *Mesorhizobium* sp. Cicer on nodulation and plant growth of chickpea (*Cicer arietinum*). **Physiology and molecular biology of plants: an international journal of functional plant biology**, 17(1): 25–32.
- Marquez-Santacruz, H.A., Hernandez-Leon, R., Orozco-Mosqueda, M.C., Velazquez-Sepulveda, I. and Santoyo, G., 2010. Diversity of bacterial endophytes in roots of Mexican husk tomato plants (*Physalis ixocarpa*) and their detection in the rhizosphere. **Genetics and Molecular Research**, 9(4): 2372–2380.
- McInroy, J.A. & Kloepper, J.W., 1995. Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. **Plant and Soil**, 173: 337–342.
- McSorley, R., 1998. Alternative practices for managing plant-parasitic nematodes. **Am. J. Altern. Agric.**, 13: 98–104.
- Mesanza, N., Iturrizab E., Pattena C.L., 2016. Native rhizobacteria as biocontrol agents of *Heterobasidion annosums* and *Armillaria mellea* infection of *Pinus radiata* **Biological Control** 101: 8–16.
- Milosevic, N. and Slusarenko A.J., 1996. Active oxygen metabolism and lignification in the hypersensitive response in bean. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 49: 143–57.
- Müller, T., Behrendt, U. and Ruppel, S., 2016. Fluorescent *Pseudomonads* in the phyllosphere of wheat: potential antagonists against fungal phytopathogens. **Curr. Microbiol.**, 72: 383.
- Nega, A., 2014. Review on concepts in biological control of plant pathogens. **Journal of Biology Agriculture and Healthcare**, 4: 33–54.
- Nywall, R.F., 1989. **Field Crop Diseases Handbook**. 2nd Edn. Van Nostrand Reinhold, New York, 817 pp.
- Ojiambo, P.S. and Scherm H., 2006. Biological and application-oriented factors influencing plant disease suppression by biological control: A Meta-Analytical Review. **Phytopathology**, 96: 1168–1174.
- Ohtake, H., Takahashi K., Tsuzuki Y. and Toda K., 1985. Uptake and release of phosphate by a pure culture of *Acinetobacter calcoaceticus*, **Water Research**, Volume 19, Issue 12, 1985, Pages 1587–1594

- Özdemir, S., 2002. **Yemeklik baklagiller**. Hasad yayıncılık, 11-30s.
- Palaniappan, P., Chauhan P.S., Saravanan, V.S., Anandham, R., Sa, T.M., 2010. Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic bacterial isolates from root nodule of *Lespedeza* sp. **Biology and Fertility of Soils**, 46: 807-816.
- Patel, J.K., Archana, G., 2017. Diverse culturable diazotrophic endophytic bacteria from *Poaceae* plants show cross-colonization and plant growth promotion in wheat. **Plant Soil** 417, 99–116
- Patriquin, D.G. and Döbereiner, J., 1978. Light microscopy observations of tetrazolium-reducing bacteria in endorhizosphere of maize and other grasses in Brazil. **Can. J. Microbiol.**, 24: 734–742.
- Patten, C.L. and Glick, B.R., 2002. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. **Applied and Environmental Microbiology**, 68: 3795-3801.
- Paulitz, T.C. and Belanger R.R., 2001. Biological control in greenhouse systems. **Ann. Rev. Phytopathol.**, 39: 103-33.
- Pavlovic, M., Konrad, R., Iwobi, A.N., Sing, A., Busch, U. and Huber, I., 2012. A dual approach employing MALDI-TOF MS and real-time PCR for fast species identification within the *Enterobacter cloacae* complex. **FEMS Microbiology Letters**, 328: 46–53.
- Perneel, M., Heyrman, J., Adiobo, A., De Maeyer, K., Raaijmakers, J. M., De Vos, P., and Höfte, M., 2007. Characterization of CMR5c and CMR12a, novel fluorescent *Pseudomonas* strains from the cocoyam rhizosphere with biocontrol activity. **Journal of Applied Microbiology**, 103: 1007–1020.
- Poon, E.S., Huang, T.C. and Kuo, T.T., 1977. Possible mechanism of symptom inhibition of bacterial blight of rice by an endophytic bacterium isolated from rice. **Bot. Bull. Academia Sinica**, 18: 61–70.
- Puente. M., Li, C. and Bashan, Y., 2009. Rock-degrading endophytic bacteria in cacti. **Environmental and Experimental Botany**, 66: 389-401
- Quadt-Hallmann, A., Benhamou, N. and Kloepper, J.W., 1997. Bacterial endophytes in cotton:mechanisms entering the plant. **Can. J. Microbiol.**, 43: 577–582.
- Quispel, A., 1991. A critical evaluation of the prospects for nitrogen fixation with non-legumes. **Plant Soil**, 137: 1–11.
- Romero, F.M., Marina, M. and Pieckenstain, F.L., 2014. The communities of tomato (*Solanum lycopersicum* L) leaf endophytic bacteria, analyzed by 16S-ribosomal RNA gene pyrosequencing. **FEMS Microbiology Letters**, 351(2): 187-194.
- Rosenblueth, M. and Martínez-Romero, E., 2006. Bacterial endophytes and their interaction with hosts. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, 19: 827-837.
- Saettler, A.W., 1991. Angular Leaf Spot, In: Hall R, ed. Compendium of Bean Diseases. **American Phytopathological Society Press**, St. Paul, MN. P 15-16.
- Saettler, A.W., 1994. Bacterial Brown Spot, Halo Blight and Common Bacterial Blight in **Compendium of Bean Diseases** (Hall, R., Edt). APS Pres, The American Phytopathological Society, 73p.

- Saini, A., Nain, L., Garg, V. and Saxena, J., 2017. Improvement of Growth, Yield, and Pigmentation of Mung Bean Plants Using *Ochrobactrum intermedium* CP- 2 as Bioinoculant. **Clean Soil Air Water**, 45: 1500670.
- Santoyo, G., Moreno-Hagelsieb, G., Orozco-Mosqueda, Ma. Del. C. and Glick, B.R., 2016. Plant growth-promoting bacterial endophytes. **Microbiological Research**, 183: 92-99.
- Sazinas, P., Hansen M.L., Aune M.I., Fischer M.H., Jelsbak L., 2019. A Rare Thioquinolobactin Siderophore Present in a Bioactive *Pseudomonas* sp. DTU12.1, **Genome Biology and Evolution**, Volume 11, Issue 12, December 2019, Pages 3529–3533
- Schaad, N.W., Azad, H., Peet, R.C. and Panopoulos, N.J., 1989. Identification of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* by A DNA Hybridization Probe. **Phytopathology**, 79: 903–907.
- Schaad, N.W., Cheong, S., Tamaki, S., Hatziloukas, E. and Panopoulos, N.J., 1995. A Combined Biological and Enzymatic Amplification (BIO-PCR) Technique to Detect *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in Bean Seed Extracts. **Phytopathology**, 85: 243–248.
- Schaad, N.W., Jones, J.B. and Chun, W., 2001. **Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria**.
- Schuster, M.L. and Coyne, D.P., 1981. Biology, Epidemiology, Genetics And Breeding for Resistance to Bacterial Pathogens of *Phaseolus vulgaris* L. **Horticultural Reviews**, 3: 28-59.
- Schwartz, H.F. and Galvez, G.E., 1980. Bean Production Problems. **Columbia**, pp. 424.
- Schwartz, H.F., 1989. Bean Production Problems in The Tropics, C.I.A.T., **Columbia**, pp. 285-301.
- Schwartz, H.F., Gent, D.H., Franc G.D., and Harveson R.M., 2007. Dry Bean, Disease, Common Bacterial Blight, High Plains IPM Guide, a cooperative effort of the University of Wyoming, University of Nebraska, Colorado State University and Montana State University.
- Schwyn, B. and Neilands, J.B., 1987. Universal chemical assay for detection and determination of siderophores. **Anal. Biochem.**, 160: 47-56.
- Serfontein, J.J., 1994. Occurrence of Bacterial Brown Spot of Dry Beans in Transvaal Province of South Africa. **Plant Pathology**, 43: 597-599.
- Shi, Y.W., Lou, K. and Li, C., 2010. Growth and photosynthetic efficiency promotion of sugar beet (*Beta vulgaris* L) by endophytic bacteria. **Photosynthesis Research**, 105: 5-13.
- Shi, Y., Yang, H., Zhang, T., Sun, J. and Lou, K., 2014. Illumina-based analysis of endophytic bacterial diversity and space-time dynamics in sugar beet on the north slope of Tianshan mountain. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 98(14): 6375-6385.
- Sigee, D.C., 1993. Bacterial Plant pathology Cell and Molecular aspect. Cambridge Univ. Pres, pp. 325.

- Singh, P.S. and Munoz, G.C., 1999, Resistance to bacterial blight among *Phaseolus* species and common bean improvement, **Crop Science**, 39:80-89.
- Smith, C.E.J., 1986. Preceromic Plant Remains From Guila Naquitz. In: Flannery, K. V. (ed). *Guila Naquitz: Archaic Foraging and Early Agriculture In Oaxaca, Mexico*. Academic Press, New York, pp.265-274.
- Soto, J., Ortiz, J., Herrera, H., Fuentes, A., Almonacid, L., Charles, T. C. & Arriagada, C., 2019. Enhanced arsenic tolerance in *Triticum aestivum* inoculated with arsenic-resistant and plant growth promoter microorganisms from a heavy metal-polluted soil. **Microorganisms**, 7: 348.
- Soylu, S., Soylu, E.M., Kurt, Ş. and Ekici, Ö.K., 2005. Antagonistic potentials of rhizosphere-associated bacterial isolates against soil-borne diseases of tomato and pepper caused by *Sclerotinia sclerotiorum* and *Rhizoctonia solani*. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, 8: 43-48.
- Soylu, S., Özaktan, H., Şahin, F., Soylu, M., Yetişir, H., Daşgan, Y., Balkaya, A., Dönmez, F., Baysal, Ö., Bozkurt, A., 2007. Ülkemizin Önemli Fasulye Ekim Alanlarında Sorun Olan Bakteriyel Hastalık Etmenlerinin Yaygınlıkları ve Bu Etmenlere Karşı Dayanıklılı Fasulye Genotiplerinin Belirlenmesi. TÜBİTAK TOVAG- Proje Kesin Sonuç Raporu (Yayınlanmamış)
- Soylu, S. ve Şahin, F., 2019. Fasulye Hale Yanıklığı Hastalığı. **Bitki Bakteri Hastalıkları**. Meta Basım, İzmir, 317s.
- Soylu, S. ve Bozkurt, İ.A. 2019. Elma kök uru hastalığı etmeni *Rhizobium radiobacter*'e karşı epifit ve endofit bakteri izolatlarının antagonistik potansiyellerinin belirlenmesi. **Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi** 16: 348-361
- Srivastava, S. and Srivastava A. K., 2006. Biological phosphate removal by model based continuous cultivation of *Acinetobacter calcoaceticus*, **Process Biochemistry**, 41: 624-630.
- Staskawicz, B.J. and Panopoulos, N.J., 1979. A rapid and sensitive microbiological assay for phaseolotoxin. **Phytopathology**, 69: 663-666.
- Stromberg, E.L., Roberts, D.P., Lacy, G.H., Lohrke, S.M., Li, W., Buyer, J.S., 2002. Field evaluation of selected bacterial isolates and seed treatment fungicides for the control of take-all in Roane soft red winter wheat in Virginia, 2001. Biol. Cult. Tests Contl . **Plant Dis. Report** 17: S08.
- Strobel, G., Daisy, B., Castillo, U. and Harper, J., 2004. Natural products from endophytic microorganisms. **J. Nat. Prod.**, 67: 257-268.
- Sturz, A.V. and Matheson, B.G., 1996. Populations of endophytic bacteria which influence host-resistance to *Erwinia*-induced bacterial soft rot in potato tubers. **Plant and Soil**, 184, 265-271.
- Sturz, A.V., Christie, B.R. and Matheson, B.G., 1998. Associations of bacterial endophyte populations from red clover and potato crops with potential for beneficial allelopathy. **Can. J. Microbiol.**, 44: 162–167.

- Sturz, A.V., Christie, B.R. and Nowak, J., 2000. Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable systems of crop production. **Critical Reviews in Plant Sciences**, 19 (1): 1-30.
- Sujatha, N. and Ammani, K., 2013. Siderophore production by the isolates of fluorescent *Pseudomonads*. **International Journal of Current Research and Review**, 5(20): 01-07.
- Sun, L.N., Zhang, Y.F., He, L.Y., Chen, Z. ., Wang, Q.Y., Qian, M. and Sheng, X.F., 2010. Genetic diversity and characterization of heavy metal-resistant-endophytic bacteria from two copper-tolerant plant species on copper mine wasteland. **Bioresource Technology**, 101(2): 501-509.
- Sutton, M.D. and Wallen, V.R., 1970. Epidemiological and ecological relations of *Xanthomonas phaseoli* and *Xanthomonas phaseoli* var. *fuscans* on beans in southwestern Ontario, 1961-1968. **Canadian Journal of Botany**, 48: 1329-1334.
- Sülü, S.M., Bozkurt, İ.A. ve Soylu, S., 2016. Bitki büyüme düzenleyici ve biyolojik mücadele etmeni olarak bakteriyel endofitler. **Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi**, 21(1): 103-111.
- Taylor, J.D., Teverson, D.M. and Davis, J.H.C., 1996. Sources of resistance to *P. s. pv. phaseolicola* races in *P. vulgaris*. **Plant Pathology**, 45: 479-485.
- Thornley, M.J., 1960. The Differentiation of *Pseudomonas* From Other Gram Negative Bacteria on The Basis of Arginine Metabolism. **J. Appl. Bacteriol.** 1: 37-52.
- Thomas, E.L. and van der Hoorn, R., 2018. Ten prominent host proteases in plant-pathogen interactions. **International journal of molecular sciences**, 19(2): 639.
- Tjamos, E.C., Tjamos, S.E. and Antoniou, P.P., 2010. Biological management of plant diseases: highlights on research and application. **Journal of Plant Pathology**, 92: S17-S21.
- Tsavkelova, E., Cherdyntseva, T., Botina, S. and Netrusov, A., 2007. Bacteria associated with orchid roots and microbial production of auxin. **Microbiological Research**, 162: 69-76.
- Ünlü, S. ve Aysan, Y., 2016. Sardunya (*Pelargonium spp*) bakteriyel yanıklık etmeni *Xanthomonas axonopodis* pv. *pelargonii*'nin biyolojik mücadelesi üzerine araştırmalar. **Türkiye Biyolojik Mücadele Dergisi**, 2 (1) , 25-38
- Van Buren, A.M., Andre, C. and Ishimaru, C.A., 1993. Biological control of the bacterial ring rot pathogen by endophytic bacteria isolated from potato. **Phytopathology**, 83: 1406-1407.
- Van Loon, L.C., 1984. Regulation of pathogenesis and symptom expression in diseased plants by ethylene. **In: Ethylene: Biochemical, Physiological and Applied Aspects**. Fuchs, Y. and Chalutz, E., Eds., Martinus Nijhoff/ W., Junk, the Hague, The Netherlands.
- Verhagen, B.W.M., Glazebrook J., Zhu T., Chang H.S., van Loon L.C. and Pieterse C.M.J., 2004. The transcriptome of rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis*. **Molecular Plant- Microbe Interactions**, 17: 895-908.

- Vessey, K.J., 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and Soil**, 255: 571-586.
- Vural, C. and Soylu, S., 2012. Prevalence and incidence of fungal disease agents affecting bean (*Phaseolus vulgaris* L) plants. **Research in Crops**, 13: 634-640.
- Wang, Y., Zeng, Q. and Zhang, Z., 2010. Antagonistic bioactivity of an endophytic bacterium H-6. **African Journal of Biotechnology**, 9(37): 6140-6145.
- Weller, D.M. and Saettler A.W., 1976. Chemical control of common and fuscous bacterial blights in Michigan Navy (pea) beans. **Plant Disease Reporter**, 60(9): 793-797.
- Weller, D.M. and Saettler, A.W., 1980. Colonization and distribution of *Xanthomonas phaseoli* and *Xanthomonas phaseoli* var. *fuscans* in field-grown navy beans, **Phytopathology**, 70(6): 500-506.
- Zapata, M., Freytag, G.F. and Wilkinson, R.E., 1985. Evaluation for Bacterial Blight Resistance in Beans. **Phytopathology**, 75: 1032-1039.
- Zhang, Y., Du, B.H., Jin, Z., Li, Z. Song, H., Ding, Y.Q., 2011. Analysis of bacterial communities in rhizosphere soil of healthy and diseased cotton (*Gossypium* sp) at different plant growth stages. **Plant Soil**, 339: 447.

ÖZGEÇMİŞ

Yazar, 1982 yılında Şanlıurfa’da doğdu. İlkokul, Ortaokul ve Lise öğrenimini Ankara’da tamamladı. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü’nden 2005 yılında mezun oldu. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalından 2008 yılında Yüksek Lisans derecesiyle mezun oldu. Halen Zirai Mücadele Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü (ZMMAE), Bitki Hastalıkları Bölümü Bakteriyoloji Birimi’nde Araştırmacı olarak görev yapmaktadır.



EK-1 Bakterilerin geliştirilmesinde kullanılan besi yerleri

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

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

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

Peptone from caseinpepton	10 g/L
Peptone from meat	10 g/L
K ₂ HPO ₄ 3H ₂ O	1.5 g/L
MgSO ₄ 7H ₂ O	1.5 g/L
Glycerol	10 mL/L
Agar-Agar	12 g/L

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

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

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

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

Ek-2 Antagonist bakterilerin etki mekanizmalarının belirlendiği özel besi yerleri

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

Chrome azurol S (CAS)	60.5 mg/L
FeCl ₃ Solusyonu (1 mM FeCl ₃ 6H ₂ O+10 mM HCL)	10 ml/L
hexadecyltrimethylammonium bromide (HDTMA)	72.9 mg/L
Pseudomonas agar F Base (King B Agar, (Merck Kat.No.110989)	35 g/L
Glyserol	10 mL/L

Not 1: Otoklav sonrası katılaşma sorun var ise 4 g/L Agar ilave edilebilir

Not 2: Pseudomonas agar F Base (King B Agar) Yerine aşağıdaki karışım kullanılabilir;

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

Pikovskaya's Agar (PVK)

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