

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Ticari Fideliklerde Sorun Olan Kabakgil Bakteriyel Hastalık
Etmenlerinin İzolasyonu ve Hıyar Köşeli Yaprak Leke
Hastalığının Biyolojik Mücadelesi**

Merve OKUR

Bitki Koruma Anabilim Dalı

Mayıs, 2024

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZ ONAYI

**Ticari Fideliklerde Sorun Olan Kabakgil Bakteriyel Hastalık
Etmenlerinin İzolasyonu ve Hıyar Köşeli Yaprak Leke
Hastalığının Biyolojik Mücadelesi**

Merve OKUR

Bitki Koruma Anabilim Dalı

Bu Yüksek Lisans Tezi 20/05/2024 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından
Değerlendirilmiş ve Oy Birliği / Oy Çokluğu ile Kabul Edilmiştir.

Jüri : Prof. Dr. Yeşim AYSAN (Danışman)

: Prof. Dr. Mustafa MİRİK

: Dr. Öğr. Üyesi Benian Pınar AKTEPE

Bu Tez Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilim Dalında Hazırlanmıştır.

Tez No:

Prof. Dr. Sadık DİNÇER
Enstitü Müdürü

Bu çalışma BAP Birimi Tarafından Desteklenmiştir.

Proje No: FYL-2023-15812

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

İÇİNDEKİLER

ÖZ	I
ABSTRACT.....	II
ÇİZELGELER DİZİNİ	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ	V
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	VII
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	5
3. MATERYAL VE METOT.....	9
3.1. Materyal.....	9
3.2. Metot	10
3.2.1. Ticari Fidelik Ziyaretleri ve Hastalıklı Bitki Örneklerinin Toplanması	10
3.2.2. Hasta Bitkilerden Patojen Bakteri İzolasyonları	13
3.2.3. Bakteri İzolatlarının Tanısı	13
3.2.4. Farklı Kabakgil Bitkilerinde Patojenite Testleri	16
3.2.5. Biyolojik Mücadele Çalışmaları	18
4. BULGULAR.....	29
4.1. Ticari Fidelik Ziyaretleri ve Hastalıklı Bitki Örneklerinin Toplanması	29
4.2. Hasta Bitkilerden Patojen Bakteri İzolasyonları	33
4.3. Bakteri İzolatlarının Tanısı	36
4.4. Farklı Kabakgil Bitkilerinde Patojenite Testleri	37
4.5. Biyolojik Mücadele Çalışmaları	41
5. TARTIŞMA.....	51
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	55
KAYNAKLAR	57
ÖZGEÇMİŞ	65
EKLER.....	67
EK 1. Patojen bakteri izolatlarının MALDI-TOF MS sonuçları.....	69
EK 2. Antagonist bakterilerin MALDI-TOF MS sonuçları	71
EK 3. Birinci tohum denemesi hastalık oranı varyans analizi	72

EK 4. Birinci tohum denemesi hastalık şiddeti varyans analizi	73
EK 5. İkinci tohum denemesi hastalık oranı varyans analizi	74
EK 6. İkinci tohum denemesi hastalık şiddeti varyans analizi.....	75
EK 7. Antagonistlerin çimlenme oranına etkisi varyans analizi	76
EK 8. Antagonistlerin IAA üretimi varyans analizi	77
EK 9. Antagonistlerin siderofor üretimi varyans analizi.....	79
EK 10. Antagonistlerin antibakteriyel etkisinin varyans analizi	81



**Ticari Fideliklerde Sorun Olan Kabakgil Bakteriyel Hastalık
Etmenlerinin İzolasyonu ve Hıyar Köşeli Yaprak Leke
Hastalığının Biyolojik Mücadelesi**

Merve OKUR

Danışman: Prof. Dr. Yeşim AYSAN

Bitki Koruma Anabilim Dalı

ÖZ

Pseudomonas syringae pv. *lachrymans*'ın neden olduğu Hıyar Köşeli Yaprak Leke Hastalığı kabakgillerde verim kayıplarına neden olan önemli bir bakteriyel hastalıktır. Bu çalışmada, Adana'da bulunan ticari fideliklerde sorun olan kabakgil bakteriyel hastalık etmenlerinin tanımlanması ve yerel antagonistleri kullanarak Hıyar Köşeli Yaprak Leke Hastalığının biyolojik mücadelesi araştırılmıştır. Adana'da ticari kabakgil fidesi üretilen alanlar gezilerek hasta hıyar fidelerinden 19 adet ve kabak fidelerinden 8 adet olmak üzere toplam 27 izolat *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* olarak tanımlanırken 14 farklı hasta kavundan elde edilen izolatlar *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* olarak tanımlanmıştır. Biyolojik mücadele çalışmalarında kabakgil yetiştirilen toprak, yeşil aksam, meyve ve tohumlardan toplam 134 adet yerel aday antagonist bakteri izole edilmiş ve laboratuvarımız kültür koleksiyonunda bulunan 164 adet antagonist bakteri de çalışmaya dahil edilmiştir. Toplam 298 adet aday antagonist bakterinin *in vitro* antimikrobiyal etkisi araştırılmış ve 29 tanesi inhibisyon zonu oluşturarak *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*'ın gelişimini baskıladığı belirlenmiştir. Ayrıca bu 29 izolatın fosfor çözme potansiyeli, siderofor üretimi ve IAA üretme yeteneği incelenmiş ve biyolojik tohum uygulamaları için 15 adet antagonist bakteri seçilmiştir. Hıyar Köşeli Yaprak Leke Hastalığına biyolojik tohum uygulamalarının etkisinin araştırıldığı birinci denemede, 12 etkili antagonist hastalığı %21-78 oranında baskılamıştır. İkinci tohum denemesinde, 5 adet (AD 4-2, OG1-2, OG7-7, NÇ-KK, X-77) antagonist ve bir çift antagonistin kombinasyonu (OG1-2 ve OG7-7) kullanıldığında hastalığın etkili bir şekilde baskılandığı tekrar teyit edilmiştir. Başarılı antagonistler *Providencia rettgeri*, *Bacillus amyloliquefasciens*, *Bacillus mojavensis*, *Bacillus pumilus* ve *Enterococcus casseliflavus* olarak tanımlanmıştır. Bu veriler ışığında bu izolatların Hıyar Köşeli Yaprak Leke Hastalığının biyolojik mücadelesinde tohuma uygulanabileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*, Tohum uygulamaları, IAA, Siderofor, Antimikrobiyal etki

CUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

MSc THESIS

Isolation of Cucurbit Bacterial Pathogens Affecting Commercial Nurseries and Biological Control of Cucumber Angular Leaf Spot Disease's

Merve OKUR

Advisor: Prof. Dr. Yeşim AYSAN

Department of Plant Protection

ABSTRACT

Cucumber Angular Leaf Spot Disease, caused by *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*, is a significant bacterial disease causing yield losses in cucurbit crops. This study focuses on identifying bacterial pathogens affecting cucurbits in commercial nurseries in Adana and investigating the biological control of Cucumber Angular Leaf Spot Disease using local antagonists. A total of 27 isolates, including 19 from infected cucumber seedlings and 8 from zucchini seedlings, were identified as *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*, while isolates from 14 infected melon samples were identified as *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. In the biological control experiments, 134 local candidate antagonist bacteria were isolated from soil, aerial parts, fruits, and seeds of cucurbit crops, along with 164 antagonist bacteria taken from the laboratory's culture collection. The in vitro antimicrobial effect of 298 candidate antagonists were assessed, of which 29 showed inhibition of *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* growth by forming inhibition zones. Additionally, the phosphorus solubilization potential, siderophore production, and indole-3-acetic acid (IAA) production capabilities of these 29 isolates were investigated, leading to the selection of 15 antagonists for biological seed treatments. In the first trial to investigate the efficacy of biological seed treatments against Cucumber Angular Leaf Spot Disease, 12 antagonists demonstrated disease suppression ranging from 21% to 78%. A subsequent trial confirmed effective disease suppression with five antagonists (AD 4-2, OG1-2, OG7-7, NÇ-KK, X-77) and a combination of OG1-2 and OG7-7. The successful antagonists were identified as *Providencia rettgeri*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus mojavensis*, *Bacillus pumilus*, and *Enterococcus casseliflavus*. On the basis of these results, it is concluded that these isolates can be applied to seeds for the biological control of Cucumber Angular Leaf Spot Disease.

Keywords: *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*, Seed treatments, IAA, Siderophore, Antimicrobial effect

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca desteğini maddi manevi her anlamda hissettiren, karanlıkta kaldığımda ışıyla yolumu aydınlatan, her sohbetimde ufkumu genişleten, tez çalışmam süresince tüm bilgi birikimini ve akademik tecrübelerini paylaşan, gurur duyduğum bir çalışmaya imza atmamı sağlayan çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Yeşim AYSAN'a en içten saygılarımı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamın jüri üyesi olmayı kabul eden, çok değerli bilgi birikimi ve tecrübelerini paylaşan sayın hocam Prof. Dr. Mustafa MİRİK'e teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimime başladığımdan bu yana gerek özel hayatımda gerekse laboratuvar çalışmalarında her zaman çok içten bir samimiyet ve hoşgörüsüyle yanımda olan, güler yüzü, bilgi birikimi ve çalışma özverisine hayran olduğum, aynı zamanda tez savunmamın jüri üyesi olmayı kabul eden çok değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Benian Pınar AKTEPE'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimimin başından beri güler yüzünü, samimiyetini ve bilgi birikimini eksik etmeyen değerli hocam sayın Dr. Raziye ÇETİNKAYA-YILDIZ'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamın sonuç aşamalarında MALDI TOF MS sistemini kullanmamızda her türlü desteği sağlayan çok değerli hocam Prof. Dr. Soner SOYLU ve ekip arkadaşlarına sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmasında kullanılmak üzere atalık tohum temin eden çok değerli Araş. Gör. Mustafa Alparslan UMARUSMAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarım esnasında yardımlarını esirgemeyen çok değerli arkadaşım Ziraat Mühendisi Sevgi Dursun SARP'a ve manevi desteği için Gökhan ÖZCAN'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Yalnızca eğitim hayatımda değil, hayatımın her alanında ve her koşulda beni maddi manevi destekleyen, bugün olduğum insandan gurur duymamı sağlayan, hep daha iyisi olmam için elimi sımsıkı tutan canım ailem, annem Dursun OKUR'a, babam Ragıp OKUR'a ve ablam Beyza OKUR'a en içten sevgilerimi ve teşekkürlerimi sunarım.

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Kabakgillerde görülen önemli bakteriyel hastalık etmenleri.....	2
Çizelge 4.1. Ticari fideliklerin incelenmesi sırasında alınan bitki örnekleri sayısı	33
Çizelge 4.2. Saflaştırılan bakteri izolatları listesi	35
Çizelge 4.3. Patojen izolatlarının tanı testlerinde elde edilen sonuçlar	37
Çizelge 4.4. Patojen izolatların koparılmış hıyar ve limon meyvelerinde patojenite testleri	38
Çizelge 4.5. Patojen izolatların farklı kabakgil türlerine ait fidelerde patojenite testleri	39
Çizelge 4.6. Antagonist bakterilerin etki mekanizmaları.....	42
Çizelge 4.7. Hıyar Köşeli Yaprak Leke Hastalığına Biyolojik Tohum Uygulamalarının Etkisi (Birinci Deneme)	44
Çizelge 4.8. Antagonist bakteri çiftlerinin birbirleriyle etkileşimlerinin sonuçları	46
Çizelge 4.9. Hıyar Köşeli Yaprak Leke Hastalığına Biyolojik Tohum Uygulamalarının Etkisi (İkinci Deneme)	47
Çizelge 4.10. Başarılı Antagonistlerin Tohum Çimlenmesine Etkisi	49
Çizelge 4.11. Antagonist bakterilerin MALDI-TOF MS sonuçları	49

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1.	Ticari fideliklerin incelenmesi ve hasta bitki örneklerinin toplanması.....	11
Şekil 3.2.	14 Mart 2023 tarihinde yapılan ticari fidelik ziyareti	12
Şekil 3.3.	Patojenite testlerinin yapıldığı cam sera gönümü (solda) ve değerlendirilme zamanı (sağda)	17
Şekil 3.4.	Kozan ilçesinde balkabağı yetiştirilen tarla (solda) ve satın alınan balkabağı meyvesi (sağda)	20
Şekil 3.5.	Bitki Koruma Bölümü arazisinde yetiştirilen hıyar fidelerinden örneklerin alınması	20
Şekil 3.6.	Standart IAA eğrisi	22
Şekil 3.7.	(A) petri kabındaki antagonist bakterinin çapı ve (B) antagonist bakterinin oluşturduğu zon çapı	23
Şekil 3.8.	Aday antagonistlerin tohum kökenli Hıyar Köşeli Yaprak Leke Hastalığı'na etkisi değerlendirilirken kullanılan skala. (0: kotiledonlarda leke yok, 1: kotiledonlarda 1 leke, 2: kotiledonlarda 2 leke, 3: kotiledonlarda 3 veya daha fazla leke var ise)..	26
Şekil 3.9.	Tohum denemelerinin kurulma aşamaları.....	26
Şekil 4.1.	Kavun gerçek yapraklarındaki yanıklık (solda) ve sarı haleli yanıklıklar (sağda)	29
Şekil 4.2.	Kavun yaprak kenarlarındaki düzensiz yanıklıklar.....	30
Şekil 4.3.	Hıyar yaprak kenarlarındaki düzensiz yanıklıklar	30
Şekil 4.4.	Ticari fidelik ziyaretindeki hasta kavun fidelerinin görünümü.....	31
Şekil 4.5.	Kabak fidelerinin kotiledonlarındaki su emmiş ve açık kahverengi lekeler	31
Şekil 4.6.	Hıyar fidelerinin kotiledonlarındaki su emmiş leke (solda) ve gerçek yapraklardaki lekeler (sağda ve altta).	32
Şekil 4.7.	TSA besiyerinde gelişen <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> 'nin gelişimi.....	34
Şekil 4.8.	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lachrymans</i> 'ın TSA besiyerinde (solda), King B besiyerinde (ortada) ve King B besiyerinde UV ışık altında (sağda) görünümü. ..	34
Şekil 4.9.	Koparılmış limon (üstte) ve hıyar meyvelerinde (altta) patojenite testleri sonucu oluşan hastalık belirtisi	38
Şekil 4.10.	Hıyar fidelerindeki patojenite testi sonucu meydana gelen yaprak lekeleri	39
Şekil 4.11.	Kabak fidelerindeki patojenite testi sonucu meydana gelen yaprak lekeleri.....	40

Şekil 4.12. Kavun fidelerindeki patojenite testi sonucu meydana gelen yaprak lekeleri	40
Şekil 4.13. Antagonist bakterilerin patojen bakteri ile oluşturduğu inhibisyon zonları	43
Şekil 4.14. Hastalığın ilk aşamalarında pozitif kontrolde kotiledon yapraklardaki su emmiş lekeler (solda), hastalığın ilerleyen aşamalarında sarı haleli nekrotik lekeler ve ölmüş fideler (sağda).....	45
Şekil 4.15. Pozitif kontrol (solda) ve OG 1-2 kodlu antagonist bakteri uygulanmış küvet görünümü (sağda)	48
Şekil 4.16. Pozitif kontrole ait bitkiler (solda) ve negatif kontrole ait bitkiler (sağda)	48



SİMGELER VE KISALTMALAR

ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
ASM	: Asibenzolar-S Metil
CAS	: Chrome Azurol-S Agar
CMV	: Cucumber Mosaic Virus / Hıyar Mozaik Virüsü
cm	: Santimetre
dev/dak	: Devir/dakika
FAO	: Food and Agriculture Organization / Gıda ve Tarım Organizasyonu
Fe	: Demir
g	: Gram
HCl	: Hidroklorik asit
HR	: Hipersensitiv Reaksiyon
IAA	: İndol Asetik Asit
K ₂ HPO ₄	: Dipotasyum fosfat
KOH	: Potasyum hidroksit
LB	: Luria Bertani Broth
LOPAT	: Levan, Oksidaz, Pektolitik aktivite, Arginin dehidrolizasyonu, Tütünde aşırı duyarlılık reaksiyonu
MALDI-TOF MS	: Matriks Assisted Lazer Desorption Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry / Matriks Destekli Lazer Desorpsiyon İyonizasyon Uçuş Süreli Kütle Spektroskopisi
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
NaCl	: Sodyum klorür
NB	: Nutrient Broth
nm	: Nanometre
ort.	: Ortalama
PGPR	: Plant Growth Promoting Rhizobacteria / Bitki Gelişimini Artıran Kök Bakterileri
PRSV	: Papaya Ringspot Mosaic Virus / Papaya Halkalı Mozaik Virüsü
<i>Psl</i>	: <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lachrymans</i>
pv.	: Pathovar
PVK	: Pikovskaya Agar
rpm	: Revolutions Per Minute / Bir dakikada tur sayısı
SMV	: Squash Mosaic Virus / Kabak Mozaik Virüsü

subsp. : Subspecies / alttür

TSA : Tryptic Soy Agar

TÜİK : Türkiye İstatistik Kurumu

var. : Varyete

WMV : Watermelon Mosaic Virus / Karpuz Mozaik Virüsü

YDCA : Yeast Dekstroz Kalsiyum Karbonat Agar

ZYMV : Zucchini Yellow Mosaic Virus / Kabakgil Sarı Mozaik Virüsü

µL : Mikrolitre

% : Yüzde

°C : Santigrat derece



1. GİRİŞ

Kabakgiller; Cucurbitaceae familyasına ait çoğunlukla tropik, subtropik ve ılıman bölgelerde yayılış gösteren, yaklaşık 98 cins ile 975 türden oluşan çiçekli bir bitki ailesidir (Xu ve ark., 2017; Paris, 2001). Asya’da 3000 yıldan daha uzun bir süre önce kabakgil yetiştiriciliğinin başladığı bilinmektedir (Lebeda ve ark., 2007). Ülkemiz gerek toprak zenginliği gerekse iklim koşullarının uygunluğu sebebiyle kabakgiller dahil birçok bitki türünün yetiştiği bir coğrafyadır. Dünya kabakgil üretiminde öncü ülkeler olarak Çin, Ukrayna, Rusya, ABD ve Türkiye sıralanabilir (FAO, 2021). Ülkemizde ticari anlamda yetiştiriciliği yapılan kabakgiller familyasına ait bitki türleri olarak karpuz (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai), hıyar (*Cucumis sativus* L.), kavun (*Cucumis melo* L.), kabak (*Cucurbita pepo* L.), bal kabağı (*Cucurbita moschata* L.) ve acur (*Cucumis melo* var. *flexuosus*) olarak sıralanabilir. Türkiye’de kabakgillerin 2022 yılı üretim verilerine göre karpuz 3.394.783 ton, hıyar 1.938.545 ton, kavun 1.587.230 ton, sakız kabağı 590.362 ton, balkabağı 92.968 ton, çerezlik kabak üretimi 60.970 ton ve acur üretimi ise 39.421 ton olarak açıklanmıştır (TÜİK, 2022).

Kabakgil üretiminde pek çok bakteriyel, viral ve fungal hastalığın üretim esnasında sorun olduğu bilinmektedir. Tehdit oluşturan en önemli viral hastalık etmenlerinin kabak mozaik virüsü (SMV), kabak sarı mozaik virüsü (ZYMV) hıyar mozaik virüsü (CMV), karpuz mozaik virüsü (WMV) ve papaya halkalı leke virüsü (PRSV) olduğu bilinmektedir. Fungal hastalıklar oldukça yaygın görülmekle birlikte ülkemiz için en önemli olanları Külleme etmeni olan *Sphaerotheca fuliginea* ve *Erysiphe cichoracearum*, Mildiyö etmeni olan *Pseudoperonospora cubensis*, Alternarya yaprak yanıklığı etmeni olan *Alternaria cucumerina* (Ellis & Everh.) Elliott, Solgunluk ve Kök çürüklüğü etmenleri *Fusarium* spp., *Pythium* spp., *Rhizoctonia* spp. ve Antraknoz etmeni olan *Colletotrichum lagenarium* olarak sıralanabilir (Kurt, 2020).

Viral ve fungal hastalık etmenlerinin yansısı kabakgillerde sorun teşkil eden bakteriyel hastalık etmeni sayısı da oldukça fazladır. Bu hastalık etmenleri *Acidovorax citrulli* (Schaad et al.), *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* (Smith & Bryan) Young, Dye & Wilkie, *Pseudomonas viridiflava* (Burkholder) Dowson, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (Van hall), *Pseudomonas cichorii* (Swingle) Stapp, *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* (Brown & Jamieson) Young, Dye & Wilkie, *Pseudomonas fluorescens* (Migula), *Pectobacterium caratovorum* subsp. *caratovorum* (Jones) Hauben et al., *Pantoea ananatis* (Serrano) Mergaert, Verdonck & Kersters, *Erwinia tracheiphila* (Smith) Bergey et al., *Erwinia carnegiena* (Standring) Brenner (Zitter, 1996), bazı *Enterobacter* üyeleri (Özdemir, 2021), *Dickeya dadantii* (Samson et al), *Xanthomonas campestris* pv. *cucurbitae* (Bryan) Vauterin, Hoste, Kersters and Swings, *Ralstonia solanacearum* (Smith) ve *Sphingomonas melonis*, şeklinde sıralanabilir.

Bu hastalık etmenlerinden ülkemizde sorun olduğu tespit edilenler ise; *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* (Karaca ve Demir, 1988), *Acidovorax citrulli* (Demir, 1996), *Pseudomonas viridiflava* (Aysan ve ark., 2003), *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (Dillon ve ark., 2021), bazı *Enterobacter* üyeleri (Özdemir, 2021) ve *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Aysan ve ark., 2006) şeklinde sıralanabilir (Çizelge 1.1). Bahsedilen bakteriyel hastalık etmenlerinin hepsi üretim materyali kökenli olmakla birlikte; ilk belirtileri kabakgil fidelerinin kotiledon yapraklarında su emmiş/yağ emmiş lekeler şeklinde kendini gösterir. Bunlar tohum kökenli bakteriyel hastalık etmenlerinin karakteristik ilk belirtileridir.

Çizelge 1.1. Kabakgillerde görülen önemli bakteriyel hastalık etmenleri

Ülkemizde Görülen Kabakgil Bakteriyel Hastalık Etmenleri	Ülkemizde Görülmeyen Kabakgil Bakteriyel Hastalık Etmenleri
<i>Acidovorax citrulli</i>	<i>Dickeya dadantii</i>
Bazı <i>Enterobacter</i> üyeleri	<i>Erwinia tracheiphila</i>
Bazı Fluorescent <i>Pseudomonas</i> türleri	<i>Erwinia carnegiena</i>
<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	<i>Pantoea ananatis</i>
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lachrymans</i>	<i>Pseudomonas cichorii</i>
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>Pseudomonas viridiflava</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>aptata</i>
	<i>Ralstonia solanacearum</i>
	<i>Sphingomonas melonis</i>
	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>cucurbitae</i>

Ülkemizde varlığı bilinen ve kabakgillerde hastalık yaptığı kanıtlanmış olan etmenler içinde 2009 yılında Çukurova Bölgesinde büyük bir epidemi yapması nedeniyle ilk akla gelen etmen karpuzda Bakteriyel Fide Yanıklığı ve Meyve Lekesi Hastalığı etmeni olan *Acidovorax citrulli*'dir. Bu patojen bakteri ülkemizde ilk kez 1996 yılında Edirne şehrine bağlı Enez ilçesinde görülmüş ve etmenin yıkıcı özelliği bilindiği için, bu üretim alanı tamamen yakılıp temizlenmiştir (Demir, 1996). Bu tarihten itibaren dokuz yıl boyunca varlığına hiç rastlanmayan etmenin önce 2004 yılında Doğu Akdeniz'de karpuzda ve 2011 yılında ise kavunda varlığı tespit edilmiştir (Mirik ve ark., 2006; Horuz ve ark., 2014). *Acidovorax citrulli*, adından da anlaşılacağı üzere fidelerde yanıklık ve meyvelerde nekrotik lekeler şeklinde tipik belirtilere sahiptir. Bakteriyel hastalık etmenlerinin tamamında olduğu gibi ilk bulaşıklık kaynağının üretim materyali olması sebebiyle ilk belirtilerini kotiledon yapraklarda su emmiş lekeler şeklinde gösterir. Kabakgillerin tamamında hastalık yapabilmekle birlikte, asıl zararını kavun ve karpuzda vermektedir (Horuz ve ark., 2018).

Pseudomonas viridiflava ülkemizde ilk kez 2003 yılında kavun ve karpuz yetiştiriciliğinin yapıldığı ticari bir fidelikte tespit edilmiştir (Aysan ve ark., 2003). Kotiledon yaprakların altında ilk belirtisini veren *Pseudomonas viridiflava* sulu bir lezyon şeklinde ortaya çıkabilir. İlerleyen aşamada

gerçek yapraklarda düzensiz şekilli, nekrotik sarı haleli lekeler şeklinde bitkiyi ölüme kadar götürebilmektedir (Al-Fallooji ve ark., 2020).

Oldukça geniş bir konukçu dizisine sahip olan *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, birçok sebze de olduğu gibi kabakgıl familyasında da yumuşak çürüklüğe sebep olan etmenlerin başında gelmektedir (Gardan ve ark., 2003). Hastalık etmeni bir iletim demeti patojeni (trakeobakteri) olması nedeniyle mücadelesi oldukça zordur (Aysan ve ark., 2006). Etmenle bulaşık topraklarda uzun yıllar konukçu bitkilerin yetiştirilmemesi önerilmektedir (Adeolu ve ark., 2016). Özdemir'in yaptığı bir çalışmada bildirdiğine göre ülkemizde artık *Enterobacter cloacae*, *Kosakonia cowanii* ve *Klebsiella pneumoniae*'nin varlığı tespit edilmiş ve bu patojenik bakteri türlerinin de kavun bitkilerinde yumuşak çürüklüklere neden olduğu kanıtlanmıştır (Özdemir 2021).

Ülkemizde varlığı yaklaşık 35 yıldır bilinmekte olan ve Hıyar Köşeli Yaprak Leke hastalığına sebebiyet veren *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* (Smith and Bryan) Young et al. (*PsI*) hıyar bitkilerindeki en önemli bakteriyel hastalık etmenidir. Aerobik özellikte olan, gram-negatif, 1-5 polar kamçıya sahip bir bakteridir. Bu patojen bakterinin optimum gelişme sıcaklığı 25-27°C'dir (Özaktan ve Bora, 1994). Hastalık etmeninin tanısını ve mücadelesini sağlamak amacıyla bazı araştırmalar yürütülmüştür (Aksoy, 2006). Batı Anadolu bölgesinde yapılan bir çalışmada, hastalık şiddetinin illere göre farklılık gösterdiği ve %32'ye kadar ulaştığı belirlenmiştir. Hastalığın yaygınlık oranının ise %30.5 olduğu saptanmıştır (Türküsay, 1998). *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*, bitki artıkları aracılığıyla toprağa bulaşarak burada 1-2 yıl yaşamını sürdürebilir, ancak bitki artıkları bulunmadığında toprakta uzun süre varlığını sürdüremez. Etmen üretim materyali kökenli olması sebebiyle ilk belirtilerini kotiledon yapraklarda verir, ilerleyen hastalık gerçek yapraklarda damarlarla sınırlanmış köşeler şeklinde kendine özgü bir belirti ile karşımıza çıkar. Bu lekelerin zamanla rengi değişir önce sarı ardından kahverengileşir ve hücreler ölür. Ölen hücreler dökülerek yapraklarda düzensiz deliklere sebebiyet verir. Hastalık, yağmur, sulama ve bakım işlemleri sırasında yayılır ve bu yayılıştaki sulama suyunun önemli bir rolü vardır. Sıcak ve nemli iklim koşulları hastalığın gelişimini teşvik eder (Mortensen ve Fatmi, 2017). Sabahın erken saatlerinde veya yüksek nem koşullarında yaprağın alt yüzeyinde bakteriyel akıntı gözlemlenebilir ve daha sonra bu akıntı beyazımsı bir kabuk benzeri şekilde kurur. Hastalıkla mücadelede kültürel önlemler arasında, hastalıktan arındırılmış tohum ve dirençli çeşitlerin kullanımının yanı sıra, ürün rotasyonu, hastalıklı bitki artıklarının temizlenmesi, özellikle seralarda etmenin gelişimi için uygun ortamın engellenmesi, nem dengesinin korunması ve vektörlerle mücadele önemli bir yere sahiptir. Kimyasal mücadelede, koruma amacıyla bakır bileşikler, Maneb ve Mancozeb gibi maddelerin kullanılabileceği belirtilmektedir (EPPO, 2004).

Hastalıkla mücadelede kültürel önlemlerin her zaman istenilen sonucu vermediği ve kimyasal mücadelenin çevre ve insan sağlığına potansiyel riskler taşıdığı gerçeği, kimyasal mücadeleye alternatif

m¼cadele yöntemlerinin özellikle biyolojik m¼cadelenin (Horuz ve Aysan, 2023) araştırılmasını teşvik etmektedir. Bu baēlamda, biyolojik m¼cadelenin önemli bir alternatif olabileceēi d¼ř¼n¼lebilir. Bu tez çalışması çerçevesinde ilk olarak ticari fideliklerde yaygın olarak bulunan kabakgil hastalık etmenlerinin neler olduēunu tespit etmek, ülkemizde varlıēı tespit edilmemiş hastalık etmenlerinin varlıēını kontrol etmek amaçlanmıştır. Bir diēer amaç ise ülkemizde varlıēı uzun yıllardır bilinen *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*'ın neden olduēu Hıyar Köşeli Yaprak Leke Hastalıēı'nın m¼cadelesinde yerel antagonistleri kullanarak biyolojik tohum uygulamalarının kullanım potansiyelini ortaya koymak olmuştur.



2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Carsner'ın (1918) bildirdiğine göre; *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*'ın bilinen ilk çalışmasını Smith ve Brayn, 1915 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde yapmıştır. Smith ve Brayn hastalık etmenini tanımlarken etmenin konukçusunda oluşturduğu gözyaşı benzeri bakteriyel akıntılardan ilham alarak, Latince'de gözyaşı anlamına gelen "lachrymans" kelimesini seçmiş ve bu patojeni *Bacterium lachrymans* olarak adlandırmışlardır. Carsner (1918), Smith ve Brayn'ın önceki çalışmalarını temel alarak yeni araştırmalara imza atmış ve sonuç olarak yeni keşfedilmiş olan bu patojene "*Pseudomonas lachrymans*" ismini vermiştir. Zamanla, bu patojen farklı isimlerle tanımlanmasına rağmen, Young ve Wilkie (1978) tarafından *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* olarak adlandırılmış ve bu isim günümüzde de kabul görmüştür.

Tohum kökenli olan bu hastalık, tohum ticaretiyle kabakgil yetiştirilen pek çok ülkeye bulaşmış ve varlığı rapor edilmiştir (Zitter ve ark., 1996). Ülkemizde bu hastalıkla ilgili çalışmalar incelendiğinde, ilk araştırma Karaca ve Demir (1988) tarafından yapılan farklı bitkilerde sorun olan tohum kökenli bakteriyel hastalıkların tespiti. Bu kapsamda Ege Bölgesinde hıyardan *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*'ı izole etmişlerdir. Ardından, bu hastalığın Karadeniz Bölgesinde Samsun ilinin Bafra ilçesinde (Aksoy, 2006) ve Akdeniz Bölgesinde Antalya ilinde (Basım, 2012) varlığı bildirilmiştir.

Ülkemizde bu hastalığın mücadelesi ve farklı çeşitlerdeki reaksiyonları üzerine çalışmalar yapılmıştır. Özaktan ve Bora (1994) *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*'ın neden olduğu hastalığa kavun, tüylü salatalık ve balkabağının oldukça duyarlı olduğunu kabak, salatalık ve karpuz çeşitlerinin orta veya zayıf derecede duyarlı olduğunu belirlemişlerdir.

Türküsay ve Saygılı (2008) Batı Anadolu Bölgesinde yetiştirilen hıyarlarda *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*'ın neden olduğu Hıyar Köşeli Yaprak Leke hastalığının şiddetini ve sıkça kullanılan çeşitlerin patojenlere karşı direnci, toleransı veya duyarlılığını da araştırmışlardır. Hastalık şiddetinin ortalama değerleri, Manisa'da %32.7, Bursa'da %17.0, Balıkesir'de %16.1 ve İzmir'de %15.3 olarak hesaplanmıştır. Turşuluk çeşitleri arasında Ophix, Fancipak ve AG 1204, sofralık çeşitler arasında ise Reia, Sahara, Vlasstar, Octopus diğer çeşitlere göre patojene daha az duyarlı bulunduğu tespit edilmiştir.

Bu hastalığın biyolojik mücadelesi ile ilgili çalışmalar incelendiğinde, 80'li yılların sonunda başladığı ve halen devam ettiği görülmektedir. Burada ülkemizde ve farklı ülkelerde yapılan biyolojik mücadele araştırmalarına yer verilmiştir.

Stankiewicz ve ark. (1990) tarafından; hıyar rhizosfer ve filosferinde bulunabilen *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Enterobacter* ve *Saccharomyces* gibi mikroorganizmaların biyolojik mücadele elemanı

olma potansiyellerinin olduğu bildirilmiştir. *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*'ı baskılama mekanizması olarak antibiyosis ve besin için rekabetin etkili olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Liu ve ark. (1995) *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*'ın neden olduğu hıyarda Köşeli Yaprak Leke Hastalığının biyolojik mücadelesinde bitki büyümesini teşvik eden kök bakterilerinden (PGPR) *Pseudomonas putida* 89B-27 ve *Serratia marcescens* 90-166 adlı iki izolatı tohuma kaplama şeklinde kullanmışlardır. Uygulama görmüş tohumlardan gelişen fidelerin kotiledon yapraklarındaki lekelerde istatistiksel olarak önemli oranda azalışlar tespit edilmiştir. Ayrıca bu antagonistler yaprağa kolonize olduğu yapraktaki patojen popölasyonunun da azaldığını belirlemişlerdir. Sonuç olarak, bu hastalığın entegre mücadelesinde PGPR'ların kullanımının öneminden bahsetmişlerdir.

Wei ve ark. (1996) *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*'ın neden olduğu hıyarda Köşeli Yaprak Leke Hastalığının biyolojik mücadelesinde bitki büyümesini teşvik eden kök bakterilerini (PGPR) kullanarak bitkideki sistemik dayanıklılığı uyarımlardır. Dayanıklılığın teşviki üzerine yapılan bu araştırmalar iki yıllık bir süre boyunca üç tarla denemesiyle incelenmiştir. PGPR, tek başına tohum muamelesi olarak veya ekim sırasında tohum muamelesi ile toprak ıslatma olarak uygulanmıştır. PGPR ile bitkide hastalıklara dayanıklılık uyarıldığında hem *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*'ın neden olduğu hıyarda Köşeli Yaprak Leke Hastalığı hem de fungal etmen *Colletotrichum orbiculare*'nin neden olduğu Antraknoz Hastalığı şiddetinde istatistiksel olarak önemli düzeyde azalış tespit edilmiştir.

Raupach ve Kloepper (1998) bitki büyümesini teşvik eden rizobakteriler (PGPR) olan *Bacillus pumilus* INR7, *Bacillus subtilis* GB03 ve *Curtobacterium flaccumfaciens* ME1 izolatlarını hıyar tohumlarına ve yeşil aksama uyguladıklarında fungal ve bakteriyel hastalıkların önemli oranda azaldığını bildirmişlerdir. İki yıl boyunca yapılan tarla denemelerinde hıyarda *Colletotrichum orbiculare*'nin neden olduğu Antraknoz Hastalığı, *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*'ın neden olduğu Köşeli Yaprak Leke Hastalığı ve *Erwinia tracheiphila*'nın neden olduğu Kabakgillerde Solgunluk Hastalığı olduğu azalmıştır. Bu denemeler biyolojik mücadele etmenlerinin patojen popölasyonunu azalttığını, bitkide dayanıklılığı teşvik ettiğini ve verimi arttırdığını göstermiştir.

Kokalis-Burelle ve ark. (2003) kavun ve karpuzda sorun olan bir nematod, bir fungal etmen olan *Didymella bryoniae* ve bir bakteriyel etmen olan *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*'ın neden olduğu hastalıkların mücadelesinde, bitki büyümesini teşvik eden rizobakterilerden (PGPR) olan *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus pumilus*'un etkisini sera ve tarla denemeleriyle araştırmışlardır. Hastalık çıkışlarında istatistiksel olarak azalış kaydedilirken bitki büyümesinde artışlar meydana gelmiştir. Kavunda *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*'ın neden olduğu yaprak lekesi kontrol parselinde ortalama 125 leke iken PGPR uygulanmış bitkilerde ortalama 44.8 ile 93.0 leke arasında değişmiştir. Biyolojik mücadele elemanları kavunda bakteriyel kökenli hastalığı %26-64 oranında azaltmıştır.

Yedidia ve ark. (2003) hıyar bitkilerinde hastalıklara dayanıklılığı uyarmak için *Trichoderma asperellum* adlı antagonistik fungusu köke uygulanmasıyla köklere kolonize olan antagonist bitkide fenolik yapıdaki bileşikleri (fenilalanin, amonyak liyaz ve hidroksiperoksit) sentezleyerek ve fitoaleksinlerin sistemik birikmesine yol açarak dayanıklılığı uyardığını tespit etmişlerdir. Böylece hıyarda *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*'ın neden olduğu bakteriyel hastalık belirtilerinde %80'e varan azalışlar tespit edilmiştir. Araştırmacılar hastalığı baskılamada ve bitkide dayanıklılık mekanizmasını uyardırmada etkili olan bu bileşiklerin gelecekte hastalık yönetiminde kullanım olanaklarının olabileceğinden bahsetmişlerdir.

Acar ve ark. (2008) hıyar, domates ve patatesten hastalığa neden olan bazı fungal ve bakteriyel hastalık karşı bir bitki güçlendiricisi olan Elexa karşısındaki durumunu araştırmışlardır. Sonuç olarak bu ürün, hıyarda *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*'ı, domates ve patatesten *Botrytis cinerea*, *Pseudoperanospora cubensis* ve *Phytophthora infestans*'ı başarılı bir şekilde engelleyerek %60'a varan bir koruma sağladığını bildirmişlerdir.

García-Gutiérrez ve ark. (2012) kavunda *Podosphaera fusca*'nın neden olduğu Külleme Hastalığı ve *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*'ın neden olduğu Köşeli Yaprak Leke Hastalığının biyolojik mücadelesinde bitki büyümesini teşvik eden rizobakterilerden (PGPR) olan *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* ve *Pseudomonas fluorescens*'un etkisini araştırmışlardır. Bu PGPR izolatları tohumu uygulandığında kavunda hastalıklara karşı sistemik dayanıklılık aktive edilmiş ve bakteriyel hastalık %16-61 oranında baskılanmıştır. Ayrıca bu uygulamalar bitki büyümesinde %30'luk bir artışa neden olmuştur. Elde edilen veriler kavun üretiminde entegre hastalık yönetiminde PGPR kullanımının ümit var sonuçlara sahip olduğunu göstermiştir.

Özaktan ve ark. (2013) hıyarlardan elde edilen endofitik bakteriler ile *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*'un neden olduğu Hıyar Solgunluğu ve *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*'ın neden olduğu Hıyar Köşeli Yaprak Leke Hastalığına karşı biyolojik mücadele olanaklarını araştırmışlardır. Çalışmalar sonucunda elde edilen 104 adet endofitik bakterinin %30'undan fazlasının IAA üretme yeteneğinde olduğu, ortalama %46'sının 3-19 mm arasında değişen siderofor zonları ürettiği ve %29'unun fosfat çözme yeteneğinde olduğu belirlenmiştir. *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*'ı engelleme oranını belirlemek için yapılan ikili kültür petri denemelerinde ise 104 endofitik bakterinin 23 tanesinin 2-7 mm arasında değişen inhibisyon zonları ile patojen bakteriyi baskılayabildiği tespit edilmiştir.

Akbaba ve Özaktan (2018) *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*'ın neden olduğu Hıyar Köşeli Yaprak Leke Hastalığının biyolojik mücadelesinde endofitik bakterilerin etkisini araştırmışlardır. Sağlıklı hıyar bitkilerinin kök, gövde ve yapraklarından izole ettikleri antagonist bakterilerin seçiminde antibakteriyel etki, siderofor üretimi, indol-3-asetik asit üretimi ve fosfat çözme yeteneklerini

araştırmışlardır. Yapılan saksı denemelerinde CB361-80 ve CC372-83 kodlu endofit bakteri izolatları hastalık gelişimini baskımlarken bitkide büyümeı teşvik etmişlerdir. Ayrıca bu antagonistler tohuma uygulandıında büyüyen yeşil aksamda da antagonist bakteri kolonize olmayı başarmıştır. Bu etkili antagonistler *Ochrobactrum pseudintermedium* ve *Pantoea agglomerans* olarak tanılanmıştır.

Akköprü ve Özaktan (2018) *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*'ın neden olduğu hıyarda Köşeli Yaprak Leke Hastalığının biyolojik mücadelesinde köke kolonize olan bakterilerin etkisini araştırmışlardır. Serada topraksız bir yetiştirme sisteminde yapılan denemelerde kök bakterilerinden *Pseudomonas putida* AA11/1 kodlu izolatın ve bir bitki aktivatörü olan asibenzolar-S-metil (ASM)'in sırasıyla hastalığı duyarlı çeşitte %69 ve %34, toleranslı çeşitte ise %92 ve %21 oranında azalttığını belirlemişlerdir. Uygulamaların meyve verimini duyarlı ve toleranslı çeşitte sırasıyla %68 ve %33 oranında önemli ölçüde artırdığını bildirmişlerdir. Bu araştırma kök bakterilerinin hem hastalığı azalttığını hem de verimi arttırdığını göstermektedir.

Luo ve ark. (2019) hıyar filosferinde bulunan mikrobiyal toplulukları ve bunların değışiminin, hıyarda Köşeli Yaprak Leke Hastalığına neden olan patojen bakteri *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*'la olan ilişkisini araştırmışlardır. Farklı bölgelerden alınan yaprak örneklerinde mikrobiyal topluluğun yapısının değıştikçe patojen popölasyonun da değışime uğradığını belirlemişlerdir. Yaprak yüzeyindeki mikrobiyal topluluğun çeşitliliği ve rekabeti arttıkça patojen popölasyonu stabil kalırken, mikrobiyal topluluğun istikrarı bozulduğunda ekosistemin işleyişinin bozulduğunu ve patojen popölasyonda artış olduğunu belirlemişlerdir.

Akköprü ve ark. (2021) *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*'ın neden olduğu hıyarda Köşeli Yaprak Leke Hastalığının biyolojik mücadelesinde kullanılan endofitik bakterilerin yeşil aksama kolonizasyonu, kalıcılığı, bitki büyümesine, verime ve hastalık baskılanmasına etkisi konusunda çok önemli veriler elde etmişlerdir. Endofitik bakterilerin uzun vadeli popölasyon dinamiklerini incelediklerinde, bunların bitkinin her yerine kolonize olduğunu ve sistemik olarak da taşınabildiğini göstermişlerdir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Çalışma Alanı: Adana ilinde kabakgil fidesi yetiştiren ticari fidelikler, Çukurova Üniversitesi Bitki Koruma Bölümü Bakteriyoloji laboratuvarı ve iklim odası çalışma alanı olarak kullanılmıştır.

Besi Yerleri: Çalışmada patojen ve antagonist bakteri izolatlarının gelişmesi ve saklanması için Tryptic Soy Agar (TSA) (40 gr/L), Nutrient Broth (NB) (8 gr/L), King B (Proteose peptone 20 g/L, gliserin 10 ml/L, K₂HPO₄ 1.5 g/L, MgSO₄·7(H₂O) 1.5 g/L, agar 15 g/L) ve Yeast Dekstroz Kalsiyum Karbonat Agar (YDCA) (yeast extract 10gr/L, dextrose 20 gr/L, CaCO₃ 20 gr/L, agar 15 gr/L.) besi yerleri kullanılırken (Lelliott ve Stead, 1987), antagonistlerin etki mekanizmalarının araştırıldığı kısımda Pikovskaya Agar (PVK), Mavi Chrome Azurol-S (CAS) Agar ve Luria Bertani Broth (LB) (tryptone 10 gr/L, yeast extract 5 gr/L, NaCl 10 gr/L, pH: 7.0) besiyerleri (Sezonov ve ark., 2007) kullanılmıştır (Chung ve ark., 2005, Schwyn ve Neilands, 1987).

Alet ve Makinalar: Çalışmada saf su cihazı, hassas terazi, magnetik karıştırıcı, Ph metre, otoklav, etüv, sıcak su banyosu, steril kabin, buzdolabı, inkübatör, McFarland dansiyometre ve erlen çalkalayıcı kullanılmıştır.

İklim Odası: Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma bölümünde bulunan, klima ile ısıtılan ve soğutulan 26±2°C sıcaklıkta, %65-75 nem içeriğinde, gündüz 16 saat aydınlık, gece 8 saat karanlık koşullara sahip, iklim odasında patojenite testleri ve tohum denemeleri yapılmıştır.

Bakteri Kültürü: Denemelerde bakteri kültürü olarak 2023 yılında izole edilen ve tür düzeyinde tanısı yapılan *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* kullanılmıştır. Patojenin alt tür düzeyindeki tanısı bu tez çalışması kapsamında yapılmıştır. Karşılaştırma kültürü olarak YA-913 kodlu *Acidovorax citrulli*, YA-95 kodlu *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, YA-241 kodlu *Erwinia amylovora*, YA-713 kodlu *Pectobacterium caratovorum*, YA-731 kodlu *Pseudomonas corrugata* ve YA-26 kodlu *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* kullanılmıştır.

Tohum/Fide ve Torf: Çalışmada ticari olarak satın alınan Borna çeşidi hıyar fideleri, Hermanos, FK-202 ve Bravos çeşidi kavun fideleri, Miço çeşidi kabak fideleri, Karain ve Sahra çeşidi karpuz fideleri ile; Beith alpha çeşidi hıyar tohumu ve üreticiden temin edilen ilaçsız yerli hıyar tohumları kullanılmıştır. Torf olarak ise Klasman Torf Potgrond P ürünü kullanılmıştır.

3.2. Metot

3.2.1. Ticari Fidelik Ziyaretleri ve Hastalıklı Bitki Örneklerinin Toplanması

Adana ilinde birçok ticari fidelik bulunmakta ve bu ticari fideliklerin tamamında kabakgillerin üretimi yoğun olarak yapılmaktadır. Ticari fideliklerde üretilen hıyar, karpuz ve kavun fidelerinin Adana, Mersin, Osmaniye, Hatay, Maraş ve Adıyaman illerinde bulunan üreticilere sevkiyatı şubat ayının başından itibaren başlamaktadır. Benzer şekilde kabak ve balkabağı fidelerinin sevkiyatı da eylül-ekim aylarında yapılmaktadır. Bu tarihler göz önünde bulundurularak, kabakgil yetiştiriciliği yapılan ticari fideliklere fide sevkiyatının hazır olduğu dönemde ziyaretlere başlanmıştır. İlk ziyaret 3 Şubat 2023 tarihinde yapılmıştır ancak 6-7 Şubat 2023 tarihinde yaşanan deprem felaketi nedeniyle fidelik incelemelerine ara verilmek zorunda kalınmıştır. Bu süreçte ticari fidelikler yetiştirdikleri fidelerin sevkiyatını zaten yapamamış ve satışa hazır fideler ticari fideliklerde muhafaza edilmek zorunda kalınmıştır. Deprem sonrası 1 Mart 2023 tarihinde tekrar ticari fidelik ziyaretlerine başlanmış ve incelemelere 14 Mart 2023 ve 30 Mart 2023 tarihlerinde devam edilmiştir (Şekil 3.1 ve Şekil 3.2).

Daha önce Adana ilinde *Acidovorax citrulli*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* ve *Pseudomonas viridiflava*'nın neden olduğu kabakgil bakteriyel hastalıklarının varlığı rapor edildiği için bu patojenlerin sorun olduğu bilinmektedir. Bunlar yanında *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*, bazı *Enterobacter* üyeleri (*Enterobacter cloacae*, *Kosakonia cowanii* ve *Klebsiella pneumoniae*), *Pectobacterium carotovorum*, *Dickeya dadantii*, *Xanthomonas campestris* pv. *cucurbitae*, *Ralstonia solanacearum* ve *Sphingomonas melonis*'in neden olduğu bakteriyel hastalıkların Adana ilinde varlığı konusunda araştırma yapılmıştır. Bahsedilen bu bakteriyel hastalık etmenlerinin hepsi tohum kökenlidir ve tohum kökenli bakteriyel hastalıklar da ilk belirtilerini her zaman kotiledon yapraklarda su emmiş ıslak lekeler şeklinde oluşturmaktadır (Horuz ve Aysan, 2023). Bu ilk belirtiler tohum kökenli bakteriyel hastalık etmenleri için ortaktır. Kabakgillerin kotiledon yapraklarında su emmiş gibi görünen ıslak lekeler bakteriyel bir hastalığın varlığını kanıtlar nitelikte olduğundan ticari fideliklerden hastalıklı bitki örnekleri toplanırken kotiledon yapraklardaki su emmiş lekeler referans noktası olarak kullanılmıştır. Fidelik ziyaretlerinde inceleme yapılırken bitkilerin kotiledon yaprakları ve ardından gerçek yaprakları son derece dikkatli bir şekilde incelenmiştir. Gerçek yapraklarda özellikle yaprak kenarlarında sarımsı haleler bulunan nekrotik lekeler, yaprakta ve/veya gövde dokularında yumuşak çürüklük belirtileri gösteren örnekler toplanmıştır.



Şekil 3.1. Ticari fideliklerin incelenmesi ve hasta bitki örneklerinin toplanması



Şekil 3.2. 14 Mart 2023 tarihinde yapılan ticari fidelik ziyareti

Kabakgil bitkilerine ait hasta bitki dokuları kâğıt havlu arasına sarılarak kese kağıdı içerisinde Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümünde bulunan Bakteriyoloji laboratuvarına getirilmiştir. Hasta örneklerden patojen bakteri izolasyonu yapılana kadar hasta dokular +4 C'de buzdolabında muhafaza edilmiştir.

3.2.2. Hasta Bitkilerden Patojen Bakteri İzolasyonları

Farklı tarihlerde ticari fideliklere yapılan ziyaretlerde 82 adet bitkide hastalık belirtileri tespit edilmiş ve ayrıca her bir tohum lotundan gelişen fidelerin yer aldığı viyollerden en az iki adet olmak üzere toplam 10 adet hasta kabakgil (hıyar, kavun ve kabak) bitkileri toplanmıştır. Bu bitkilerden patojen izolasyonu yapılana kadar örnekler buzdolabında muhafaza edilmiştir.

Laboratuvarda hasta bitki dokuları (kotiledon ve gerçek yapraklar) önce akan çeşme suyunda yıkanmış ve ilaç kalıntıları (özellikle mavi renkli olarak görülen bakırlı preparatlar) uzaklaştırılmıştır. Kağıt havlu üzerinde tamamen kuruyuncaya kadar örnekler bekletilmiştir. Çalışma alanı %70'lik alkolle silinerek bir kağıt havlu yayılmış ve üzerine hasta bitki dokuları yerleştirilmiştir. Ardından, steril bir bistüri yardımıyla hastalıklı ve sağlıklı kısmı içerecek şekilde tek bir lekeden 3-4 mm boyutunda doku örnekleri alınmıştır. Alınan bu leke %70'lik alkol ile yüzeyden dezenfekte edilmiş ve steril porselen havanlara konulmuştur. Havanların içerisindeki örnek havaneli yardımıyla iyice ezilerek üzerine 3 ml Saline Buffer (%0.85'lik NaCl çözeltisi) eklenerek homojenize edilmiştir. TSA besi yeri içeren petriler çizim yapılmadan önce kapakları steril kabinde açılarak yüzeyindeki nem uzaklaştırılmıştır. Steril kabinde 15 dakika bekletilen havanlardan bir öze dolusu (yaklaşık 10µl) homojenat alınarak petrilere üç çizgi yöntemi ile çizimler yapılmıştır (Lelliot ve Stead, 1987). Petrilerin ağzı parafin sarılarak kapatılmıştır. İzolasyon petrileri 26°C'de inkübatörde 24-48 saat inkübe edilmiş ve gelişen koloniler incelenmiştir. Besiyerinde baskın olarak gelişen beyaza yakın krem renkli tek koloniler seçilerek TSA besiyerine saflaştırmalar yapılmıştır.

3.2.3. Bakteri İzolatlarının Tanısı

Hasta bitkilerden yapılan izolasyonlar sonucunda saflaştırılan bakterilerin tanısında Gram reaksiyon, LOPAT testleri (Lelliot ve Stead, 1987), TSA ve King B besiyerlerindeki koloni morfolojisi ve MALDI-TOF MS yöntemi (Soylu ve ark., 2020) kullanılmıştır.

Potasyum Hidroksit ile Gram Reaksiyon: Gram reaksiyonları belirlenecek tüm kültürler TSA besiyerine çizilerek 24 saat geliştirilmiştir. Bu test için taze hazırlanmış olan %3'lük KOH (potasyum hidroksit) çözeltisi kullanılmıştır. Bu çözelti lamalar üzerine bir damla damlatılmış ve taze geliştirilmiş patojen bakteriler kürdan yardımıyla bu damlaya bulaştırılarak yavaşça karıştırılmıştır. KOH, Gram

negatif bakterilerin hücre duvarı ve zar yapısını bozarak hücrelerin ölümüne ve iç yapıların açığa çıkmasına neden olur, bu sayede kürdan yukarı doğru yavaşça kaldırıldığında viskoz bir durum meydana gelir, karışımında iplik gibi bir uzama/sünme oluşur. Bu reaksiyon bakterinin Gram negatif olduğunu göstermektedir. Çalışmada karşılaştırma amacıyla laboratuvar kültür stoğunda bulunan Gram negatif özelliğe sahip *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (YA-26 kodlu) ve Gram pozitif özelliğe sahip *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (YA-95 kodlu) kültürü kullanılmıştır.

TSA ve King B Besiyerlerinde Koloni Morfolojisi: Elde edilen izolatlar TSA ve King B besiyerlerine üç çizgi yöntemiyle çizildikten sonra $26 \pm 1^\circ\text{C}$ de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra TSA besiyerinde tek koloni gelişen izolatların koloni rengi, büyüklüğü, yüksekliği, kenar şekli ve kıvamı not edilmiştir. Ayrıca, King B besiyerine çizilen bu izolatların floresan pigmentasyon özelliği değerlendirilmiştir (Schaad ve ark., 2001). Çalışmada karşılaştırma amacıyla laboratuvar kültür koleksiyonunda bulunan floresan özelliğe sahip *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (YA-26 kodlu) ve non-floresan özelliğe sahip *Pseudomonas corrugata* (YA-731 kodlu) kültürü kullanılmıştır.

Levan Oluşumu: Levan oluşumu, levan sükras enziminin sakkaroz üzerindeki aktivitesi ile oluşmaktadır. Bir litre steril saf su içerisine 23 gram Nutrient agar ve 5 gram sükröz konulmuş ve 121°C 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir. Sıcak su banyosunda $50 \pm 2^\circ\text{C}$ sıcaklığa kadar soğutulan besi yeri petrilere dökülmüştür ve ardından patojen bakteriler bu besiyerine üç çizgi ekimi şeklinde ekilmiştir. Petriler $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 'de 2-3 gün inkübe edildikten sonra ortamda mukoid ve kubbemsi koloni gelişimi pozitif olarak kabul edilmiştir. Çalışmada levan tipte koloni oluşturan *Erwinia amylovora* (YA-241 kodlu) izolatı karşılaştırma amacıyla kullanılmıştır.

Oksidaz Testi: TSA besiyerinde 24 saat geliştirilen patojen bakteri izolatları taze hazırlanan %1'lik N:N:N:N- Tetrametilyl,4 phenylene diammonium diclorid solüsyonu damlatılmış kurutma kağıtları üzerine steril plastik öze yardımıyla sürülmüş ve 15 saniye sonra renk değişimi maviye dönmesi pozitif olarak değerlendirilmiştir. 15 saniyeden daha uzun bir sürede maviye dönüşüm pozitif sayılmamıştır. Çalışmada oksidaz pozitif özellikteki *Acidovorax citrulli* (YA-913 kodlu) ve oksidaz negatif özellikteki *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (YA-26 kodlu) izolatları karşılaştırma amacıyla kullanılmıştır.

Patateste Pektolitik Enzim Aktivitesi: Patates yumruları toprak ve yabancı maddeler temizlendikten sonra %1'lik sodyum hipoklorid ile dezenfekte edilmiş ve ardından steril distile su ile durulanmıştır. Yaklaşık 1 cm kalınlığında dilimlenen patatesler nemli, steril filtre kâğıdı içeren steril cam petrilere yerleştirilmiştir. TSA besiyerinde 24 saat geliştirilen kabakgil izolatlarından hazırlanan bakteri süspansiyonları (10^7 hücre/ml) patates dilimlerinin üzerine 100µl damlatılmıştır. Petriler $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 'de 2-3 gün inkübe edildikten sonra patates dilimlerinde görülen yumuşak çürüklük oluşumu pozitif olarak

değerlendirilmiştir. Çalışmada pektolitik enzim üreten *Pectobacterium carotovorum* (YA-713 kodlu) izolatu karşılaştırma amacıyla kullanılmıştır.

Arginin Dehidrolase Testi: Arginin dehidrolase testi için 1.0 g Peptone, 5.0 g NaCl, 0.3 g K₂HPO₄, 0.01 g Phenolred, 10 g L - Arginin HCL ve 3 g Agar 1000 ml saf su içerisinde ısıtılmıştır. Hazırlanan besi ortamı sıcak su banyosunda 45°C'ye kadar soğutulduktan sonra Ph:7.2 olacak şekilde ayarlanmış ve 10 ml'lik cam tüplere 3'er ml olacak şekilde konulmuştur. Tüpler 121°C'de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir. Otoklavdan çıkarılıp soğutulan tüplere steril bir öze yardımıyla kabakgıl bakteri kültürleri bulaştırılmış ve tüplerin üzeri steril parafin ile kaplanmıştır. Karşılaştırma kültürü olarak arginin dehidrolase testi pozitif olan *Pseudomonas corrugata* (YA-731 kodlu) izolatu kullanılmıştır. Bakteri aşılama tüpler 10-12 günlük inkübasyondan sonra besi ortamını koyu pembe-kırmızı rengi açık pembeyle çeviren kültürler pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Tütünde Aşırı Duyarlılık Reaksiyonu: TSA besiyerinde 24 saat geliştirilmiş olan kabakgıl bakteri izolatları steril distile su ile karıştırılarak 10⁷ hücre/ml yoğunluğunda süspansiyonlar hazırlanmıştır. Hazırlanan süspansiyonlar, steril enjektör yardımıyla *Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun-NN çeşidi tütün yaprağının iki damar arasına inoküle edilmiştir. İnoküle edilen alanlarda 24-48 saat içinde oluşan nekrotik görünüm pozitif olarak kabul edilmiştir. Çalışmada tütünde aşırı duyarlılık reaksiyonu pozitif olan *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (YA-26 kodlu) izolatu karşılaştırma amacıyla kullanılmıştır.

Bakteri İzolatlarının MALDI-TOF MS ile Tanısı: Patojenlerin kesin tür teşhisleri Prof. Dr. Soner Soylu Danışmanlığında MALDI-TOF (Matriks Assisted Lazer Desorption Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry/ Matriks Destekli Lazer Desorpsiyon İyonizasyon Uçuş Süreli Kütle Spektroskopisi) (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany) kütle spektrofotometresiyle gerçekleştirilmiştir (Soylu ve ark., 2020). MALDI-TOF sistemi son teknoloji ve oldukça yeni bir sistemdir. Sistemin çalışma mekanizması, bakteriden doğrudan lazer ile elde edilen protein profillerinin cihazın kütüphanesindeki tanımlı izolatlar ile karşılaştırılma prensibine dayanmaktadır. Saf kültürden alınan ve TSA besi yeri ortamında 24 saat geliştirilen bakteri kolonisinden alınan örnekler etanol/formik asit yöntemi ile muamele edildikten sonra (Pavlovic ve ark., 2012) cihazın örnek tablasına (target) yüklenerek cihazın kütüphanesindeki mikroorganizmalar ile BioTyper™ 1.1 software (Bruker Daltonics, Bremen, Almanya) yazılımı ile karşılaştırmak sureti ile teşhisleri yapılmıştır. Teşhisler sonucunda firmanın belirttiği üzere ortaya çıkan skor değerleri 2.3-3.0 aralığında ise tür düzeyinde oldukça güvenilir; 2.0-2.99 aralığında cins düzeyinde oldukça güvenilir, tür düzeyinde güvenilir; 1.70-1.99 arasında ise cins düzeyinde güvenilir tür düzeyinde muhtemel düzeyde güvenilir; 1.7 değerinin altında olan skorlar ise güvensiz tanı olarak değerlendirilmiştir (Soylu ve ark. 2020). Kabakgıllardan

izole edilen 41 izolat içerisinde seçilen 4 izolat (MOH-1, MOK-1-1, MOKa-1 ve MOKa-1-1) ile bu çalışma yapılmıştır.

3.2.4. Farklı Kabakgil Bitkilerinde Patojenite Testleri

Hasta kabakgil bitkilerinden yapılan izolasyonlar sonucunda saflaştırılan 41 adet bakteri izolatının tanısında Gram reaksiyon, LOPAT testleri, farklı besiyerlerindeki (TSA ve King B) koloni morfolojisi ve MALDI-TOF MS yöntemi kullanılarak tür düzeyinde tanısı yapılabilmektedir. Patojen bakterinin alt tür yani pathovar düzeyindeki tanısı için konukçu testlerine ihtiyaç vardır. Geniş bir konukçu dizisine sahip olan *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* limon, hıyar, kabak, kavun ve karpuz bitkilerini hastalandırırken (Dillon ve ark., 2021), *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* sadece hıyar ve kabak bitkilerini hastalandırmaktadır (Lelliot ve Stead, 1987). Bu bağlamda, çalışma kapsamında hasta kabakgil bitkilerinden izole edilen bakteri izolatlarının farklı konukçuları (limon, hıyar, kabak, kavun ve karpuz) hastalandırma yetenekleri laboratuvar ve cam sera koşullarında araştırılmıştır.

İlk patojenite testi laboratuvar koşullarında koparılmış hıyar ve limon meyveleri üzerinde yapılmıştır. Akan çeşme suyu altında yıkanan hıyar ve limon meyveleri kurutulduktan sonra yüzeyi %70'lik alkolle silinerek dezenfekte edilmiştir. Yüzeyden dezenfekte edilen meyveler steril filtre kağıdı yerleştirilmiş petriler içerisine konulmuştur. Hasta hıyar, kabak ve kavun bitkilerinden izole edilen 41 adet bakteri izolatının 24-48 saatlik taze kültürlerinden dansiyometre yardımıyla 10^7 hücre/ml yoğunluğunda bakteri süspansiyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan süspansiyonlar, steril şırınga yardımıyla meyvelerin üst kısmında bulunan beş yere yara açılarak inoküle edilmiştir. Negatif kontrol olarak steril su ile, pozitif kontrol olarak *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (YA-26 kodlu) izolatıyla meyvelere aynı şekilde işleme tabii tutulmuştur. Filtre kağıtları steril suyla nemlendirildikten sonra meyveler oda sıcaklığında 5-7 gün inkübasyona bırakılmıştır. Hıyar meyvelerinde inokulasyon noktası etrafında gelişen su emmiş alanların ve limon meyvelerinde inokulasyon noktası etrafında içe çökük kahverengi lekelerin varlığı hastalık oluşumu için pozitif olarak değerlendirilmiştir. İnokulasyon noktası etrafında hastalık belirtisi oluşturan izolatların patojenitesi pozitif olarak değerlendirilmiştir.

İkinci patojenite testi ısıtmasız cam sera koşullarında, ticari fideliklerden satın alınan 8-10cm boyunda, sağlıklı kabakgil (hıyar, kabak, kavun ve karpuz) fideleri üzerinde 17 Mayıs 2023 tarihinde yapılmıştır (Şekil 3.3). Çalışmada hıyar (*Cucumis sativus*) çeşidi olarak oturak, açık tarla yetiştiriciliğine uygun Borna F1; kavun (*Cucumis melo*) çeşidi olarak tünel ve açık tarla yetiştiriciliğine uygun Kırkağaç tipi kavun çeşitleri olan Hermanos F1 ve Bravos F1; kabak (*Cucurbitae pepo*) çeşidi olarak açık tarla yetiştiriciliğine uygun ampul tipi bir çeşit olan Miço F1; karpuz (*Citrullus lanatus*) çeşidi olarak açık tarla ve örtü altı yetiştiriciliğine uygun siyah meyve rengine sahip bir çeşit olan Karain F1 ve Crimson Sweet yani alaca meyve rengine sahip bir çeşit olan Sahra F1 çeşitlerine ait fideler kullanılmıştır. Bu

denemede 41 bakteri izolatu yerine, bunların izole edildiği 10 hasta bitkiden birer adet izolat seçilerek toplam 10 izolat ile çalışılmıştır. Seçilen bakteri izolatları TSA besiyerinde 24-48 saat geliştirildikten sonra dansiyometre yardımıyla steril saf suda 10^7 hücre/ml yoğunluğunda süspansiyonları hazırlanmıştır.

Yaprak patojenlerinin bitkiye stomalardan giriş yaptığı göz önünde bulundurularak, patojenin doğadaki yaşam şekli taklit edilmiş, bakteri süspansiyonu bir el pülverizatörü yardımıyla fidelerin yaprak altından püskürtülerek bitkilere inokulasyon gerçekleştirilmiştir. Her bir bakteri izolatu, 6 kabakgil çeşidine (Borna, Hermanos, Bravos, Miço, Karain ve Sahra) üçer tekrar olmak üzere toplam 18 fideye inokule edilmiştir. Negatif kontrol olarak steril su ve pozitif kontrol olarak *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (YA-26 kodlu) izolatu, aynı yöntemle farklı çeşit ve türlere ait kabakgil fidelerine püskürtülmüştür. Denemede toplam 216 adet fide kullanılmıştır. ukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölüm arazisindeki ısıtmasız cam serada tutulan bitkilerin, pozitif kontrolde hastalık belirtisi görülen 1 Haziran 2023 tarihine kadar (yaklaşık 2 hafta) bakımları yapılmıştır. Fidler günlük olarak kontrol edilmiş ve hastalık belirtisi gösteren bitkilerden yeniden bakteri izolasyonları yapılarak Koch postulatlarının aşamaları tamamlanmıştır. Yapılan izolasyonlar sonucunda elde edilen re-izolatlar eğik agar besi yeri olan YDCA besi yerinde +4 °C’de buzdolabında saklanmıştır.



Şekil 3.3. Patojenite testlerinin yapıldığı cam sera görünümü (solda) ve değerlendirilme zamanı (sağda)

3.2.5. Biyolojik Mücadele Çalışmaları

Pseudomonas syringae pv. *lachrymans*'ın neden olduğu Hıyar Köşeli Yaprak Leke Hastalığının biyolojik mücadele olanaklarının araştırıldığı bu kısımda, aday antagonistler kabakgil yetiştirilen alanların toprağından, yeşil aksamından, meyvelerinden ve tohumlarından izole edilmiş ve bu patojen bakteriye etkisi *in vitro* ikili kültür petri denemeleri ile ortaya konmuştur. Aday antagonistler içerisinde antibiyotik üreterek patojenin gelişimini engelleyen, siderefor oluşturan, indol asetik asit üretme (IAA) ve fosfor çözme yeteneklerine sahip izolatlar seçilmiştir. Ardından başarılı antagonistlerle biyolojik tohum uygulamaları yapılmıştır. Yapılan işlemler aşağıda detaylı olarak açıklanmıştır.

Aday Antagonistlerin Eldesi: Aday antagonistler kabakgil yetiştiriciliği yapılan tarla toprağından, kabakgillerin yeşil aksamındaki epifitik floradan ve kabakgil tohumlarından izole edilmiştir. İzolasyonlar için örnekler seçilirken hastalık etmeni *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*'ın varlığının bilindiği tarlalar ve bitkiler tercih edilmiştir. Arazide nispeten diğer hastalıklı bitkilere göre daha sağlıklı görünen bitkiler toplanmıştır. Bunun temelinde antagonist bakterinin patojen bakteriye doğal yaşam koşullarında bile baskılıyor olabileceği fikri yatmaktadır.

Topraktan Aday Antagonist İzolasyonu: Adana ilinin Kozan ilçesinde balkabağı bitkisinin yetiştirildiği tarlalardan alınan iki adet toprak örneği laboratuvara getirildikten sonra gazete kağıtlarına serilerek oda sıcaklığında kuruması beklenmiştir. Nemi azalan toprak örnekleri 0.2 mm deliklere sahip elekten geçirilerek işleme hazır hale getirilmiştir. Elenen örnekten 20 gram hassas terazide tartılmış ve önceden hazırlanmış 180 ml saline buffer (%0.85 NaCl) içeren erlenlere eklenmiştir. Karışım en az 3 saat 200 dev/dak hızda çalışan çalkalayıcıda çalkanmıştır. Çalkalana işleminin sonunda erlendenden alınan 1ml'lik örnek 9 ml saline buffer içeren tüplere koyularak seyreltme serileri hazırlanmıştır. Her seyreltmeden 100µl örnek alınarak TSA besiyerine 3 tekrarlı olacak şekilde ekimleri yapılmıştır. Seyreltme ekimleri en çok seyreltilenden en aza doğru gerçekleştirilmiştir. Petrilerin 26°C'de 48 saat gelişmesi beklenmiş ve gelişen koloniler incelenmiştir. Besi yerinde farklı koloni morfolojisine, rengine ve yapısal özelliklerine sahip koloniler TSA besi yerlerine saflaştırılmıştır. Elde edilen izolatlar daha sonraki çalışmalarda da kullanılmak üzere YDCA besiyerinde +4 °C'de buzdolabında saklanmıştır.

Yeşil Aksamdan Epifitik Bakteri İzolasyonu: Bitki örnekleri Bitki Koruma Bölümü Arazisinde yetiştirilen hıyar fidelerinden, patojen izolasyonu için ziyaret edilen ticari fideliklerden ve Kozan ilçesinde balkabağı yetiştirilen alanlardan toplam 12 adet örnek temin edilmiştir (Şekil 3.5). Örnekler seçilirken diğer bitkilere nazaran daha iyi gelişim gösteren kabakgil bitkileri tercih edilmiştir. Alınan bitkilerin yaprakları steril makas yardımıyla küçük parçalara ayrılmıştır. Bu küçük parçalardan 20 gram örnek hassas terazide tartılmış ve önceden hazırlanmış 180 ml saline buffer (%0.85 NaCl) içeren erlenlere koyulmuştur. Karışım ortalama 3 saat 200 dev/dak hızda çalışan çalkalayıcıda çalkanmıştır.

Çalkalanma işleminin sonunda erlenden alınan 1ml'lik örnek 9 ml saline buffer içeren tüplere koyularak seyreltme serileri hazırlanmıştır. Her seyreltmeden 100µl örnek alınarak TSA besiyerine 3 tekrarlı şekilde ekimleri yapılmıştır. Petrilerin 26°C'de 48 saat gelişmesi beklenmiş ve gelişen koloniler incelenmiştir. Farklı renklere ve koloni morfolojisine sahip olan bakterilerin TSA besiyerlerine saflaştırmaları yapılmıştır. Elde edilen izolatlar daha sonraki çalışmalarda da kullanılmak üzere YDCA besiyerinde +4 °C'de buzdolabında saklanmıştır.

Meyveden Aday Antagonist İzolasyonu: Balkabağı ve hıyar meyve yüzeyindeki floradan aday antagonist izolasyonu yapılmıştır. Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölüm arazisinde yetiştirilen hıyar bitkilerinden meyve hasadı yapılarak yüzeyindeki bakteriler izole edilmiştir. Ayrıca ticari olarak satın alınan dört adet bal kabağı meyvelerinden de izolasyon yapılmıştır (Şekil 3.4). Laboratuvara getirilen örnekler öncelikle toprak ve yabancı maddelerden arındırılmak için steril su ile yıkanmıştır. Her bir meyvenin etinden ayrı ayrı 20'şer gram örnek hassas terazide tartılmış ve iki ayrı 180 ml'lik saline buffer (%0.85 NaCl çözeltisi) içeren erlene koyularak oda sıcaklığında 200 dev/dak hızda çalışan çalkalayıcıda en az 3 saat çalkalanmıştır. Çalkalanma işleminin sonunda erlenden alınan 1ml'lik örnek 9 ml saline buffer içeren tüplere koyularak seyreltme serileri hazırlanmıştır. Her seyreltmeden 100µl örnek alınarak TSA besiyerine 3 tekrarlı şekilde ekimleri yapılmıştır. Petrilerin 26°C'de 48 saat gelişmesi beklenmiş ve gelişen koloniler incelenmiştir. Farklı renklere ve koloni morfolojisine sahip olan bakterilerin TSA besiyerlerine saflaştırmaları yapılmıştır. Elde edilen izolatlar daha sonraki çalışmalarda da kullanılmak üzere YDCA besiyerinde +4 °C'de buzdolabında saklanmıştır.

Tohumdan Aday Antagonist İzolasyonu: Tohumdan aday antagonist izolasyonları, satın alınan balkabağı meyvelerinden çıkarılan tohumlardan ve üreticiden temin edilen kavun ve karpuz tohumlarından yapılmıştır. Konya ili Çumra ilçesinde atalık tohumlardan üretim yapan çiftçilerden, Araş. Gör. Mustafa Alparslan UMARUSMAN vasıtasıyla atalık kavun ve karpuz tohumu temin edilmiştir. Bu tohumlar kışlık kavun, yazlık kavun, kışlık karpuz ve yazlık karpuz olmak üzere 4 farklı tohumdan oluşmuştur. Tohumların hem yüzeyinden hem iç dokularından izolasyon yapılabilmesi için öncelikle tohumlar bir beher içerisine koyularak mikser yardımıyla yara açılmıştır. Ardından yara açılan farklı tohum çeşitlerinden ayrı ayrı olmak koşuluyla 20 gram örnek hassas terazide tartılmış ve önceden hazırlanmış 180 ml saline buffer (%0.85 NaCl) içeren erlenlere koyulmuştur. Karışım en az 3 saat 200 dev/dak hızda çalışan çalkalayıcıda çalkalanmıştır. Çalkalanma işleminin sonunda erlenden alınan 1ml'lik örnek 9 ml saline buffer içeren tüplere koyularak seyreltme serileri hazırlanmıştır. Her seyreltmeden 100µl örnek alınarak TSA besiyerine 3 tekrarlı şekilde ekimleri yapılmıştır. Petrilerin 26°C'de 48 saat gelişmesi beklenmiş ve gelişen koloniler incelenmiştir. Farklı renklere ve koloni morfolojisine sahip olan bakterilerin TSA besiyerlerine saflaştırmaları yapılmıştır. Elde edilen izolatlar daha sonraki çalışmalarda da kullanılmak üzere YDCA besiyerinde +4 °C'de buzdolabında saklanmıştır.



Şekil 3.4. Kozan ilçesinde balkabağı yetiştirilen tarla (solda) ve satın alınan balkabağı meyvesi (sağda)



Şekil 3.5. Bitki Koruma Bölümü arazisinde yetiştirilen hıyar fidelerinden örneklerin alınması

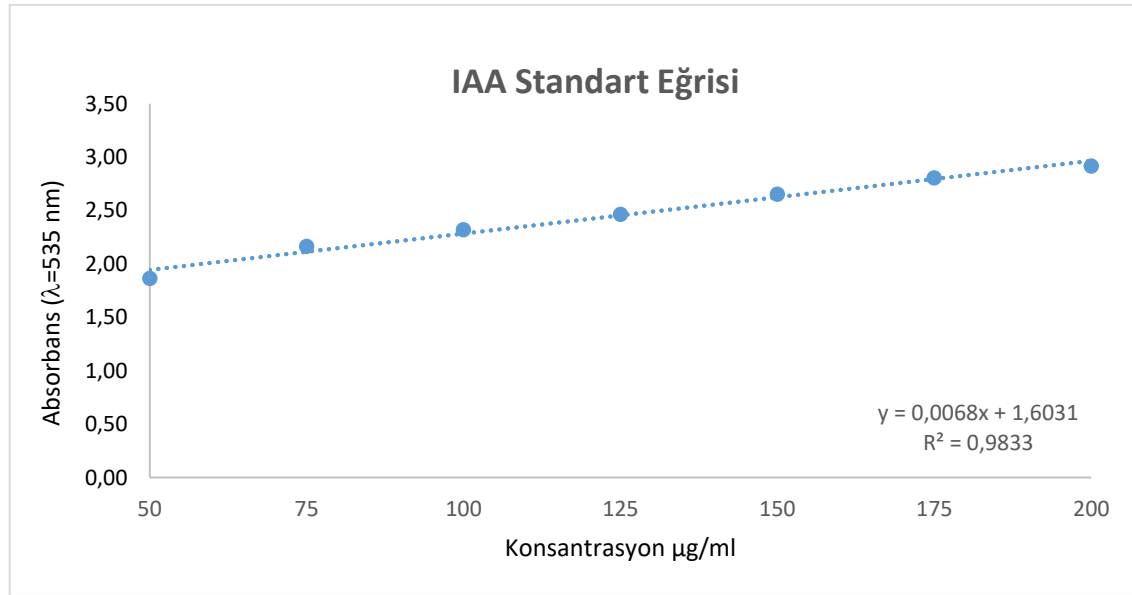
Aday Antagonistlerin Seçimi: Kabakgil yetiştiriciliği yapılan tarla toprağından, kabakgillerin yeşil aksamındaki epifitik floradan ve kabakgil tohumlarından elde edilen aday antagonistler ve Bakteriyoloji kültür koleksiyonunda bulunan, toplam 298 adet aday antagonist çalışmanın bu kısmında kullanılmıştır. *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* 'a karşı antibakteriyel etki, siderofor üretimi, IAA üretme potansiyeli ve fosfatı indirgeme yeteneklerine göre aday antagonistlerin seçimi yapılmıştır.

Antibakteriyel Etki: Aday antagonistlerin *in vitro* koşullarda *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* 'a olan antibakteriyel etkisi ikili kültür petri denemeleriyle araştırılmıştır (Mitchell, 1992). Bu amaçla, TSA besi yerinde 24 saat geliştirilen aday antagonistler yeni bir TSA besi yerine üç nokta şeklinde ekim yapılmış ve 24-48 saat inkübe edilmiştir. Ardından farklı bir TSA besi yerinde 48 saat geliştirilen *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* kültüründen steril saf su ile süspansiyon hazırlanmış ve McFarland dansiyometre yardımıyla süspansiyonun yoğunluğu 10^7 hücre/ml'ye ayarlanmıştır. Temiz bir el pülverizatörüne aktarılan patojen süspansiyonu üç nokta ekimi yapılmış aday antagonistlere 15 cm uzaktan püskürtülmüştür. Kontrol petrisi olarak, TSA besiyerine yalnızca patojen bakteri püskürtülmüştür. Bakteri süspansiyonunun püskürtüldüğü petriler 26°C'de çalışan inkübatöre koyulmuştur ve 24-48 saat bakterilerin gelişimi beklenmiştir. Petrilerde gelişen aday antagonist izolatların çapı ile çevresinde oluşan engelleme zonları mm olarak ölçülmüş ve kaydedilmiştir. Daha sonra bakteri çapı ve engelleme zonu birbirine oranlanmış ve izolatların "Antagonistik İndeks Değerleri" hesaplanmıştır (Jiang ve ark., 2015).

Siderofor Oluşturma Yeteneklerinin Belirlenmesi: Siderofor üretme yeteneğı antagonist bakterinin patojen bakteri ile besin elementi olarak demir için rekabetine girmesini dayanan bir sistemdir. Siderofor oluşturma yeteneğı bakterinin, kullanılamayan formda olan (Fe^{+3}) demiri dönüştürmesi (Fe^{+2}) ve bitkinin kullanımına sunması olarak tanımlanabilir. Bu yüzden elde edilen aday antagonistlerin siderofor üretme yeteneklerine göre de elemeler yapılmıştır. *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* 'a karşı antibakteriyel etki gösteren 29 adet antagonistin siderofor üretebilme yetenekleri mavi CAS agar besi yeri kullanılarak belirlenmiştir (Schwyn ve Neilands, 1987). CAS agar besi yerine eşit uzaklıklarda üç nokta şeklinde ekimi yapılan antagonistler 26 ± 1 C'de 7 gün boyunca geliştirilmiştir. Gelişim süresinin sonunda bakteri kolonisi çevresinde zon oluşturan antagonistler için ölçümler yapılmıştır. Aday antagonistlerin siderofor şiddeti, zon oluşan bölgenin çapının antagonist bakterinin çapına oranlanmasıyla elde edilen indeks değerine göre değerlendirilmiştir. Hiç engelleme zonu oluşturmeyan aday antagonistlerin çözünürlük indeksi 0 olarak kabul edilmiş, çözünürlük indeksi 1 ve üzeri olan aday antagonistler siderofor üretme yani demiri besin olarak kullanma yeteneğine sahip olduğu belirlenmiştir.

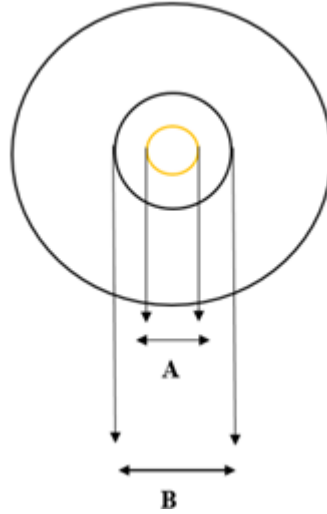
İndol Asetik Asit (IAA) Üretme Yeteneklerinin Belirlenmesi: İndol asetik asit (IAA), bir diğer ismiyle oksinler, bitki büyümesindeki rolünün önemiyle bilinmektedir. Oksinlerin bitkideki kök gelişimine ve yüzey alanının büyümesine katkısı, bitkiye besin elementi alımını kolaylaştırması ve hücre

bölünmesini teşvik etmesi gibi birçok işlevi bulunmaktadır (İmriz ve ark., 2014). Antagonist bakterilerin birçoğunun IAA üretebildiği ve bitkinin büyümesine, gelişmesine ve direncinin artırılmasına yönelik kullanabildiği bilinmektedir (Glick, 1995, Hallman, 1997). Bu bilgiler göz önünde bulundurularak *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*'a karşı antibakteriyel etki gösteren 29 adet antagonistin IAA üretimi Salkowski yöntemiyle tespit edilmiştir (Glickman ve Dessaux, 1995). İçerisinde 3 mg ml⁻¹ L-tryptophan içeren Laura Bertoni (LB) sıvı besi yeri tüplerine, 10⁷ hücre/ml yoğunluğuna ayarlanmış olan antagonist süspansiyonları 500 µl eklenmiş ve 4 gün boyunca 30°C'de 200 dev/dak çalkalayıcıda çalkalanmıştır (Sezonov ve ark., 2007). Bu sürenin sonunda örneklerin içindeki tortuların ayrılması için solüsyonlar 5000 rpm'de 30 dakika boyunca santrifüj edilmiş ve işlemin sonunda tüplerin üstünde kalan süpernatant tortudan ayrılarak steril eppendorflara aktarılmıştır. Süpernatantın üzerine 2 damla (yaklaşık 40 µl) fosforik asit eklenmiş ve bu karışım içinde 4 ml Salkowski çözeltisi (150 ml %98'lik H₂SO₄, 7.5 ml 0.5 M'lık FeCl₃.6H₂O, 250 ml saf su) olan cam tüplere aktararak oda sıcaklığında ve karanlık bir ortamda 30 dakika beklemeye bırakılmıştır. İşlem sonunda IAA üretim miktarı yüksek olan antagonistlerin besiyerinin rengini kırmızı/mora doğru değiştirdiği gözlenmiştir. Ölçümler 535 nm dalga boyundaki spektrofotometrede okunarak absorbens değerleri kaydedilmiştir (Şekil 3.6). Antagonistlerin ürettiği IAA miktarı standart IAA absorbens değerleriyle kıyaslanmak suretiyle ppm (µg ml⁻¹) düzeyinde belirlenmiştir (Doksöz, 2021).



Şekil 3.6. Standart IAA eğrisi

Fosfor çözme yeteneklerinin belirlenmesi: Fosfor, azottan sonra bitki beslenmesindeki en önemli besin elementlerinden biridir. Bitkiler fosforu topraktan ortofosfat anyonları olarak alırlar fakat bu anyonların reaksiyon yeteneği oldukça yüksek olduğu için bitkide her zaman yarayışlı formda bulunmayabilirler (Holečková ve ark., 2017). Bu sebeple toprakta fosfor elementi olsa bile bitkilerde fosfor noksanlığı görülebilmektedir. Bu gibi durumlarda bazı antagonist mikroorganizmaların bitkinin topraktan alması gereken fosforu kullanılabilir hale getirerek bitkinin kullanımına olanak sağladığı bilinmektedir. Bu bilgiler göz önünde bulundurularak çalışmada elde edilen 29 adet antagonist mikroorganizmanın fosforu çözebilme yetenekleri incelenmiştir. Antagonistlerin fosforu çözme yeteneği tri-kalsiyum fosfat içeren Pikovskaya Agar (PVK) kullanılarak belirlenmiştir (Kumar ve ark., 2012). Sözü edilen bu besi yerini içeren petrilere antagonistler üç nokta şeklinde ekim yapılmış ve petriler 26±1 C’de 7 gün gelişmeye bırakılmıştır. Bu sürenin sonunda ekimi yapılan antagonist bakterilerin çevresinde şeffaf bir engelleme zonu oluşturan örnekler pozitif kabul edilmiştir. Oluşan bu zonun, bakteri kolonisinin çapına oranlanmasıyla fosfor çözünürlük indeksi hesaplanmıştır (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. (A) petri kabındaki antagonist bakterinin çapı ve (B) antagonist bakterinin oluşturduğu zon çapı

$$\text{İndeks} = \frac{\text{Antagonist zon çapı (B)}}{\text{Antagonist çapı (A)}}$$

Antagonistlerin Tohum Kökenli Hıyar Köşeli Yaprak Leke Hastalığı’na Etkisi: Tohum uygulamaları; tohum kökenli bakteriyel hastalık etmenlerinin mücadelesi noktasında en çok tercih edilen ve başarı oranı yüksek yöntemlerden biridir. Tohum uygulamaları kimyasal ve fiziksel olabildiği gibi biyolojik yöntemlerle de yapılabilmektedir. Bu tez çalışması çerçevesinde biyolojik mücadele stratejileri

üzerine odaklanılmıştır. Biyolojik tohum uygulamaları yöremizden izole ettiğimiz yerel antagonist bakteri izolatlarıyla gerçekleştirilmiştir.

Pseudomonas syringae pv. *lachrymans*'a karşı antibakteriyel etkiye sahip, buna ek olarak fosfatı indirgeme, siderofor ve IAA üretme yeteneğinden en az ikisine sahip antagonistler seçilerek tohum denemeleri yapılmıştır. İlk denemede 298 aday antagonist içinden başarılı olan 15 antagonist ile biyolojik tohum denemeleri kurulurken ikinci denemede en başarılı bulunan 5 izolat ve bu beş izolatın kombinasyonu ile deneme kurulmuştur. Onbeş adet antagonist bakterinin kullanıldığı birinci biyolojik tohum uygulaması denemesi 1 Kasım 2023 ve 18 Kasım 2023 tarihleri arasında kurulurken, ikinci deneme 5 adet antagonist ve bunların bir çiftinin kombinasyonu ile 4 Kasım 2024 ve 16 Kasım 2024 tarihleri arasında kurulmuştur.

Antagonistlerin Birbirleriyle Etkileşiminin Belirlenmesi: Antagonist bakteriler patojen bakterilere karşı antimikrobiyal maddeler ürettiği gibi, kendi aralarında da besin ve yer rekabetine girebilmektedir. Antagonistler karışım halinde kullanılmadan önce ikinci denemeye alınacak 5 adet antagonist bakterinin birbirleriyle etkileşimleri yine ikili kültür petri denemelerinden ortaya konmuştur. Bu antagonistler TSA besi yerine üç nokta ekimi ve 4 tekerrür olacak şekilde yapılmıştır. Antagonistler 24 saat geliştirildikten sonra, antagonist bakterilerden dansiyometrede 10^7 hücre/ml yoğunluğunda süspansiyonlar hazırlanmış ve bu petrilerin üzerine 15 cm uzaklıktan püskürtülmüştür. Püskürtme işlemi gerçekleştirilen petriler 24 saat geliştirildikten sonra antagonist bakterilerin birbirlerine karşı engelleme zonu oluşturup oluşturmadığı incelenmiştir. Birbirlerine karşı engelleme zonu oluşturan antagonist bakteriler, kombinasyon çalışmasında deneme dışı bırakılırken, birbirlerini engellemeyen antagonist izolatların kombinasyonları çalışmaya dahil edilmiştir.

Tohumların Patojen Bakteri ile Bulaştırılması: Birinci deneme için ticari olarak satın alınan Beith alpha çeşidi hıyar tohumları kullanılmıştır. Tohumlar ticari bir fungusla ilaçlanmış olduğundan tohum ilacını uzaklaştırmak için musluk suyuyla 3 kez yıkanarak pestisitler arındırılmıştır. İkinci denemede Trabzon ilinin Akçaabat ilçesinden getirilen çeşidi bilinmeyen ilaçsız yerli hıyar tohumları kullanılmıştır. Tohumlar herhangi bir ilaçla muamele görmediği için direk kullanılmıştır. Patojen bakteri *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*'ın TSA besiyerinde 48 saat geliştirilmiş olan taze kültüründen dansiyometrede 1.00 ölçüm değerinde bir süspansiyon hazırlanmıştır. Hıyar tohumlarına yara açılması ve patojenin girişinin kolaylaşması için bu süspansiyona 1g/L karborandum tozu eklenmiştir (Bashan ve ark., 1978). Patojen bakteri süspansiyonunun içine hıyar tohumları daldırılmış, patojenin tohumlara tutunabilmesi için 150 dev/dak hızda çalışan bir erlen karıştırıcıda 30 dakika boyunca çalkalanmıştır. Çalkalamanın sonunda tülbent yardımıyla süzülen patojenle suni olarak bulaştırılmış tohumlar steril kurutma kağıtlarına serilerek 30 dakika boyunca steril kabinde kurumaya bırakılmıştır.

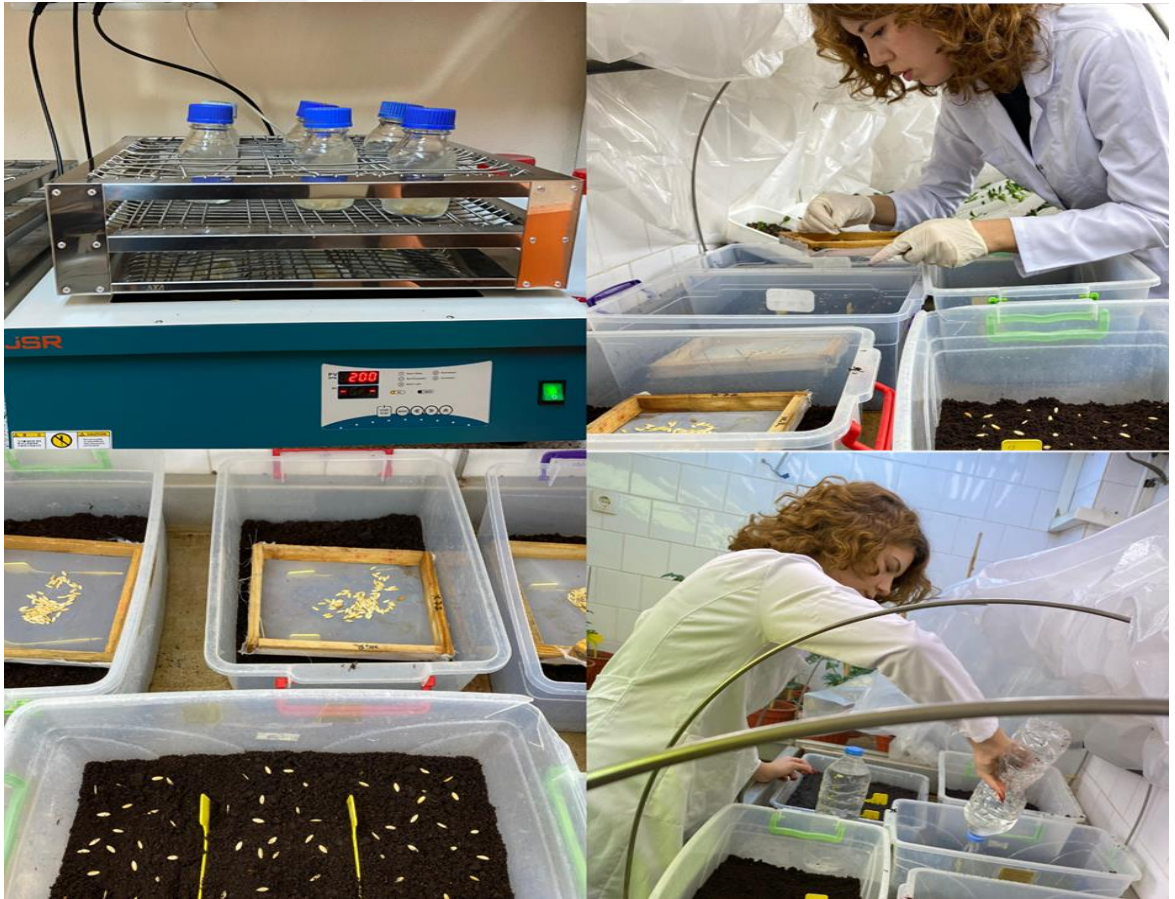
Tohumların Antagonist Bakteri ile Bulaştırılması: Antagonist bakteri izolatları TSA besiyerinde 48 saat geliştirildikten sonra saf suyla süspanse edilerek dansiyometrede 1.00 yoğunlukta hazırlanmıştır. Ardından, patojen bakteriyle suni olarak bulaştırılmış hıyar tohumları, 15 farklı antagonist süspanسیونunun içerisine daldırılmıştır. Antagonistlerin tohuma kolonize olmasını sağlamak için uygulama görmüş tohumlar 150 dev/dak hızda 30 dakika boyunca çalkalanmıştır. Çalkama sonunda antagonist solüsyonları süzülerek ayrılmıştır ve hemen ardından tohum ekimleri gerçekleştirilmiştir. Tohum ekimi, kapaklı steril plastik küvetler içerisine ve steril torflara yapılmıştır (Şekil 3.9).

Uygulamalar ve Denemenin Değerlendirilmesi: Biyolojik tohum uygulaması olarak ilk denemede 15 antagonist (NÇ-KK, NÇ-YK-I, NÇ-YK-R, DK-Sarı OG 7-13, OG 7-7, OG 1-2, OG 8-8, YL 4-3, AY10-M2, AZ10-6-2, Ad4-2, X77, HA9 ve HA3), ikinci denemede 5 antagonist (NÇ-KK, AD 4-2, OG 1-2, OG 7-7 ve X-77 kodlu izolatlar) ve bir kombinasyon (OG 1-2 ve OG 7-7 kodlu izolatlar) uygulaması yer almıştır. Antagonist kombinasyonunda OG 1-2 ve OG 7-7 kodlu izolatlardan hazırlanan eşit popülasyon yoğunluğundaki bakteri süspanسیونu eşit miktarda karıştırılarak kullanılmıştır. Pozitif kontrol olarak sadece patojenle bulaştırılmış tohumlar, negatif kontrol olarak sadece steril saf suya daldırılmış tohumlar kontrol uygulamaları olarak denemede yer almıştır. İlk denemede yer alan her bir uygulama 3 tekerrürlü ve her tekerrürde 50 tohum bulunurken ikinci denemede benzer şekilde 3 tekerrürlü ve her tekerrürde 25 adet tohum yer almıştır. Torf içeren plastik küvetlere tohum ekimi gerçekleştirildikten sonra nem sağlamak amacıyla kapakları kapatılmış ve Çukurova Üniversitesi Bitki Koruma Bölümünde bulunan iklim odasına (sıcaklık $26\pm2^{\circ}\text{C}$, nem %65-75, 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık) yerleştirilmiştir. Deneme günlük olarak kontrol edilmiş ve tohumlar çimlendikten sonra küvetlerin kapakları açılmıştır.

Pozitif kontrol uygulamasında yer alan hıyar fidelerinin kotiledon yapraklarında gözle görülür hastalık belirtileri (su emmiş lekeler, sarı haleli kahverengi lekeler) oluşuktan sonra değerlendirme aşamasına geçilmiştir. Her bir biyolojik tohum uygulamasında yer alan toplam fide sayısı ve hasta fide sayıları not edilmiştir. Hasta fide sayısı çimlenen toplam fide sayısına oranlanarak hastalık oranı (%) hesaplanmıştır. Ayrıca her bir uygulamadaki hasta fidelerin kotiledon yapraklarındaki lekeler 0-3 skalasına göre değerlendirilmiş ve hastalık şiddeti hesaplanmıştır (Karman, 1970). Hastalık şiddetinin tespitinde Aysan (1999) tarafından geliştirilen 0-3 skalası modifiye edilerek (0: kotiledonlarda leke yok, 1: kotiledonlarda 1 leke, 2: kotiledonlarda 2 leke, 3: kotiledonlarda 3 veya daha fazla leke var ise) kullanılmıştır (Şekil 3.8). Antagonistlerin hastalığı baskılama düzeyi pozitif kontrolle karşılaştırılarak Abbott formülüne göre hesaplanmıştır (Karman, 1970). Elde edilen veriler CoStat İstatistik Yazılımı (CoHort Software, Pacific Grove, CA, U.S.A. Version 6.4) kullanılarak analiz edilmiştir. Tek yönlü ANOVA ile varyans analizi yapılarak $p\leq 0.05$ önem düzeyinde LSD çoklu karşılaştırma testiyle uygulamalar arasındaki farklılık ortaya konmuştur.



Şekil 3.8. Aday antagonistlerin tohum kökenli Hıyar Köşeli Yaprak Leke Hastalığı'na etkisi değerlendirilirken kullanılan skala. (0: kotiledonlarda leke yok, 1: kotiledonlarda 1 leke, 2: kotiledonlarda 2 leke, 3: kotiledonlarda 3 veya daha fazla leke var ise)



Şekil 3.9. Tohum deneylerinin kurulma aşamaları

Başarılı Antagonistlerin Tohum Çimlenmesine Etkisi: Tohum denemeleri sonucunda *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*'ın neden olduğu Hıyar Köşeli Yaprak Leke hastalığını başarılı bir şekilde baskılayan antagonist bakterilerin tohum çimlenmesine etkisi bu tez çalışmasında araştırılmıştır. Tohum denemelerinde başarılı olan antagonist bakteriler (OG 1-2, NÇ-KK, OG 7-7, AD 4-2 Kombinasyon ve X77) TSA besiyerinde 48 saat geliştirildikten sonra saf suyla süspanse edilerek dansiyometrede 1.00 yoğunlukta hazırlanmıştır. Hıyar tohumları, antagonist süspanسیونlarının içerisine daldırılmıştır ve tohumlar 150 dev/dak hızda 30 dakika boyunca çalkalanmıştır. Çalkalama sonunda antagonist solüsyonları süzülerek ayrılmıştır ve hemen ardından tohum ekimleri steril küvet ve steril torflara gerçekleştirilmiştir. Kontrol olarak tohumlar steril suya daldırılmıştır ve ekimleri bu şekilde yapılmıştır. Deneme 3 tekerrür ve her tekerrürde 25 tohum olacak şekilde kurulmuştur. Denemeler, sadece suyla muamele görmüş çimlenen tohum sayısı (kontrol) ve antagonist bakteri uygulaması görmüş çimlenen tohum sayısı birbirine oranlanarak değerlendirilmiştir.

Başarılı Antagonistlerin Tanısı: Tohum denemelerinde *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*'ın neden olduğu Hıyar Köşeli Yaprak Leke hastalığını başarılı bir şekilde baskılama yeteneği olan antagonistlerin bitki patojeni veya insan patojeni olabilme ihtimalleri göz önünde bulundurularak bazı tanılama testlerine başvurulmuştur. Bu tanılama testleri aşağıda detaylı şekilde anlatılmıştır.

Tütünde Aşırı Duyarlılık (HR) Reaksiyonu: Tütünde aşırı duyarlılık reaksiyonu bazı patojen bakterilerin tanılanmasının ilk basamağında kullanılan, laboratuvar koşullarında oldukça kısa bir sürede ve düşük maliyetle uygulanabilen bir yöntemdir. İzole edilen ve antagonist bakteri olduğu düşünülen izolatların bitki patojeni olup olmadığını belirlemek için de ilk basamak olarak tütünde aşırı duyarlılık reaksiyonuna başvurulmuştur. Tohum denemelerinde başarılı bulunan 5 adet antagonist bakteri (AD 4-2, OG 1-2, OG 7-7, NÇ-KK ve X77) dansiyometrede 1.00 yoğunluğunda süspanسیونlar hazırlanmış ve hazırlanan bu süspanسیونlar tütün yaprağının iki damar arasına steril bir şırınga yardımıyla inoküle edilmiştir. İnokülasyonun ardından 24 saat oda sıcaklığında inkübe edilen tütünün, inokülasyon yapılan yaprak damar aralarındaki nekrotize olmuş görünümü pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Patateste Pektolitik Enzim Aktivitesi: Patates içeriğinde oldukça yüksek oranda nişasta bulundurmaktadır, pektolitik enzim üretebilme aktivitesi de nişastanın parçalanmasıyla açığa çıkan yumuşak/sulu çürüklüğe sebep olan yumuşak çürüklük patojenlerinin tanılanmasının ön tanılama testi olarak kullanılmaktadır. Tohum denemelerinde başarılı bulunan 5 adet antagonist bakteri (AD 4-2, OG 1-2, OG 7-7, NÇ-KK ve X77) yumuşak çürüklük etmeni olup olmadığını belirlemek için de bu tanılama testine başvurulmuştur. Patatesler musluk suyuyla yıkanarak toprağından arındırılmış ve %1'lik sodyum hipoklorid çözeltisinin içine daldırılarak 30 dakika süreyle bekletilmiştir. Sürenin sonunda patates yumruları 3 kere steril saf sudan geçirilerek durulanmış ve steril kabin içerisinde kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan patatesler steril bir bıçak yardımıyla yaklaşık 1 cm kalınlığında daireler şeklinde kesilmiş ve

içinde steril kurutma kağıdı bulunan steril cam petrilere koyularak 24 saatlik taze kültürden geliştirilmiş antagonist bakteriler bu patateslerin üzerine steril kürdan yardımıyla inoküle edilmiştir. Patateslerin altında bulunan kurutma kağıdı yaklaşık 1 ml steril saf su ile nemlendirilerek kapakları kapatılmış ve 26 C'de çalışan inkübatöre alınarak 48 saat boyunca inkübe edilmiştir. Sürenin sonunda patatesten yumuşak/sulu çürüklüğe sebep olan antagonist bakterilerin pektolitik enzim üretme aktivitesinin olduğu ve yumuşak çürüklük patojeni olabileceği belirlenmiştir.

36 °C'de Gelişim: Bakteriler hayatımızın her alanında varlığını sürdürmektedir. Laboratuvar koşullarında izole ettiğimiz bakterilerin insan patojeni olup olmadığını anlamak için insan vücut sıcaklığında gelişimini bilmek gerekmektedir. Tohum denemelerinde başarılı bulunan 5 adet antagonist bakteri (AD 4-2, OG 1-2, OG 7-7, NÇ-KK ve X77) izolatu TSA besiyerine ekilmiş ve 36 °C'de 24-48 saat boyunca inkübe edilmiştir. Sürenin sonunda bu sıcaklıkta gelişme yeteneği olmayan bakterilerin insan patojeni olamayacağı belirlenmiştir.

MALDI TOF MS ile tanı: MALDI-TOF MS patojenlerin kesin tür teşhislerinin yapılmasını sağlayan bir sistemdir. Sistemin çalışma mekanizması, bakteriden doğrudan lazer ile elde edilen protein profillerinin cihazın kütüphanesindeki tanımlı izolatlara ile karşılaştırılma prensibine dayanmaktadır. Saf kültürden alınan ve TSA besi yeri ortamında 24 saat geliştirilen antagonist bakteri kültürleri etanol/formik asit yöntemi ile muamele edildikten sonra (Pavlovic ve ark., 2012) cihazın örnek tablasına (target) yüklenerek cihazın kütüphanesindeki mikroorganizmalar ile BioTyper™ 1.1 software (Bruker Daltonics, Bremen, Almanya) yazılımı ile karşılaştırmak sureti ile teşhisleri yapılmıştır. Teşhisler sonucunda firmanın belirttiği üzere ortaya çıkan skor değerleri 2.3-3.0 aralığında ise tür düzeyinde oldukça güvenilir; 2.0-2.99 aralığında cins düzeyinde oldukça güvenilir, tür düzeyinde güvenilir; 1.70-1.99 arasında ise cins düzeyinde güvenilir tür düzeyinde muhtemel düzeyde güvenilir; 1.7 değerinin altında olan skorlar ise güvensiz tanı olarak değerlendirilmiştir (Soylu ve ark. 2020). Tohum denemelerine dahil edilen 15 antagonist bakteri izolatu içerisinde 5 tanesinin (AD 4-2, OG 1-2, OG 7-7, NÇ-KK ve X77) tür teşhisi MALDI TOF MS yöntemi ile yapılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Ticari Fidelik Ziyaretleri ve Hastalıklı Bitki Örneklerinin Toplanması

Ticari fideliklere yapılan ilk ziyaret olan 3 Şubat 2023 tarihinde, hasta kavun bitkilerinde gerçek yaprakların uç kısımlarda yanıklık ve bazı yapraklarda sarı hale ile çevrili yanıklık belirtilerinin (Şekil 4.1) olduğu görülmüştür. Toplam 150 adet kavun fidesinin bulunduğu bir viyolde dokuz adet fidede bu belirtiler tespit edilmiştir (Şekil 4.2). Ticari fideliklere, 1 Mart 2023 tarihinde yapılan ikinci ziyarette, hıyar bitkilerinin yaprak kenarlarında düzensiz lekeler (Şekil 4.3) tespit edilmiştir. Toplam 150 adet hıyar fidesinin bulunduğu bir viyolde 30 adet fidede hastalık belirtilerinin varlığı belirlenmiştir. Ticari fideliklere, 14 Mart 2023 tarihinde yapılan üçüncü ziyarette, kavun bitkilerinin yaprak kenarlarında düzensiz lekeler (Şekil 4.4) tespit edilmiştir. Toplam 150 adet kavun fidesinin bulunduğu bir viyolde sadece dört adet fidede hastalık belirtilerinin varlığı saptanmıştır. Ticari bir fidelige, 30 Mart 2023 tarihinde yapılan dördüncü ve son ziyarette, kabak ve hıyar bitkilerinde hastalık belirtilerinin varlığı saptanmıştır. Kabak (Şekil 4.5) ve hıyar (Şekil 4.6) bitkilerinin kotiledon yapraklarında ıslak su emmiş lekeler ve gerçek yapraklarda benzer şekilde yuvarlak su emmiş lekeler tespit edilmiştir. Toplam 150 adet kabak fidesinin bulunduğu bir viyolde sadece dört adet fidede; hıyar fidelerinin bulunduğu viyolde 35 adet fidede hastalık belirtilerinin varlığı saptanmıştır.



Şekil 4.1. Kavun gerçek yapraklarındaki yanıklık (solda) ve sarı haleli yanıklıklar (sağda)



Şekil 4.2. Kavun yaprak kenarlarındaki düzensiz yanıklıklar



Şekil 4.3. Hıyar yaprak kenarlarındaki düzensiz yanıklıklar



Şekil 4.4. Ticari fidelik ziyaretindeki hasta kavun fidelerinin görünümü



Şekil 4.5. Kabak fidelerinin kotiledonlarındaki su emmiş ve açık kahverengi lekeler



Şekil 4.6. Hıyar fidelerinin kotiledonlarındak su emmiş leke (solda) ve gerçek yapraklardaki lekeler (sağda ve altta).

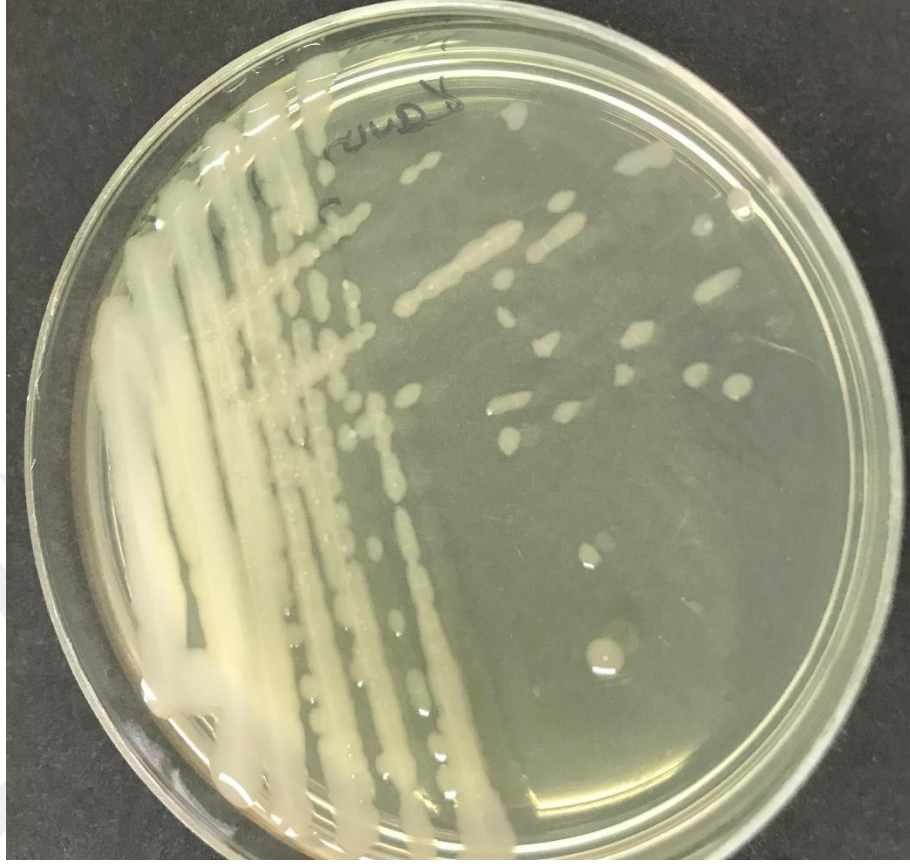
Çizelge 4.1’de görüldüğü gibi ticari fideliklere yapılan toplam dört ziyarette, 82 hasta bitki örneğinin 65 adeti hıyar, 13 adeti kavun ve 4 adeti ise kabak fidelerinden alınmıştır. Karpuz fidelerinde hastalık belirtisine rastlanmamıştır. Toplam 10 hasta fideden (hıyar, kavun ve kabak) ayrı ayrı izolasyonlar gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 4.1. Ticari fideliklerin incelenmesi sırasında alınan bitki örnekleri sayısı

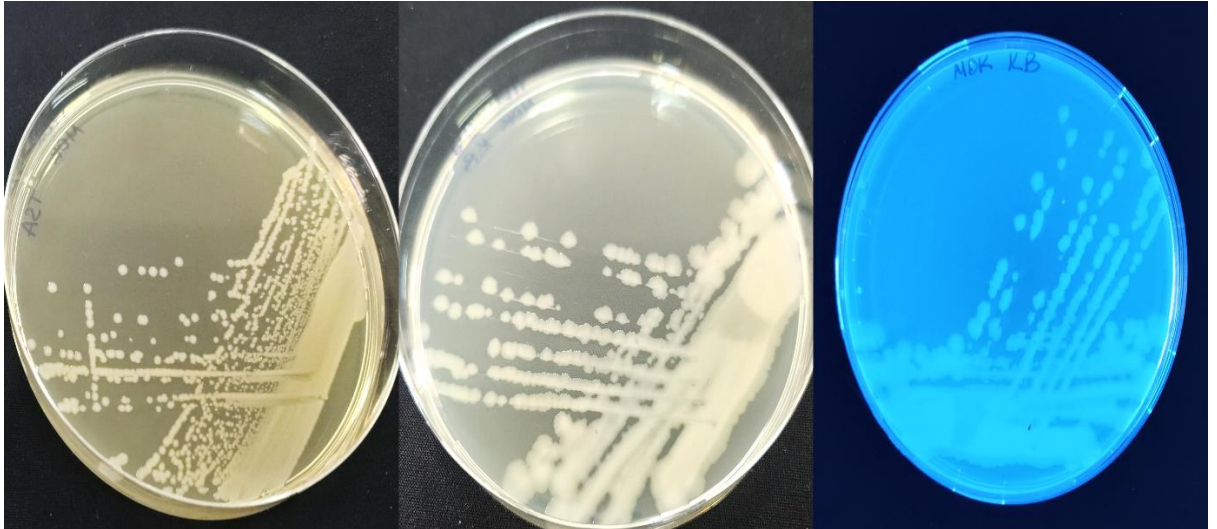
Tarih	Bitki	Hasta Fide Sayısı	Alınan Örnek Sayısı
3 Şubat 2023	Kavun	9	2
1 Mart 2023	Hıyar	30	3
14 Mart 2023	Kavun	4	1
30 Mart 2023	Kabak	4	2
	Hıyar	35	2
Toplam		82	10

4.2. Hasta Bitkilerden Patojen Bakteri İzolasyonları

Dört farklı tarihte ziyaret edilen ticari fideliklerde toplam 82 adet hasta bitki içerisinden seçilen 10 adet hasta hıyar, kabak ve kavun bitkilerinin kotiledon ve gerçek yapraklarından yapılan izolasyonlarda, TSA besi yerinde krem renkli, parlak, mukoid ve yuvarlak koloniler dominant olarak gelişmiştir (Şekil 4.7). Her bir hasta bitki örneğinin izole edildiği petriden toplam 41 adet bakteri izolatu saflaştırılmıştır. Saflaştırılan 41 adet bakteri izolatlarının bilgilerini (izolat kodu, izole edildiği konukçu bitki türü, örnek alınan tarih ve izole edildiği bitki numarası) içeren liste hazırlanmış ve Çizelge 4.2’de sunulmuştur. Bu 41 izolatın 19 adeti hıyardan, 14 adeti kavundan ve 8 adeti kabak bitkilerinden izole edilmiştir.



Şekil 4.7. TSA besiyerinde gelişen *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*'nin gelişimi



Şekil 4.8. *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*'ın TSA besiyerinde (solda), King B besiyerinde (ortada) ve King B besiyerinde UV ışık altında (sağda) görünümü.

Çizelge 4.2. Saflaştırılan bakteri izolatları listesi

	İzolat Kodu	Alındığı Bitki	Alındığı Tarih	Bitki Numarası
1	MOKa-1	<i>Cucumis melo</i> (kavun)	03.02.2023	1. Bitki
2	MOKa-2	<i>Cucumis melo</i> (kavun)	03.02.2023	1. Bitki
3	MOKa-3	<i>Cucumis melo</i> (kavun)	03.02.2023	1. Bitki
4	MOKa-4	<i>Cucumis melo</i> (kavun)	03.02.2023	1. Bitki
5	MOKa-5	<i>Cucumis melo</i> (kavun)	03.02.2023	2. Bitki
6	MOKa-6	<i>Cucumis melo</i> (kavun)	03.02.2023	2. Bitki
7	MOKa-7	<i>Cucumis melo</i> (kavun)	03.02.2023	2. Bitki
8	MOKa-8	<i>Cucumis melo</i> (kavun)	03.02.2023	2. Bitki
9	MOH-1	<i>Cucumis sativus</i> (hıyar)	01.03.2023	3. Bitki
10	MOH 1-1	<i>Cucumis sativus</i> (hıyar)	01.03.2023	3. Bitki
11	MOH 1-2	<i>Cucumis sativus</i> (hıyar)	01.03.2023	3. Bitki
12	MOH 1-3	<i>Cucumis sativus</i> (hıyar)	01.03.2023	3. Bitki
13	MOH 1-4	<i>Cucumis sativus</i> (hıyar)	01.03.2023	3. Bitki
14	MOH 2	<i>Cucumis sativus</i> (hıyar)	01.03.2023	4. Bitki
15	MOH 2-1	<i>Cucumis sativus</i> (hıyar)	01.03.2023	4. Bitki
16	MOH 2-2	<i>Cucumis sativus</i> (hıyar)	01.03.2023	4. Bitki
17	MOH 2-3	<i>Cucumis sativus</i> (hıyar)	01.03.2023	4. Bitki
18	MOH 2-4	<i>Cucumis sativus</i> (hıyar)	01.03.2023	4. Bitki
19	MOH 2-5	<i>Cucumis sativus</i> (hıyar)	01.03.2023	4. Bitki
20	MOH 5	<i>Cucumis sativus</i> (hıyar)	01.03.2023	5. Bitki
21	MOH 6	<i>Cucumis sativus</i> (hıyar)	01.03.2023	5. Bitki
22	MOH 7	<i>Cucumis sativus</i> (hıyar)	01.03.2023	5. Bitki
23	MOH 8	<i>Cucumis sativus</i> (hıyar)	01.03.2023	5. Bitki
24	MOH 9	<i>Cucumis sativus</i> (hıyar)	01.03.2023	6. Bitki
25	MOH 10	<i>Cucumis sativus</i> (hıyar)	01.03.2023	6. Bitki
26	MOH 11	<i>Cucumis sativus</i> (hıyar)	01.03.2023	6. Bitki
27	MOH 12	<i>Cucumis sativus</i> (hıyar)	01.03.2023	6. Bitki
28	MOKa 1-1	<i>Cucumis melo</i> (kavun)	14.03.2023	7. Bitki
29	MOKa 1-2	<i>Cucumis melo</i> (kavun)	14.03.2023	7. Bitki
30	MOKa 1-3	<i>Cucumis melo</i> (kavun)	14.03.2023	7. Bitki
31	MOKa 1-4	<i>Cucumis melo</i> (kavun)	14.03.2023	8. Bitki
32	MOKa 1-5	<i>Cucumis melo</i> (kavun)	14.03.2023	8. Bitki
33	MOKa 1-6	<i>Cucumis melo</i> (kavun)	14.03.2023	8. Bitki
34	MOK 1-1	<i>Cucurbita pepo</i> (kabak)	30.03.2023	9. Bitki
35	MOK 1-2	<i>Cucurbita pepo</i> (kabak)	30.03.2023	9. Bitki
36	MOK 1-3	<i>Cucurbita pepo</i> (kabak)	30.03.2023	9. Bitki
37	MOK 1-4	<i>Cucurbita pepo</i> (kabak)	30.03.2023	9. Bitki
38	MOK 2-1	<i>Cucurbita pepo</i> (kabak)	30.03.2023	10. Bitki
39	MOK 2-2	<i>Cucurbita pepo</i> (kabak)	30.03.2023	10. Bitki
40	MOK 2-3	<i>Cucurbita pepo</i> (kabak)	30.03.2023	10. Bitki
41	MOK 2-4	<i>Cucurbita pepo</i> (kabak)	30.03.2023	10. Bitki

4.3. Bakteri İzolatlarının Tanısı

Potasyum Hidroksit ile Gram Reaksiyon: Karşılaştırma izolatu olarak kullanılan YA-26 kodlu *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* izolatının ve kabakgil bitkilerinden hıyar, kabak ve kavun bitkilerinden izole edilen 41 adet bakteri izolatının tümünün Gram negatif hücre yapısına sahip olduğu belirlenmiştir. Yine karşılaştırma izolatu olarak kullanılan YA-95 kodlu *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* izolatının Gram pozitif bakterilere ait hücre yapısına sahip olduğu tespit edilmiştir.

TSA ve King B Besiyerlerinde Koloni Morfolojisi: Hıyar, kabak ve kavun bitkilerinden izole edilen 41 adet bakteri izolatının tümünün TSA besiyerinde rengi, büyüklüğü, yüksekliği, kenar şekli ve kıvamı özelliğe sahip koloniler oluşturduğu belirlenmiştir. İzolatların tümü King B besi yerinde floresan tipte koloniler olarak gelişmiştir (Şekil 4.8).

Levan Oluşumu: Levan oluşumu testlemeleri sonucunda, hıyar, kabak ve kavundan elde edilen izolatlar SNA besiyerinde kubbemsi bir gelişim göstererek levan pozitif olarak belirlenmişlerdir. *Erwinia amylovora* (YA-241 kodlu) izolatu kabakgil izolatlarına göre daha kubbemsi ve inci gibi koloniler üretmişlerdir.

Oksidaz Testi: *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (YA-26 kodlu) izolatu ile hıyar, kabak ve kavundan elde edilen izolatların tümü Oksidaz negatif olarak belirlenirken *Acidovorax citrulli* (YA-913 kodlu) izolatının oksidaz pozitif özellikte olduğu saptanmıştır.

Patateste Pektolitik Enzim Aktivitesi: Karşılaştırma izolatu olarak kullanılan *Pectobacterium carotovorum* (YA-713 kodlu) patates dilimlerinde çürümeye neden olarak pektolitik aktivite testinin pozitif olduğunu gösterirken kabakgil izolatlarının tümü patateste herhangi bir çürümeye neden olmamış ve pektolitik enzim üretme yetenekleri negatif olarak saptanmıştır.

Arginin Dehidrolase Testi: Karşılaştırma amacıyla kullanılan *Pseudomonas corrugata* (YA-731 kodlu) kültürü arginin dehidrolase testi sonucunda pozitif olarak değerlendirilirken kabakgil izolatlarının tümünün negatif sonuç verdiği belirlenmiştir.

Tütünde Aşırı Duyarlılık Reaksiyonu: *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (YA-26 kodlu) izolatu ve kabakgil izolatlarının tümü 24-48 içinde tütün damar aralarında bakteri süspansiyonunun enjekte edildiği yerde nekrotik alanlar oluşturmuş ve tütünde aşırı duyarlılık reaksiyonu göstermişlerdir.

Patojen Bakteri İzolatlarının MALDI-TOF MS ile Tanısı: MALDI TOF MS ile yapılan tanı sonucunda, sırasıyla MOKa-1, 2.379, MOKa 1-1, 2.352, MOK-1 2.350 ve MOH-1 izolatu 2.235 indeks değerleri ile tür düzeyinde *Pseudomonas syringae* olarak tanılanmıştır.

Çizelge 4.3. Patojen izolatlarının tanı testlerinde elde edilen sonuçlar

Testler	Hıyar İzolatları (19 adet)	Kabak İzolatları (8 adet)	Kavun İzolatları (14 adet)
Floresan pigment	+	+	+
Gram reaksiyon	-	-	-
L (levan oluşumu)	+	+	+
O (Oksidaz testi)	-	-	-
P (Pektolitik aktivite)	-	-	-
A (Arginin reaksiyonu)	-	-	-
T (Tütünde aşırı duyarlılık)	+	+	+

+: pozitif reaksiyon; -: negatif reaksiyon

Çizelge 4.3'te görüldüğü gibi hıyardan izole edilen 19 adet, kabaktan izole edilen 8 adet ve kavundan izole edilen 14 adet izolatın tümünün (41 adet) *Pseudomonas syringae* olduğu Gram reaksiyon, LOPAT testleri, farklı besiyerlerindeki (TSA ve King B) koloni morfolojisi ve MALDI-TOF MS yöntemiyle belirlenmiştir. İzolatların pathovar düzeyinde tanısında patojenite testlerinden yararlanılmıştır.

4.4. Farklı Kabakgil Bitkilerinde Patojenite Testleri

Laboratuvar koşullarında koparılmış hıyar ve limon meyveleri üzerinde yapılan patojenite testinde, inokulasyondan 5-7 gün sonra inokulasyon noktası etrafında hıyar meyvelerinde su emmiş alanlar ve limon meyvelerinde içe çökük kahverengi lekeler tespit edilmiştir (Şekil 4.9). Çizelge 4.4.'de görüldüğü gibi, hıyar, kabak ve kavundan izole edilen bakterilerin tümü farklı konukçulara ait meyvelerin en az birinde hastalık oluşturarak patojen izolatlar oldukları kanıtlanmıştır. Çalışmada kullanılan 41 izolatın tümü hıyar meyvelerini hastalandırırken sadece kavun izolatları limon meyvelerini hastalandırmıştır. Pozitif kontrol olarak kullanılan YA-26 kodlu *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* izolatı da hem limon hem de hıyar meyvelerini hastalandırmıştır. Negatif kontrol olarak kullanılan steril su uygulaması yapılan meyvelerin hiçbirinde hastalık belirtisi gözlenmemiştir. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* izolatlarının limon, hıyar, kabak, kavun ve karpuz bitkileri gibi geniş bir konukçu dizisini hastalandırırken *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* izolatlarının sadece hıyar ve kabak bitkilerini hastalandırdığı (Lelliot ve Stead, 1987), karpuzda hastalığın ya hiç ya da çok az düzeyde ortaya çıktığı (Özaktan ve Bora, 1994) bilinmektedir. Bu denemede elde ettiğimiz veriler de bu bilgiyi desteklemektedir. Koparılmış meyvelerde yapılan patojenite testine göre, kavundan elde edilen 14 izolatın *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* olduğu, hıyar ve kabaktan elde edilen 27 izolatın *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.4. Patojen izolatların koparılmış hıyar ve limon meyvelerinde patojenite testleri

Testler	Hıyar İzolatları (19 adet)	Kabak İzolatları (8 adet)	Kavun İzolatları (14 adet)	YA-26 (Pss izolatı)	Steril Su
Hıyar Meyveleri	+	+	+	+	-
Limon Meyveleri	-	-	+	+	-

+: pozitif reaksiyon; -: negatif reaksiyon



Şekil 4.9. Koparılmış limon (üstte) ve hıyar meyvelerinde (altta) patojenite testleri sonucu oluşan hastalık belirtisi

Çizelge 4.5.'de görüldüğü gibi, sağlıklı kabakgil (hıyar, kabak, kavun ve karpuz) fideleri üzerinde, seçilen 10 izolatla, cam serada koşullarında yapılan patojenite testlerinde, izolatların tümü Borna F1 çeşidi hıyar fidelerini (Şekil 4. 10) ve Miço F1 çeşidi kabak fidelerini (Şekil 4. 11) hastalandırmıştır. Hıyar ve kabak bitkilerinin gerçek yapraklarında ıslak lekeler şeklinde haşlayan hastalık belirtileri onikinci günde ortaya çıkarken, onbeşinci günde etrafı sarı kahverengi lekelerle dönüşmüştür. Lekeler genellikle yaprak kenarlarında oluşmuştur. Yaprak ayasında meydana gelen lekeler hızlıca ilerleyerek birkaç gün içinde yaprak ayasını kapladıkları gözlenmiştir. Kırkağaç tipi kavun çeşitleri olan Hermanos F1 ve Bravos F1 çeşitlerine ait fidelerin yapraklarında sadece kavundan elde edilen bakteriyel izolatlar hastalık oluşturmuştur. Kavun yapraklarında kahverengi lekeler meydana gelmiştir (Şekil 4.12). İzolatların hiçbirisi Karain F1 ve Sahra F1 çeşitlerine ait karpuz fidelerini hastalandırmamıştır. Pozitif kontrol olarak kullanılan YA-26 kodlu *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* izolatı hıyar, kavun ve kabak fidelerini hastalandırmıştır. Negatif kontrol olarak su uygulanan bitkilerde herhangi bir leke tespit edilmemiştir.

Çizelge 4.5. Patojen izolatların farklı kabakgil türlerine ait fidelerde patojenite testleri

	Hıyar İzolatları (4 izolat)	Kabak İzolatları (2 izolat)	Kavun İzolatları (4 izolat)	YA-26 (Pss izolatı)	Steril Su
Hıyar (Borna çeşidi)	+	+	+	+	-
Kavun (Hermanos çeşidi)	-	-	+	+	-
Kavun (Bravos çeşidi)	-	-	+	+	-
Kabak (Miço çeşidi)	+	+	+	+	-
Karpuz (Karain çeşidi)	-	-	-	-	-
Karpuz (sahra çeşidi)	-	-	-	-	-

+: pozitif reaksiyon; -: negatif reaksiyon

İnokulasyondan 15 gün sonra yapılan değerlendirmede hıyardan ve kabaktan elde edilen bakteri izolatları hıyar ve kabak bitkilerine ait fideleri hastalandırırken kavundan izole edilen bakteri izolatları hıyar, kabak ve kavun bitkilerini hastalandırdığı saptanmıştır. Farklı kabakgil türlerine ait fidelerde yapılan patojenite test sonuçlarına göre, kavundan elde edilen 4 izolatın *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* olduğu, hıyar ve kabaktan elde edilen 6 izolatın *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.10. Hıyar fidelerindeki patojenite testi sonucu meydana gelen yaprak lekeleri



Şekil 4.11. Kabak fidelerindeki patojenite testi sonucu meydana gelen yaprak lekeleri



Şekil 4.12. Kavun fidelerindeki patojenite testi sonucu meydana gelen yaprak lekeleri

4.5. Biyolojik Mücadele Çalışmaları

Pseudomonas syringae pv. *lachrymans*'ın neden olduğu Hıyar Köşeli Yaprak Leke Hastalığının biyolojik mücadelesine odaklanılan bu kısımda, kullanılan aday antagonistler kabakgil bitkilerinin doğal olarak yetiştiği floradan, bu alanların toprağından, yeşil aksamından, meyvelerinden ve tohumlarından izole edilmiştir. İzole edilen antagonist bakterilerin etki mekanizmaları ve biyolojik tohum uygulamalarındaki faaliyetlerinin sonucu aşağıda verilmiştir.

Aday Antagonistlerin Eldesi: Hıyar Köşeli Yaprak Leke hastalığı etmeni *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*'ın biyolojik mücadelesinde kullanılmak üzere yapılan aday antagonist izolasyonları sonucunda, kabakgil yetiştiriciliği yapılan topraktan 39 adet, kabakgil yeşil aksamından 27 adet, kabakgil meyvelerinden 24 adet ve kabakgil tohumlarından 44 adet olmak üzere toplam 134 adet aday antagonist izole edilmiştir. Ayrıca bakteriyoloji laboratuvarı kültür koleksiyonunda bulunan 164 adet aday antagonist de çalışmaya dahil edilmiştir ve toplam 298 adet bakteri izolatu çalışmada aday antagonist olarak kullanılmıştır.

Aday Antagonistlerin Seçimi: Çalışmada kullanılan toplam 298 adet aday antagonist bakterinin 29 adeti *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*'a karşı antibakteriyel etki göstererek besi yerinde patojenin gelişimini baskılamıştır. Çizelge 4.6'da görüldüğü gibi, petrilerde gelişen antagonist izolatların çapı ile çevresinde oluşan engelleme zonları mm olarak ölçülerek "Antagonistik İndeks Değerleri" hesaplandığında, 29 izolat 1.71-5.33 indeks değeri arasında değişiklik göstermiştir. En yüksek antagonistik indeks değerleri 5.33 ile NÇ-YK-I isimli antagonist bakteri izolatında olmuş ve tek bir istatistiki grupta yer almıştır. OG1-9 kodlu antagonist de 4.08 indeks değeri ile ayrı bir grupta yer alan bir diğer başarılı antagonistik etki gösteren izolat olmuştur. Bunu sırasıyla, 3.68 ve 3.66 indeks değeriyle aynı istatistiki grupta yer alan TOROS-6 ve NÇ-KK kodlu izolatlar takip etmiştir. NÇ-YK-R 3.59, YL4-3 3.32 ve DK-SARI 3.23 antagonistik indeks değeri oluşturarak başarılı antagonistler arasında yer almışlardır. Etkili antagonistler olarak değerlendirilen 22 izolat ortalama 1.71-2.78 arasında indeks değeri oluşturarak istatistiki analiz sonucunda 16 farklı istatistiki grupta yer almış ve patojeni baskılama yeteneğinde oldukları tespit edilmiştir (Çizelge 4.6).

Antibakteriyel etkiye sahip 29 adet antagonist izolatın 18 adeti, yarayışsız formda olan (Fe^{+3}) demiri yarayışlı forma (Fe^{+2}) dönüştürme yeteneğine yani siderofor üretme yeteneğine sahip olduğu tespit edilmiştir. Antagonistlerin siderofor oluşturma indeks değerleri 1.13 ile 2.65 aralığında değişim göstermiştir. Değerlendirme sonucunda siderofor oluşturma yeteneği en etkili izolatlar sırasıyla 2.65 ile HA4 kodlu antagonist iken, bunu 2.59 ile LOG-6, 2.55 ile HA8, 2.52 ile YL4-3 ve 2.50 ile HA9 kodlu antagonistler izlemiştir (Çizelge 4.6).

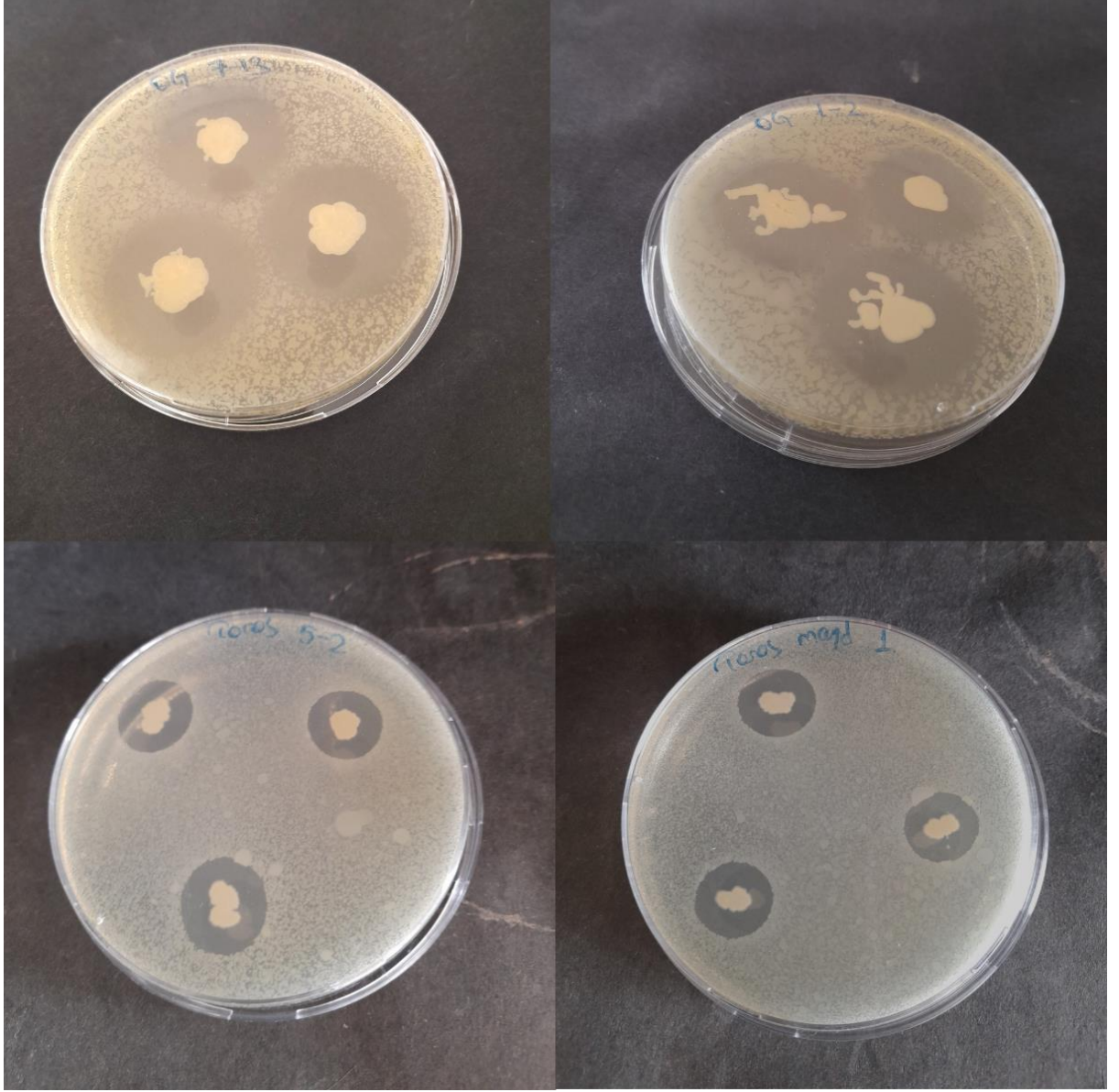
Çizelge 4.6. Antagonist bakterilerin etki mekanizmaları

Antagonistler	Antibakteriyel Etki	Siderofor Üretme	IAA (µg/ml)	Fosforu Çözme
NÇ-YK-I	5.33 ^a	1.87 ^{cd}	8.01 ^q	Negatif
OG1-9	4.08 ^b	1.87 ^{cd}	12.96 ^g	Negatif
TOROS 6	3.68 ^c	0.00 ^g	16.20 ^f	Negatif
NÇ-KK	3.66 ^c	0.00 ^g	26.30 ^d	Negatif
NÇ-YK-R	3.59 ^{cd}	2.32 ^{ab}	10.46 ^j	Negatif
YL4-3	3.32 ^{de}	2.52 ^a	7.50 ^s	Negatif
DK-SARI	3.23 ^d	2.40 ^{ab}	10.12 ^l	Negatif
KONYA5-1	2.78 ^f	0.00 ^g	11.25 ⁱ	Negatif
LOG6	2.77 ^f	2.59 ^a	6.76 ^u	Negatif
OG1-2	2.75 ^{fg}	1.95 ^c	170.50 ^a	Negatif
OG7-13	2.68 ^{fgh}	2.11 ^{bc}	170.50 ^a	Negatif
TOROS5-1	2.65 ^{fi}	0.00 ^g	11.25 ⁱ	Negatif
AY10 M2	2.55 ^{fj}	2.26 ^{ab}	10.46 ^j	Negatif
HA8	2.48 ^{gi}	2.55 ^a	9.89 ^m	Negatif
TURUNÇ 2-6	2.46 ^{hij}	1.18 ^f	6.37 ^v	Negatif
HA1	2.38 ^{ijk}	0.00 ^g	9.04 ^o	Negatif
TOROS5-2	2.38 ^{ijk}	0.00 ^g	7.73 ^r	Negatif
OG7-7	2.27 ^{ikl}	1.33 ^{ef}	170.50 ^a	Negatif
AZ106-2	2.15 ^{klm}	1.43 ^{ef}	73.88 ^c	Negatif
OG6-7	2.10 ^{klm}	0.00 ^g	9.89 ^m	Negatif
AD4-2	2.08 ^{lmn}	1.57 ^{de}	170.50 ^a	Negatif
HA9	2.01 ^{lo}	2.50 ^a	149.47 ^b	Negatif
OG8-8	1.99 ^{lo}	1.14 ^f	9.26 ⁿ	Negatif
MYAPRAK3	1.90 ^{m-p}	0.00 ^g	11.59 ^h	Negatif
HA3	1.88 ^{mp}	1.13 ^f	10.46 ^j	Negatif
X77	1.81 ^{nop}	0.00 ^g	16.49 ^e	Negatif
HA4	1.79 ^{op}	2.65 ^a	8.70 ^p	Negatif
OG1-10	1.78 ^{op}	0.00 ^g	7.16 ^t	Negatif
LÇ8	1.71 ^p	0.00 ^g	10.23 ^k	Negatif

*: farklı harfi içeren ortalamalar LSD testine (%5 önem düzeyinde) göre istatistiksel olarak farklıdır.

Antibakteriyel etkiye sahip 29 adet antagonist izolatın 18 adetinin, bitki büyümesinde ve gelişmesinde oldukça önemli bir role sahip olan IAA üretim miktarlarının 10.12-170.5 µg/ml aralığında değişim gösterdiği belirlenmiştir. IAA üretim değeri 170.5 µg/ml olan 4 adet antagonist bakteri (AD 4-2, OG 7-7, OG 1-2 ve OG 7-13 kodlu izolatlar) tespit edilmiştir. Bu değerleri 149.47 µ/ml yoğunlukla HA-9, 73.88 µg/ml ile AZ10-6-2 ve 26.3 µg/ml ile NÇ-KK isimli izolatlar takip etmiştir (Şekil 4.13).

Antibakteriyel etkiye sahip 29 adet antagonisten hiçbirisi tri-kalsiyum fosfat içeren PVK besi yerinde fosforu çözme başaramamıştır.



Şekil 4.13. Antagonist bakterilerin patojen bakteri ile oluşturduğu inhibisyon zonları

Antagonistlerin Tohum Kökenli Hıyar Köşeli Yaprak Leke Hastalığı'na Etkisi: Birinci biyolojik tohum denemesinde, *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* ile suni olarak bulaştırılmış hıyar tohumlarına 15 adet antagonist bakteri (NÇ-KK, NÇ-YK-I, NÇ-YK-R, DK-SARI OG 7-13, OG 7-7, OG 1-2, OG 8-8, YL 4-3, AY10-M2, AZ10-6-2, AD4-2, X77, HA9 ve HA3 kodlu izolatlar) uygulandığında, tohumdaki patojen popülasyonunda azalma olduğundan Hıyar Köşeli Yaprak Leke Hastalığının %20.78 -78.39 oranında azaldığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.7). Negatif kontrol olarak sadece steril suyla muamele görmüş hıyar tohumlarından çimlenen fidelerin hiçbirinde herhangi bir hastalık gözlenmemiştir. Bu durum, denemede kullanılan hıyar tohumlarının herhangi bir patojenle bulaşık olmadığına göstergesidir. Pozitif kontrol olarak *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* ile bulaşık hıyar tohumlarından gelişen fidelerin yaklaşık %53'ünde hastalık belirlenmiştir. Şekil 4.14'te görüldüğü üzere, hıyar tohumlarında patojen bulaşıklığından dolayı kotiledon yapraklarda su emmiş lekeler ortaya çıkmış ve üç gün içinde bu belirtiler kahverengi etrafı sarı haleyle çevrili lekelerle dönmüştür. İlerleyen dönemlerde, özellikle nem varlığında beşinci günden sonra fidelerde ölümler meydana gelmiştir.

Çizelge 4.7. Hıyar Köşeli Yaprak Leke Hastalığına Biyolojik Tohum Uygulamalarının Etkisi (Birinci Deneme)

Antagonistler	Hastalık Oranı (%)	Etki (%)	Hastalık Şiddeti (Skala değeri ort.)	Etki (%)
Pozitif Kontrol	52.88 ^{ab}	-	1.05 ^a	-
HA3	55.84 ^a	-5.60	0.96 ^a	7.95
AZ10-6-2	50.72 ^b	4.08	0.88 ^{ab}	15.48
HA9	50.62 ^b	4.27	0.95 ^a	8.57
NÇ-YK-R	41.89 ^c	20.78	0.72 ^{bc}	30.89
OG 7-13	41.60 ^c	21.33	0.58 ^{cd}	44.35
NÇ-YK-I	38.82 ^{cd}	26.59	0.68 ^{bc}	34.87
DK-SARI	35.71 ^{de}	32.47	0.59 ^{cd}	43.74
YL4-3	32.65 ^e	38.26	0.46 ^{de}	56.20
OG 1-2	27.78 ^f	47.47	0.31 ^{efg}	70.06
X-77	27.23 ^f	48.51	0.37 ^{defg}	72.61
OG 8-8	25.08 ^{fg}	52.57	0.38 ^{defg}	63.98
AY10M2	23.81 ^{fg}	54.97	0.40 ^{def}	61.42
AD 4-2	21.41 ^g	59.51	0.23 ^{fg}	78.26
OG 7-7	14.73 ^h	72.14	0.29 ^{efg}	72.61
NÇ-KK	11.43 ^h	78.39	0.16 ^g	64.21

*: farklı harf içeren ortalamalar LSD testine (%5 önem düzeyinde) göre istatistiksel olarak farklıdır.

Çizelge 4.8'de görüldüğü gibi, istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, üç biyolojik tohum uygulaması (HA3, AZ10-6-2 ve HA9 kodlu izolatlar) pozitif kontrolle aynı grupta yer alan başarısız uygulamalar olarak belirlenmiştir. Geriye kalan 12 biyolojik tohum uygulaması (NÇ-KK, OG 7-7, AD

4-2, AY10M2, OG 8-8, X-77, OG 1-2, YL4-3, DK-SARI, NÇ-YK-I, OG 7-13 ve NÇ-YK-R) pozitif kontrolden farklı bir istatistiki grupta yer aldığından hastalığı baskılayan başarılı tohum uygulamaları olarak saptanmıştır. Bu etkili antagonistler hastalığı de %20.78-78.39 oranında baskımlarken, hastalık şiddetindeki azalışın %30.89-78.26 aralığında olduğu tespit edilmiştir.

Başarılı olan 12 biyolojik tohum uygulaması içerisinde, en etkili olanların NÇ-KK ve OG 7-7 kodlu antagonist bakterilerin yer aldığı uygulamalar olduğu tespit edilmiştir. NÇ-KK, %78 ve OG 7-7, %72 oranında hastalığı baskımlarken hastalık şiddetini de sırasıyla %64 ve %73 oranında azaltmıştır.

Diğer başarılı tohum uygulaması olan AD 4-2, AY10M2, OG 8-8, X-77 ve OG 1-2 kodlu antagonistlerin kullanıldığı parsellerde, hastalık %47-60 oranında azalırken hastalık şiddetindeki azalışın %61-78 arasında olduğu saptanmıştır. İstatistiksel olarak etkili bulunan diğer uygulamalarda (YL4-3, DK-SARI, NÇ-YK-I, OG 7-13 ve NÇ-YK-R) hastalık %21-38 oranında baskılanırken hastalık şiddetindeki azalış %31-56 düzeyinde olmuştur.



Şekil 4.14. Hastalığın ilk aşamalarında pozitif kontrolde kotiledon yapraklardaki su emmiş lekeler (solda), hastalığın ilerleyen aşamalarında sarı haleli nekrotik lekeler ve ölmüş fideler (sağda).

İkinci bir tohum denemesi kurmak için seçilen antagonistler öncelikle ilk tohum denemesi sonuçları göz önünde bulundurularak değerlendirilmiş ve istatistiki olarak en başarılı sonuç veren iki antagonist uygulaması NÇ-KK ve OG 7-7 seçilmiştir. İki uygulama sayıca yetersiz görüldüğü için diğer uygulamalar içerisinde antimikrobiyal etki, IAA üretme yeteneği ve siderofor üretme yeteneği de göz önünde bulundurularak üç antagonist (X77, AD 4-2 ve OG 1-2) daha seçilmiştir. Toplam 5 adet antagonist bakteri ile ikinci biyolojik tohum denemesi basamağına geçilmiştir.

Tohum denemelerinde kullanılmak üzere seçilen 5 adet (NÇ-KK, AD 4-2, OG 1-2, OG 7-7 ve X-77 kodlu izolatlar) antagonist bakterinin ikili kombinasyonlarının da denemelere dahil edilmesi amaçlanmıştır. Bu sebeple antagonist bakterilerin birbirleriyle etkileşimlerini belirlemek için ikili kültür petri denemelerine başvurulmuş ve ikili kültür petri denemelerinde birbirlerine karşı engelleme zonu oluşturan antagonist bakteri çiftlerinin etkileşimleri pozitif olarak değerlendirilmiştir. Çizelge 4.8’de görüldüğü gibi 5 adet antagonist bakterinin yalnızca bir çiftinin birbirleriyle etkileşime girmedikleri (OG 1-2 VE OG 7-7) ve tohum denemelerinde kullanılabileceği anlaşılmıştır.

Çizelge 4.8. Antagonist bakteri çiftlerinin birbirleriyle etkileşimlerinin sonuçları

Antagonistler	AD 4-2	OG 1-2	OG 7-7	NÇ-KK	X77
X77	+	+	+	+	x
NÇ-KK	+	+	+	x	+
OG 7-7	+	-	x	+	+
OG 1-2	+	x	-	+	+
AD 4-2	x	+	+	+	+

x* aynı izolatlar olduğundan etkileşimleri incelenmedi

İkinci deneme; ilk deneme ve antagonistlerin etki mekanizmaları göz önünde bulundurularak seçilen 5 adet antagonist (NÇ-KK, AD 4-2, OG 1-2, OG 7-7 ve X-77) ve 1 adet kombinasyon (OG 1-2 ve OG 7-7) ile kurulmuştur. Hastalığın %11-19 aralığında azaldığı tespit edilmiştir. Negatif kontrol olarak yalnızca steril suya daldırılmış hıyar tohumlarından çimlenen fidelerin hiçbirinde herhangi bir hastalık belirtisine rastlanmamıştır. Pozitif kontrol olarak *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* ile bulaşık hıyar tohumlarından gelişen fidelerin %100’ünde hastalık varlığı tespit edilmiştir (Şekil 4.15). Çizelge 4.9’da görüldüğü gibi istatistiksel olarak değerlendirildiğinde tüm antagonist uygulamaları pozitif kontrolden farklı grupta yer almış ve başarılı uygulamalar olarak değerlendirilmiştir. Hastalık şiddetini %20.45-40.52 aralığında azalttıkları belirlenmiştir.

Çizelge 4.9. Hıyar Köşeli Yaprak Leke Hastalığına Biyolojik Tohum Uygulamalarının Etkisi (İkinci Deneme)

Antagonistler	Hastalık Oranı (%)	Etki(%)	Hastalık Şiddeti (Skala değeri ort.)	Etki(%)
Pozitif Kontrol	100.00 ^a	-	2.69 ^a	
NÇ-KK	88.87 ^b	11.13	1.60 ^c	40.52
OG 1-2	88.00 ^{bc}	12.00	1.67 ^c	37.92
AD 4-2	87.55 ^{bc}	12.45	2.14 ^b	20.45
X-77	84.64 ^{bc}	15.36	1.74 ^c	35.32
OG 1-2 VE OG 7-7	81.99 ^{bc}	18.01	1.68 ^c	37.55
OG 7-7	80.78 ^c	19.22	1.80 ^c	33.09

*: farklı harfi içeren ortalamalar LSD testine (%5 önem düzeyinde) göre istatistiksel olarak farklıdır.

Her iki deneme için de OG 7-7 en başarılı tohum uygulaması olarak kaydedilmiştir ve ikinci uygulamada hastalığı %19 oranında engellerken hastalık şiddetindeki azalışın %33 olduğu tespit edilmiştir. Uygulamalar içinden 4 tanesi aynı istatistiki grupta yer alarak hastalığı sırasıyla OG 1-2 %12, AD 4-2 %12.45, X77 %15.36 ve Kombinasyon %18 oranında engellemiş ve hastalık şiddetinde ise %20 -%38 arasında bir azalışa neden olduğu belirlenmiştir. İlk denemede de en başarılı uygulamalardan biri olan NÇ-KK izolatu hastalık şiddetindeki azalışın en yüksek olduğu uygulama olmuş, %41 oranında hastalık şiddetini azaltırken, hastalık oranında %11'lik bir etki göstermiş ve istatistiki olarak başarılı bir uygulama olarak değerlendirilmiştir. Şekil 4.16'da da görüldüğü gibi antagonist bakteri uygulamaları gözle görülür bir şekilde bitki büyümesinde ve hastalığın baskılanmasında önemli bir rol oynamıştır.



Şekil 4.15. Pozitif kontrol (solda) ve OG 1-2 kodlu antagonist bakteri uygulanmış küvet görünümü (sağda)



Şekil 4.16. Pozitif kontrole ait bitkiler (solda) ve negatif kontrole ait bitkiler (sağda)

Başarılı Antagonistlerin Tohum Çimlenmesine Etkisi: Tohum denemeleri sonucunda *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*'ın neden olduğu Hıyar Köşeli Yaprak Leke hastalığını başarılı bir şekilde baskılayan antagonist bakterilerin tohum çimlenmesine etkisi araştırıldığında, tüm antagonist bakteri uygulamalarının (OG 1-2, NÇ-KK, OG 7-7, AD 4-2 Kombinasyon ve X77) kontrolle aynı grupta yer aldığını ve istatistiki olarak tohum çimlenmesinde bir azalışa neden olmadığı sonucuna varılmıştır.

Çizelge 4.10. Başarılı Antagonistlerin Tohum Çimlenmesine Etkisi

Antagonistler	Ekilen Tohum Sayısı	Çimlenen Tohum Sayısı	Çimlenme Oranı (%)	Değişim
Kontrol (saf su)	75	75	100.00 ^a	-
OG 1-2	75	75	100.00 ^a	-
NÇ-KK	75	73	97.33 ^a	2.67
OG 7-7	75	73	97.33 ^a	2.67
AD 4-2	75	72	96.00 ^a	4.00
OG 1-2 ve OG 7-7	75	72	96.00 ^a	4.00
X77	75	71	96.67 ^a	5.33

*: farklı harfi içeren ortalamalar LSD testine (%5 önem düzeyinde) göre istatistiksel olarak farklıdır.

Başarılı Antagonistlerin Tanısı: Başarılı antagonist bakterilerin tanılanma aşamasında tütünde aşırı duyarlılık reaksiyonu, patatesten pektolitik enzim aktivitesi, 36 °C'de gelişim ve MALDI-TOF MS yöntemlerine başvurulmuştur.

Tohum denemelerinde kullanılan 5 adet antagonist bakteri (AD 4-2, OG 1-2, OG 7-7, NÇ-KK ve X77) için tütünde aşırı duyarlılık reaksiyonu testi yapılmış ve tüm antagonist bakteri izolatları negatif sonuç vermiştir. Ardından bu beş izolat patatesten pektolitik enzim aktivitesi testine tabii tutulmuş ve yine tüm antagonist bakteriler patatesten herhangi bir yumuşama/çürümeye neden olmaksızın negatif sonuç vererek nişastayı parçalama yeteneklerinin olmadığı anlaşılmıştır. Antagonist bakterilerin insan patojeni olma riskinin varlığını kanıtlamak için yapılan 36 °C'de gelişim testlerinde ise antagonist bakterilerden hiçbirinin 36 °C'de gelişemediği gözlemlenmiştir. Laboratuvar testlerinin ardından MALDI-TOF MS ile yapılan tanı sonucunda NÇ-KK kodlu izolatın 1.825 indeks değeri ile *Enterococcus casseliflavus*, AD 4-2 kodlu izolatın 1.882 indeks değeri ile *Bacillus mojavensis*, OG 1-2 kodlu izolatın 2,133 indeks değeri ile *Bacillus pumilus*, OG 7-7 kodlu izolatın 2.386 indeks değeri ile *Providencia rettgeri* ve X77 kodlu izolatın 2.190 indeks değeri ile *Bacillus amyloliquefasciens* olduğu tanılanmıştır (Çizelge 4.11).

Çizelge 4.11. Antagonist bakterilerin MALDI-TOF MS sonuçları

Antagonistler	Skor değeri	MALDI TOF-MS
AD4-2	1.882	<i>Bacillus mojavensis</i>
X77	2.190	<i>Bacillus amyloliquefasciens</i>
OG1-2	2.133	<i>Bacillus pumilus</i>
OG7-7	2.386	<i>Providencia rettgeri</i>
NÇ-KK	1.825	<i>Enterococcus casseliflavus</i>



5. TARTIŞMA

Hıyar, kabak, acur, bal kabağı, kavun ve karpuzun da içinde bulunduğu kabakgiller ailesi, ülkemiz dahil pek çok ülkede yaygın olarak yetiştirilen ve tüketilen bitkilerdir. *Acidovorax citrulli*, *Dickeya dadantii*, *Erwinia carnegiena*, *Erwinia tracheiphila*, bazı *Enterobacter* üyeleri, *Pantoea ananatis*, *Pseudomonas cichorii*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas syringae* pv. *aptata*, *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Pseudomonas viridiflava*, *Ralstonia solanacearum*, *Sphingomonas melonis* ve *Xanthomonas campestris* pv. *cucurbitae* adlı bakteri türleri bu bitkileri hastalandırarak verim ve kalite kayıplarına neden olan patojen bakterilerdir (Keinath ve ark., 2017). Adana ilinde ticari kabakgil fidesi üretilen alanlar 2023 yılında incelenmiş ve yapılan izolasyonlar sonucu sorun olan bakteriyel patojenler ortaya konmuştur. Bu ilde yaklaşık 10 yıldır kabakgil bakteri hastalıklarının tespiti üzerine araştırma yapılmadığından yeni bakteriyel hastalıkların varlığı ve bilinen hastalıkların durumu hakkında yeni veriler elde edilmiştir. Yapılan bu çalışma sonucunda Adana ilinde ticari kabakgil fidesi üretilen alanlarda yeni bir bakteriyel patojen tespit edilmemiştir. Hasta hıyarlardan izole edilen 19 adet ve hasta kabak bitkilerinden izole edilen 8 adet izolat *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*, hasta kavunlardan izole edilen 14 adet izolat *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* olarak tanımlanmıştır.

Çukurova Bölgesinde 2009 ve 2010 yıllarında *Acidovorax citrulli* karpuz ve kavunda büyük bir epidemi yapmasına (Mirik ve ark., 2006; Horuz ve ark., 2014) rağmen bu çalışma kapsamında yapılan izolasyonlarda bu patojen bakteri tespit edilmemiştir. Yaşanan büyük ekonomik kayıplardan sonra ticari tohum ve fide üreticilerinin daha dikkatli üretim yaptıkları ve gerekli önlemleri aldıkları, ayrıca Tarım Bakanlığına bağlı karantina kuruluşlarının da aynı titizliği gösterdiği düşüncesi akla gelmiştir.

Ticari fideliklerde saptanan *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* ve *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* ile bulaşık kabakgil fideleri üreticiye satılmamakta, imha edilmek zorunda kalınmaktadır. Bu hastalıkların neden olduğu ekonomik kayıpları ortadan kaldırmak için ilk inokulum kaynaklarından olan tohumlardaki bulaşıklığın yok edilmesi veya azaltılması gerekmektedir. Bu nedenle tohum ekiminden önce yapılan fiziksel, kimyasal ve biyolojik tohum uygulamaları önemli bir mücadele stratejisi olarak kabul edilmektedir. Kimyasalların, çevreye, hedef dışı canlılara, insan sağlığına olan olumsuz etkileri ve patojenlerin bu kimyasallara direnç geliştirme problemi nedeniyle son yıllarda biyolojik tohum uygulamalarına yönelimin arttığı bir gerçektir. Biyolojik çözümler, hastalığı baskı altına almanın yanı sıra, topraktaki ve bitkinin yeşil aksamındaki biyolojik çeşitliliği de koruyarak ekosistemin dengede kalmasını sağlamaktadır.

Çukurova Bölgesindeki kabakgil üretim alanlarından ve tohumların yüzeyinden izole edilen yerel antagonistlerle (toplam 298 adet) yapılan biyolojik tohum uygulamaları sonucunda *Pseudomonas*

syringae pv. *lachrymans*'ın neden olduğu Hıyar Köşeli Yaprak Leke Hastalığı %21-78 oranında baskılanırken hastalık şiddetinde %31-78 oranında bir azalış saptanmıştır. En başarılı 5 antagonistle yapılan ikinci bir denemede bu antagonistlerin başarısı bir kez daha teyit edilmiştir. Bu başarılı antagonistler *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus mojavensis*, *Bacillus pumilus*, *Enterococcus casseliflavus* ve *Providencia rettgeri* olarak tanımlanmıştır.

Biyolojik tohum uygulamasında kullandığımız bu dost mikroorganizmaların antimikrobiyal madde ve siderefor üreterek patojeni baskı altına aldığı, ayrıca büyüme hormonu olan IAA üreterek bitkide sağlıklı büyümeyi teşvik ettiği belirlenmiştir. Genel olarak antagonist bakterilerin bu yeteneklerinin yanında topraktaki fosforu çözerek ve azotu fikse ederek bitkinin topraktan besin elementi alımını arttırdığı bilinmektedir. Bunlara ek olarak bitkiyi tuzluluk, kuraklık gibi abiyotik stres faktörlerinden de koruma yetenekleri bulunmaktadır (Mercado-Blanco ve Lugtenberg, 2014; Olur, 2020). Dost mikroorganizmaların tüm özellikleri göz önünde bulundurulduğunda hastalıkları baskılarken aynı zamanda bir biyogübre görevi üstlendikleri söylenebilir.

Özellikle *Bacillus* cinsine ait faydalı bakterilerin bu konuda oldukça başarılı oldukları bilinir (Chen ve ark. 2003). Benzer şekilde *Bacillus amyloliquefaciens* hem biyolojik gübre olarak etki gösterirken hem de bitki hastalıklarıyla mücadelede başarılı bir antagonist olarak bilinmektedir (Chowdhury ve ark., 2015; Luo ve ark., 2022). Bu çalışmada kullanılan *Bacillus amyloliquefaciens*, (X-77 kodlu antagonist izolat) yalnızca Hıyar Köşeli Yaprak Leke hastalığını baskı altına almakla kalmamıştır, bunun yanı sıra mısırdaki *Dickeya zeae* (Samson ve ark., 2005)'nin neden olduğu Bakteriyel Gövde Çürüklüğü Hastalığını baskılamada da oldukça başarılı sonuçlar vermiştir (Keser ve ark., 2023). Farklı *Bacillus amyloliquefaciens* izolatlarının domatestte *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*'nun neden olduğu Bakteriyel Benek Hastalığına (Lanna-Filho ve ark., 2017; Göldoğan ve ark., 2022) ve *Xanthomonas euvesicatoria*'nın neden olduğu Biberde Bakteriyel Leke Hastalığına (Tümen ve ark., 2022) karşı başarıyla kullanıldığını gösteren laboratuvarımızda yapılmış olan araştırmalar bulunmaktadır.

Bacillus mojavensis 'in (AD 4-2 izolatı), *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*'ın neden olduğu Hıyar Köşeli Yaprak Leke Hastalığının tohum enfeksiyonunu başarılı bir şekilde baskıladığı tespit edilmiştir. Bu antagonistin farklı izolatlarının hem bakteriyel hem de fungal hastalıklara karşı başarılı olduğunu gösteren farklı çalışmalar bulunmaktadır. Elmada *Erwinia amylovora*'nın neden olduğu Ateş Yanıklığı Hastalığının (Aktepe ve Aysan, 2023), domatestte *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*'nun neden olduğu Bakteriyel Benek Hastalığının (Yıldız ve ark., 2023), kabakgil bitkilerinde fungal kökenli Antraknoz Hastalığının, (Neher ve ark., 2009), mısır ve diğer bazı bitkilerdeki fungal hastalıkların biyolojik mücadelesinde patentli olarak etkili bir şekilde kullanıldığı belirtilmektedir (Bacon ve ark., 2005).

Bu hastalığı azaltmada etkili olan bir diğer antagonist bakteri *Bacillus pumilus* (OG 1-2 kodlu izolat) olmuştur. Bu antagonistin yine domateste *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*'nun neden olduğu Bakteriyel Benek Hastalığına karşı başarılı olduğunu gösteren laboratuvar çalışmalarımız mevcuttur (Güldoğan ve ark., 2022). Ayrıca, *Bacillus pumilus*'un farklı izolatlarının kabakgillerde görülen Külleme Hastalığı'nın (*Podosphaera xanthii*) biyolojik mücadelesinde etkili olduğu bildirilmiştir (Ni ve Punja, 2021).

Providencia rettgeri'nin (OG7-7 kodlu izolat) Hıyar Köşeli Yaprak Leke hastalığının tohumlardaki enfeksiyonunu baskılamadaki başarısı bu çalışma çerçevesinde kanıtlamıştır. Başka bir çalışmada ise yine hıyar fidelerinde köklenmeyi artırmak için özellikle köklerde kolonize olan PGPR bakterileri olarak (Li ve ark., 2020) başarıyla kullanılmıştır. Bunun yanında Entomopatojen özelliği bilinen *Providencia rettgeri*, antagonist böceklerin mikrobiyal mücadelesinde de (Dai ve ark., 2023) kullanılmaktadır. Yerfıstığında bitkiyi tuzluluk stresine dayanıklı hale getirebilmek için yine *Providencia rettgeri*'den yararlanılmış, bu antagonistin fosforu çözme yeteneği ön plana çıkmıştır (Jiang ve ark., 2019). Bunların yanında *Providencia rettgeri*'nin Çin'de Calla zambağında Yumuşak Çürüklüğe neden olan bir patojen olduğu rapor edilmiştir. Bu çalışmada elde ettiğimiz *Providencia rettgeri* izolatı patateslere uygulandığında herhangi bir çürüklük yapmamıştır. Bu da elde ettiğimiz izolatın patojen bakteri izolatı olmadığını göstermektedir.

Entomopatojen bakterilerden olan *Entereococcus casseliflavus*'un (NÇ-KK kodlu izolat) da daha önce depolanmış ürün zararlıları (Channaiah ve ark. 2010) ve lepidopterlerden (Vilanova ve ark. 2016) izole edildiği ve *Entereococcus casseliflavus* Ta12 izolatının *Tuta absoluta* larvalarına karşı etkili bir entomopatojen olduğu rapor edilmiştir (Eski ve ark., 2024).

Sonuç olarak, biyolojik mücadele stratejileri, çevresel sürdürülebilirlik açısından önemli avantajlar sunarak hem insan sağlığına zarar vermeyen hem de tarımsal uygulamaların uzun vadede sürdürülebilirliğini sağlayan bir yöntemdir. Bu yaklaşımlar, doğal ekosistemlerin korunmasına katkıda bulunur, biyoçeşitliliği teşvik eder ve toprak verimliliğini artırır. Bu faydalar, biyolojik mücadele uygulamalarının yaygınlaştırılması ve desteklenmesi için güçlü bir gerekçe oluşturur. Bu nedenle, tarımsal uygulamalarda biyolojik mücadele tekniklerini yaygınlaştırmak amacıyla daha fazla eğitim, araştırma ve politika desteği gibi çeşitli önlemler alınmalıdır. Çalışma sonucunda, başarılı izolatların çeşitli etki mekanizmaları sayesinde güçlü antibakteriyel etki göstermesi, kimyasal mücadele yöntemlerinde sıklıkla karşılaşılan direnç geliştirme sorununa potansiyel bir çözüm sunmaktadır. Bu izolatların hem *in vitro* hem de *in vivo* koşullarda patojenlere karşı yüksek antibakteriyel potansiyel sergilemesi, bu biyolojik mücadele elemanlarının biyopreparat formülasyonları şeklinde geliştirilip farklı hastalıklara karşı entegre mücadele programlarında kullanılabileceği önerisini desteklemektedir.

Bu yaklaşım, tarımsal üretimde sürdürülebilirlik ve kimyasallara karşı patojen bakterinin dirençli popülasyonlarının yönetimi açısından önemli bir adım olabilir.



6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu yüksek lisans çalışmasında Adana’da ticari olarak kabakgil fide üretiminin yapıldığı tesislere ziyaretler gerçekleştirilmiş ve hasta bitkiler toplanarak patojen bakteri izolasyonları yapılmıştır. Yapılan izolasyonlar sonucunda 82 adet hasta hıyar, kabak ve kavunda *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* ve *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*’nin varlığı tespit edilmiştir. İzolasyonlar, hıyar ve kabak bitkilerinde *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*’ın, kavun bitkilerinde ise *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*’nin en yaygın patojen türü olduğunu, yeni patojenik türlerin Adana’daki ticari fideliklerde bulunmadığını kanıtlar nitelikte olmuştur. Farklı konukçularda yapılan patojenite testlerinde *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* hıyar ve kabakta hastalık oluştururken *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*’nin kavun, hıyar ve kabakta hastalığa neden olduğu görülmüştür. *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* ve *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*’nin ayırımında limon, kavun /hıyar veya kavun/kabak bitkilerinin kullanımının daha doğru sonuçlar vereceği kanaatine varılmıştır.

Bu bağlamda, hıyar ve kabak bitkilerinde baskın olarak bulunan *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*’ın neden olduğu Hıyar Köşeli Yaprak Leke hastalığının biyolojik mücadelesi kapsamında kabakgil familyasına ait bitkilerin doğal florasından, yetiştirildiği topraklardan, tohumlarından ve meyvelerinden örnekler alınarak aday antagonist bakteri izolasyonları gerçekleştirilmiştir. Toplam 298 adet aday antagonist bakterinin, patojen bakteri *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*’a karşı antibakteriyel etkileri araştırılmış ve 29 adet antagonist bakteri inhibisyon zonu oluşturarak patojen bakteriyi *in vitro* koşullarda engellediği tespit edilmiştir. Başarılı antagonistlerin etki mekanizmaları IAA üretme, siderofor oluşturma ve fosfatı çözmeye yeteneklerine göre incelendiğinde, 18 adet antagonist bakterinin siderofor oluşturma yeteneğinin olduğu, tüm antagonist bakterilerin farklı düzeyde IAA üretme yeteneğinin olduğu ve hiç bir antagonist bakterinin fosforu çözmeye yeteneğinin olmadığı tespit edilmiştir. Tüm bu etki mekanizmaları göz önünde bulundurularak, biyolojik tohum uygulamaları için 15 adet (NÇ-KK, NÇ-YK-I, NÇ-YK-R, DK-SARI OG 7-13, OG 7-7, OG 1-2, OG 8-8, YL 4-3, AY10-M2, AZ10-6-2, AD4-2, X77, HA9 ve HA3 kodlu izolatlar) antagonist bakteri seçilmiş ve iklim odası koşullarında tohum denemeleri kurulmuştur. Hıyar Köşeli Yaprak Leke Hastalığının biyolojik mücadelesi için kurulan birinci tohum denemesinde hastalık %21-78 oranında baskılanırken, hastalık şiddetindeki azalış %31-78 aralığında olmuştur. Birinci denemede başarılı bulunan 5 antagonist bakteri ve bunların bir çiftinin kombinasyonu (NÇ-KK, AD 4-2, OG 1-2, OG 7-7, X-77 ve OG 7-7 ve OG 1-2’nin kombinasyonu) kurulan ikinci denemede ise tüm uygulamalar pozitif kontrolden farklı istatistiki grupta yer alarak yine başarılı uygulamalar olduğu bir kez daha kanıtlanmıştır. Ayrıca antagonist bakterilerin tohum çimlenmesine herhangi bir olumsuz etkisinin de olmadığı tespit edilmiştir. Başarılı antagonistlerden, NÇ-KK kodlu izolat *Enterococcus casseliflavus*, AD 4-2 kodlu izolat *Bacillus*

mojavensis, OG 1-2 kodlu izolat *Bacillus pumilus*, OG 7-7 kodlu izolat *Providencia rettgeri* ve X77 kodlu izolat *Bacillus amyloliquefasciens* olarak tanımlanmıştır.

Bitki hastalıklarıyla mücadele kapsamında kimyasal mücadeleye alternatif mücadele yöntemleri geliştirmek insan ve çevre sağlığı için oldukça büyük bir önem teşkil etmektedir. Kimyasal mücadele, kısa vadede kolay sonuç veren bir yöntem olarak görülse de uzun vadede zararları yararlarından çok daha fazladır. Kimyasalların üründeki kalıntı riski, patojenin bu kimyasallara direnç kazanması, toprak ve su kirliliğine sebep olması, uzun vadede sürdürülebilir olmaması, geniş spektrumlu kimyasalların hedef dışı canlılara olumsuz etkisi ve her şeyden önce insan sağlığına olan etkileri değerlendirildiğinde pek çok yan etki kullanımı sınırlayan faktörler olarak sayılabilir. Yalnızca bu sebepler bile hem dünyada hem de ülkemizde, tarımda tek başına kimyasallarla yapılan mücadele yöntemlerinden uzaklaşıp daha sürdürülebilir, entegre ve doğaya dost mücadele yöntemlerinin arayışına sebep olmaktadır. Bu bağlamda antagonist bakteriler, faydalı funguslar ve dost mayalar biyolojik mücadelenin en büyük silahları olarak görülebilir. Bu mikroorganizmalar bitkileri hastalıklara karşı dirençli hale getirmenin yanı sıra, biyolojik çeşitliliği koruyarak doğal dengeye katkı sağlamak, bitkilerin topraktan besin elementi alımını kolaylaştırmak ve bitkiyi tuzluluk, kuraklık gibi abiyotik stres faktörlerinden korumak için de oldukça büyük önem arz etmektedir.

Kabakgillerdeki bu bakteriyel hastalığın biyolojik mücadelesinde, antagonist bakteriler tohum uygulaması olarak kullanıldığında, oldukça başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Ancak en son nokta bu antagonistlerin kitle üretimlerinin yapılarak fide ve tohum üreticilerinin kullanımına sunulmasıdır. Bu bağlamda antagonistlerin toplu üretimleri, üretici koşullarında (fideliklerde, serada ve açık alanda) etkilerinin belirlenmesi ve hedef dışı canlılara olan etkilerinin araştırılmasına ihtiyaç vardır. Ayrıca kabakgil üretim alanında bu başarılı antagonistlerin bakteriyel etmenlerden *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* ve fungal etmenlerden *Pseudoperonospora cubensis*'in mücadelesinde kullanım olanaklarının da araştırılması faydalı olacaktır. Bu araştırma, gelecekte yapılacak olan diğer çalışmalara basamak olması ve ışık tutabilecek olması nedeniyle oldukça önemlidir.

KAYNAKLAR

- Acar, O., Aki, C., and Erdugan, H., 2008. Fungal and bacterial diseases control with Elexa™ plant booster. Fresenius Environ Bulletin, 17: 797-802.
- Adeolu, M., Alnajar, S., Naushad, S., and Gupta S. R., 2016. Genome-based phylogeny and taxonomy of the 'Enterobacteriales': proposal for *Enterobacterales* ord. nov. divided into the families *Enterobacteriaceae*, *Erwiniaceae* fam. nov., *Pectobacteriaceae* fam. nov., *Yersiniaceae* fam. nov., *Hafniaceae* fam. nov., *Morganellaceae* fam. nov., and *Budviciaceae* fam. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 66(12): 5575-5599.
- Akbaba, M., and Ozaktan, H., 2018. Biocontrol of angular leaf spot disease and colonization of cucumber (*Cucumis sativus* L.) by endophytic bacteria. Egyptian Journal of Biological Pest Control, 2: 1-10.
- Akköprü, A., and Özaktan, H., 2018. Identification of rhizobacteria that increase yield and plant tolerance to angular leaf spot disease in cucumber. Plant Protection Science, 54(2): 67-73.
- Akköprü, A., Akat, Ş., Özaktan, H., Gül, A., and Akbaba, M., 2021. The long-term colonization dynamics of endophytic bacteria in cucumber plants, and their effects on yield, fruit quality and Angular Leaf Spot Disease. Scientia Horticulturae, 282, <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110005>.
- Aksoy, H. M., 2006. Occurrence of *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* [(Smith and Bryan) Young, Dye and Wilkie] at Bafra province greenhouses. Plant Pathology Journal, 5(1): 80-82.
- Aktepe, B. P., Aysan, Y., 2023. Biological control of fire blight disease caused by *Erwinia amylovora* on apple. Erwerbs-Obstbau, 65(4): 645-654
- Al-Fallooji, S. A., Al-Hasnawi, S. L., and Al-Yasseen, A. K., 2020. Molecular detection of virulence genes (PILB and SID) in *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* isolated from cucumber leaves. Biochemical and Cellular Archives, 20(1): 875-879.
- Aysan Yiğenoğlu, Y., 1999, Domates bakteriyel kara leke hastalığının (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) tanımlanması, ırklarının belirlenmesi ve kimyasal savaşıma alternatif yöntemlerin saptanması üzerinde araştırmalar, Doktora tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana, 122 s.
- Aysan, Y., Mirik, M., Ala, A., Sahin, F., and Cinar, O., 2003. First report of *Pseudomonas viridiflava* on melon in Turkey. Plant Pathology, 52(6): 800.
- Aysan, Y., Cetinkaya-Yildiz, R., Mirik, M., Kusek, M., and Sahin, F., 2006. Bacterial soft rot disease on various hosts in Turkey. 12th Congress of Mediterranean Phytopathological Union, June 11-15, 2006, Rhodes Island, Greece. 127-129.

- Bacon, C. W., Hinton, D. M. and Hinton Jr, A. 2005. Growth-inhibiting effects of concentrations of fusaric acid on the growth of *Bacillus mojavensis* and other biocontrol *Bacillus* species. *Journal Applied Microbiology*, 100(1): 185-94.
- Bashan, Y., Okon, Y., and Henis, Y., 1978. Infection studies of *Pseudomonas tomato*, causal agent of bacterial speck of tomato. *Phytoparasitica*, 6: 135-143.
- Basım, E., 2012. Determination of fungal and bacterial pathogens greenhouse cucurbit crops in the province of Antalya in Turkey. *Proceedings of the Xth EUCARPIA Meeting on Genetics and Breeding of Cucurbitaceae*. Cukurova University, Adana, Turkey.
- Carsner, E., 1918., Angular leaf spot of cucumber: Dissemination, overwintering, and control. *Journal of Agricultural Research*, 15(3): 201-220.
- Channaiah, L. H., Subramanyam, B., McKinney, L. J., and Zurek, L., 2010. Stored-product insects carry antibiotic-resistant and potentially virulent enterococci. *FEMS Microbiology Ecology*, 74(2): 464-471.
- Chowdhury, S. P., Hartmann, A., Gao, X., and Borriss, R., 2015. Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42—a review. *Frontiers in Microbiology*, 6, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00780>.
- Chung, H., Park, M., Madhaiyan, M., Seshadri, S., Song, J., Cho, H., and Sa, T., 2005. Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from the rhizosphere of crop plants of Korea. *Soil Biology and Biochemistry*, 37(10): 1970-1974.
- Demir, G., 1996. A new bacterial disease of watermelon in Türkiye: bacterial fruit blotch of watermelon (*Acidovorax avenae subsp. citrulli* (Schaad et al.) Willems et al.). *Journal of Turkish Phytopathology*, 25: 43-49.
- Dillon, M. M., Ruiz-Bedoya, T., Bundalovic-Torma, C., Guttman, K. M., Kwak, H., Middleton, M. A., Guttman, D. S., Wang, P. W., Horuz, S., Aysan, Y., 2021. Comparative genomic insights into the epidemiology and virulence of plant pathogenic pseudomonads from Turkey. *Microbial Genomics*, 7(7), <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000585>.
- Doksöz, F. S., and Bozkurt, I. A., 2022. Biological control of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* causing the olive knot disease with epiphytic and endophytic bacteria. *Journal of Plant Pathology*, 104(1): 65-78.
- EPPO, 2004. Outdoor Cucurbits. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 34: 101–108.
- Eski, A., Erdoğan, P., Demirbağ, Z., and Demir, İ., 2024. Isolation and identification of bacteria from the invasive pest *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) and evaluation of their biocontrol potential. *International Microbiology*, 27(2): 631-643.

- FAOSTATS, 2021. <https://www.fao.org/faostat/en/#home> (Erişim Tarihi: 31.03.2023).
- García-Gutiérrez, L., Romero, D., Zeriuoh, H., Cazorla, F. M., Torés, J. A., de Vicente, A., and Pérez-García, A., 2012. Isolation and selection of plant growth-promoting rhizobacteria as inducers of systemic resistance in melon. *Plant and Soil*, 358: 201-212.
- Gardan, L., Gouy, C., Christen, R., and Samson, R., 2003. Elevation of three subspecies of *Pectobacterium carotovorum* to species level: *Pectobacterium atrosepticum* sp. nov., *Pectobacterium betavascularum* sp. nov. and *Pectobacterium wasabiae* sp. nov.. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(2): 381-391.
- Glick, B. R., 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 41(2): 109-117.
- Güldoğan, Ö., Aktepe, B. P., Aysan, Y., 2022. Domates bakteriyel benek hastalığının biyolojik mücadelesinde farklı *Bacillus* türlerinin kullanımı. *Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 19(4): 829-839.
- Hallmann, J., Quad-Hallmann, A., Mahaffee, W. F., and Kloepper, J. W., 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology*, 43(10): 895-914.
- Holečková, Z., Kulháněk, M., and Balík, J., 2017. Use of active microorganisms in crop production-a review. *Journal of Food Processing and Technology*, 8(10): 696.
- Horuz, S., Cetinkaya-Yıldız, R., Mirik, M., Aysan, Y., 2014. Occurrence, isolation, and identification of *Acidovorax citrulli* from Melon in Turkey. *Plant Protection Science*, 50(4): 179-183.
- Horuz, S., and Aysan, Y., 2018. Biological control of watermelon seedling blight caused by *Acidovorax citrulli* using antagonistic bacteria from the genera *Curtobacterium*, *Microbacterium* and *Pseudomonas*. *Plant Protection Science*, 54(3): 138-146.
- Horuz, S., and Aysan Y., 2023. Biocontrol of cucurbit bacterial diseases, In: *Microbial Biocontrol: Molecular Perspective in Plant Disease Management*, 49: 205-215. Singapore: Springer Nature Singapore.
- İmriz, G., Özdemir, F., Topal, İ., Ercan, B., Taş, M. N., Yakışır, E., ve Okur, O., 2014. Bitkisel üretimde bitki gelişimini teşvik eden rizobakteri (PGPR)'ler ve etki mekanizmaları. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi*, 12(2): 1-19.
- Jiang, C. H., Wu, F., Yu, Z. Y., Xie, P., Ke, H. J., Li, H. W., and Guo, J. H., 2015. Study on screening and antagonistic mechanisms of *Bacillus amyloliquefaciens* 54 against bacterial fruit blotch (BFB) caused by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. *Microbiological Research*, 170: 95-104.
- Jiang, H., Qi, P., Wang, T., Chi, X., Wang, M., Chen, M., Chen, N., and Pan, L., 2019. Role of halotolerant phosphate-solubilising bacteria on growth promotion of peanut (*Arachis hypogaea*) under saline soil. *Annals of Applied Biology*, 174(1): 20-30.

- Karaca, I., and Demir, G., 1988. Investigations on seed-borne bacterial pathogens in some plants. *Doğa, Türk Tarım ve Ormancılık Dergisi*, 12(2): 120-131.
- Karman, M. 1971. Bitki Koruma Araştırmalarında Genel Bilgiler Denemelerin Kuruluşu ve Değerlendirme Esasları. T. C Tarım Bakanlığı Zirai Mücadele ve Karantina Genel Müdürlüğü Yayınları, Mesleki Kitaplar Serisi, İzmir, 279s.
- Keinath, A. P., Wintermantel, W. M., Zitter, T. A., 2017. Infectious Diseases. In: Compendium of Cucurbit Diseases and Pests, Second Edition, (Eds) p: 69. APS Press, St. Paul, USA, 220p.
- Keser, M., Yıldız, R. C., ve Aysan, Y., 2023. Adana ve Osmaniye illerinde yetiştirilen mısır bitkilerinde bakteriyel gövde çürüklüğü hastalığının saptanması ve biyolojik mücadele olanaklarının araştırılması. *Mustafa Kemal Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 28(3): 667-682.
- Kokalis-Burelle, N., Vavrina, C. S., Reddy, M. S., and Kloepper, J. W., 2003. Amendment of muskmelon and watermelon transplant media with plant growth-promoting rhizobacteria: Effects on seedling quality, disease, and nematode resistance. *Hort Technology*, 13(3): 476-482.
- Kumar, K., Amaresan, N., Jayakumar, V., and Thajuddin, N., 2012. Endophytic bacteria from tomato and chilli, their diversity and antagonistic potential against *Ralstonia solanacearum*. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 45(3): 344-355.
- Kurt, Ş., 2020. Bitki Fungal Hastalıkları. Akademisyen Kitap Evi, Ankara, 339s.
- Lanna-Filho, R., Souza, R. M., Alves, E., 2017. Induced resistance in tomato plants promoted by two endophytic bacilli against bacterial speck. *Tropical Plant Pathology*, 42: 96-108.
- Lebeda, A., Widrechner, M., Widrechner, M. P., Staub, J., Ezura, H., Zalapa, J., and Kristkova, E., 2007. Cucurbits (Cucurbitaceae; *Cucumis* spp., *Cucurbita* spp., *Citrullus* spp.). In: Genetic Resources, Chromosome Engineering, and Crop Improvement. Iowa State University. 272-344.
- Lelliott, R. A., and Stead, D. E, 1987. Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 216s.
- Liu, L., Kloepper, J. W., and Tuzun, S., 1995. Induction of systemic resistance in cucumber against bacterial angular leaf spot by plant growth-promoting rhizobacteria. *Phytopathology*, 85(8): 843-847.
- Luo, L., Zhang, Z., Wang, P., Han, Y., Jin, D., Su, P., and Liu, Y., 2019. Variations in phyllosphere microbial community along with the development of angular leaf-spot of cucumber. *AMB Express*, 9(76): 1-13.
- Luo, L., Zhao, C., Wang, E., Raza, A., and Yin, C., 2022. *Bacillus amyloliquefaciens* as an excellent agent for biofertilizer and biocontrol in agriculture: An overview for its mechanisms. *Microbiological Research*, 259, <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127016>.

- Mercado-Blanco, J., and Lugtenberg, J. J. B., 2014. Biotechnological applications of bacterial endophytes. *Current Biotechnology*, 3(1): 60-75.
- Mirik, M., Aysan, Y., and Sahin, F., 2006. Occurrence of bacterial fruit blotch of watermelon caused by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in the Eastern Mediterranean Region of Turkey. *Plant Disease*, 90(6): 829-829.
- Mitchell, R. E., 1992. Metabolites from *pseudomonas* that inhibit the growth of *Erwinia amylovora*. In: VI International Workshop on Fire Blight 338: (pp. 219-222).
- Mortensen, C. N., and Fatmi, M., 2017. Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* in Cucumber Seeds. In: Detection of Plant-Pathogenic Bacteria in Seed and Other Planting Material, Second Edition. The American Phytopathological Society. 189-193.
- Neher, O. T., Johnston, M. R., Zidack, N. K., and Jacobsen, B. J., 2009. Evaluation of *Bacillus mycoides* isolate BmJ and *B. mojavensis* isolate 203-7 for the control of anthracnose of cucurbits caused by *Glomerella cingulata* var. *orbiculare*. *Biological Control*, 48(2): 140-146.
- Ni, L., and Punja, Z. K., 2021. Management of powdery mildew on greenhouse cucumber (*Cucumis sativus* L.) plants using biological and chemical approaches. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 43(1): 35-42.
- Olur, Ü., 2020. Tuzlu ortamda gelişen bitkilerden izole edilen endofit bakterilerin hıyar bitkisinde köşeli yaprak leke hastalığı (*Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*), tuz stresi ve bitki gelişimine etkileri, Yüksek lisans tezi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Van, 88s.
- Ozaktan, H., and Bora, T., 1994. Investigations on the comparison of in-vitro and in-vivo reaction tests for the determination of susceptibility of some cucurbits to *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*. *Journal of Turkish Phytopathology* 23(3): 105-111.
- Ozaktan, H., Gül, A., Çakır, B., Yolageldi, L., Akköprü, A., Fakhraci, D., and Akbaba, M., 2013. Isolation optimization of bacterial endophytes from cucumber plants and evaluation of their effects on growth promotion and biocontrol. Endophytes for plant protection: the state of the art. Proceedings of the 5th International Symposium on Plant Protection and Plant Health in Europe, Humboldt University, Berlin, Germany.
- Ozdemir, Z., 2021. Identification of Enterobacteriaceae members and fluorescent pseudomonads associated with bacterial rind necrosis and rot of melon in Turkey. *European Journal of Plant Pathology*. 160(4): 797-812.
- Paris, H. S., 2001. History of the cultivar-groups of *Cucurbita pepo*. *Horticultural Reviews-Westport Then New York*, 25: 71-170.

- 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(1): 46-53.
- Raupach, G. S., and Kloepper, J. W., 1998. Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple cucumber pathogens. Phytopathology, 88(11): 1158-1164.
- Samson, R., Legendre, J. B., Christen, R., Fischer-Le Saux, M., Achouak, W., Gardan, L., 2005. Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Burkholder et al. 1953) Brenner et al. 1973 and *Brenneria paradisiacato* the genus *Dickeya* gen. nov. as *Dickeya chrysanthemi* comb. nov. and *Dickeya paradisiaca* comb. nov. and delineation of four novel species, *Dickeya dadantii* sp. nov., *Dickeya dianthicola* sp. nov., *Dickeya dieffenbachiae* sp. nov. and *Dickeya zeae* sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary. 55(4): 1415-1427.
- Schaad, N., Moore, L. W., Kado, C. I., Bouzar, H., W., Jones, J. B., and Chun, W., 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria.
- Schwyn, B., and Neilands, J. B., 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. Analytical Biochemistry, 160(1): 47-56.
- Sezonov, G., Joseleau-Petit, D., and d'Ari, R., 2007. *Escherichia coli* physiology in Luria-Bertani broth. Journal of Bacteriology, 189(23): 8746-8749.
- Smith, E. F., and Bryan, M. K., 1915. Angular leaf spot of cucumbers. Journal of Agricultural Research, (5): 465-476.
- Soylu, E. M., Soylu, S., Kara, M., ve Kurt, Ş., 2020. Sebzelelerde sorun olan önemli bitki fungal hastalık etmenlerine karşı vermikomposttan izole edilen mikrobiyomların *in vitro* antagonistik etkilerinin belirlenmesi. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi, 23(1): 7-18.
- Stankiewicz, M., Zukowska, Z., and Pietr, S., 1990. Protection Of The Cucumer Against *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* by saprophytic microorganisms. In: Plant Pathogenic Bacteria: Proceedings Of The 7th International Conference On Plant Pathogenic Bacteria. Budapest, Hungary, June 11-16, Akadémiai Kiadó.
- TÜİK, 2022, Yaş Meyve ve Sebze Sektör Raporu. (Erişim Tarihi: 31.03.2023) <https://ticaret.gov.tr/data/5b8700a513b8761450e18d81/Ya%C5%9F%20Meyve%20ve%20Sebze.pdf>
- Tümen, B., Aktepe, B. P., Aysan, Y. 2022. Tohuma uygulanan bakteriyel antagonistlerin biberde bakteriyel leke hastalığına etkisi. Çukurova Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi, 37(2): 211-220.
- Türküsay, H., 1998. Batı Anadolu'nun bazı illerinde Hıyar Köşeli Leke Hastalığının (*Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* ((Smith and Bryan) Young, Dye And Wilkie) oranı ve hıyar çeşitlerinin hastalığa reaksiyonları üzerinde araştırmalar. Doktora Tezi, Ege Üniversitesi, İzmir, 101s.

- Türküsay, H., and Saygili, H., 2000. Studies on the reaction of cucumber cultivars to *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* in Western Anatolia. EPPO Bulletin, 30(2): 323-326.
- Vilanova C, Baixeras J, Latorre A, Porcar M., 2016. The generalist inside the specialist: gut bacterial communities of two insect species feeding on toxic plants are dominated by *Enterococcus* sp. Front Microbiol, 7: 1005, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01005>.
- Wei, G., Kloepper, J. W., and Tuzun, S., 1996. Induced systemic resistance to cucumber diseases and increased plant growth by plant growth-promoting rhizobacteria under field conditions. Phytopathology, 86(2): 221-224
- Xu, Z., Chang, L., Xu, Z., and Chang, L., 2017. Cucurbitaceae. In: Identification and Control of Common Weeds: Volume 3, Springer, Singapur, 417-432.
- Yedidia, I., Shores, M., Kerem, Z., Benhamou, N., Kapulnik, Y., and Chet, I., 2003. Concomitant induction of systemic resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* in cucumber by *Trichoderma asperellum* (T-203) and accumulation of phytoalexins. Applied and Environmental Microbiology, 69(12): 7343-7353.
- Yildiz, H. N., Altinok, H. H., Dikilitas, M., Günacti, H., and Ay, T., 2023. Suppression of tomato bacterial speck disease (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Okabe) Young, Dye, & Wilkie) via induced systemic resistance by *Pseudomonas* and *Bacillus* strains. Botany, 101(9), 391-399.
- Young, J. M., Dye, D. W., Bradbury, J. F., Panagopoulos, C. G., and Robbs, C. F., 1978. A proposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria. New Zealand Journal of Agricultural Research, 21(1): 153-177.
- Zitter, T. A., Hopkins, D. L., and Thomas, C. E., 1996, Compendium of cucurbit diseases. The American Phytopathological Society, ABD, 70s.



ÖZGEÇMİŞ

Merve OKUR, 1999 yılında Adana’da doğdu. İlk ve Orta öğrenimini Adana DSİ Baraj İlköğretim Okulu’nda liseyi ise Seyhan Rotary Anadolu Lisesi’nde tamamladı. Üniversite eğitime 2017 yılında kazandığı Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü’nde başladı ve 2021 yılında mezun oldu. Çukurova Üniversitesi Bitki Koruma Bölümü’nde 2022 yılında başladığı yüksek lisans eğitime Bitki Bakteriyolojisi alanında devam etmektedir.







EKLER



EK 1. Patojen bakteri izolatlarının MALDI-TOF MS sonuçları

23.04.2024 22:19 mail-attachment.googleusercontent.com/attachment/u/0/?ui=2&&ui=0&asid=0.0.1&permmsgid=msg-f:176958971839817958&ui=18848af0458e5760&view=as&tag=inline&source=1&asid=

Bruker Daltonik MALDI Biotyper Classification Results



Project Info:

Project Name: Prof. Dr.Yesim AYSAN bakteri teshis__23052023
Project Description: Admin@FLEX-PC
Project Owner: 2023-05-23T15:28:08.378
Project Creation Date/Time: 8
Project Analyte Count: Development
Project Type: not present
Validation: Validation Position:

Result Overview

Analyte Name	Analyte ID	Organism (best match)	Score Value	Organism (second best match)	Score Value
A10 (+++)(C)	Kavun 1	CFBP-2213_Pseudomonas syringae	2.352	CFBP-2105-Pseudomonas syringae	2.256
A11 (++)(A)	Kavun 2	Stenotrophomonas sp	2.003	not reliable identification	1.65
A12 (++)(A)	Erciyes hiyar	Microbacterium phyllosphaerae	2.007	Microbacterium phyllosphaerae	1.863

https://mail-attachment.googleusercontent.com/attachment/u/0/?ui=2&&ui=0&asid=0.0.1&permmsgid=msg-f:176958971839817958&ui=18848af0458e5760&view=as&tag=inline&source=1&asid=ANQpU...

23.04.2024 22:19 mail-attachment.googleusercontent.com/attachment/u/0/?ui=2&&ui=0&asid=0.0.1&permmsgid=msg-f:176958971839817958&ui=18848af0458e5760&view=as&tag=inline&source=1&asid=

B1 (++)(A)	Alator hiyar	Stenotrophomonas rhizophila	2.114	not reliable identification	1.474
B2 (++)(B)	Boma hiyar	Pseudomonas libanensis	2.134	Pseudomonas azotoformans	2.061
B3 (+++)(C)	Kabak mico	CFBP-2213_Pseudomonas syringae	2.35	CFBP-3641_Pseudomonas savastanoi	2.341
B4 (++)(C)	HGY PSI	CFBP-2213_Pseudomonas syringae	2.235	CFBP-3641_Pseudomonas savastanoi	2.225
B5 (-)(C)	CFK pantoca	not reliable identification	1.57	not reliable identification	1.521

https://mail-attachment.googleusercontent.com/attachment/u/0/?ui=2&&ui=0&asid=0.0.1&permmsgid=msg-f:176958971839817958&ui=18848af0458e5760&view=as&tag=inline&source=1&asid=ANQpU...

Bruker Daltonik MALDI Biotyper Classification Results



Project Info:

Project Name: yesim aysan 25_05_2023
Project Description:
Project Owner: Admin@FLEX-PC
Project Creation Date/Time: 2023-05-25T15:23:22.935
Project Analyte Count: 2
Project Type: Development
Validation: not present
Validation Position:

Result Overview

Analyte Name	Analyte ID	Organism (best match)	Score Value	Organism (second best match)	Score Value
G9 (++) (A)	mizgin m_34	Acinetobacter schindleri	2.062	not reliable identification	1.405
G10 (+++) (C)	CFK Pantoea	CFBP-1660_Pseudomonas syringae	2.331	Pseudomonas viridiflava	2.239

https://mail-attachment.googleusercontent.com/attachment/u/0/?ui=2&as=b03aad28ec&atid=0.1&pmmmagid=rag-f:176736973360497002&h=188710b191a0582&view=at&dis=inline&realatid=f_33&usq&ser=1... 1/6

23.04.2024 22:16 mail-attachment.googleusercontent.com/attachment/u/0/?ui=2&as=b03aad28ec&atid=0.1&pmmmagid=rag-f:176736973360497002&h=188710b191a0582&view=at&dis=inline&realatid=f_33...

Meaning of Score Values

Range	Description	Symbols	Color
2.300 ... 3.000	highly probable species identification	(+++)	green
2.000 ... 2.299	secure genus identification, probable species identification	(++)	green
1.700 ... 1.999	probable genus identification	(+)	yellow
0.000 ... 1.699	not reliable identification	(-)	red

Meaning of Consistency Categories (A - C)

Category	Description
A	Species Consistency: The best match was classified as 'green' (see above). Further 'green' matches are of the same species as the first one. Further 'yellow' matches are at least of the same genus as the first one.
B	Genus Consistency: The best match was classified as 'green' or 'yellow' (see above). Further 'green' or 'yellow' matches have at least the same genus as the first one. The conditions of species consistency are not fulfilled.
C	No Consistency: Neither species nor genus consistency (Please check for synonyms of names or microbial mixture).

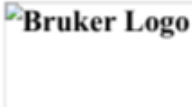
Analyte1



Analyte Name: G9

23.04.2024 22:18
mal-attachment.gongxiusercontent.com/attachment/u0/?u=2&a=60Dca0fbc&atid=0.1&pennmagid=rug-f178053805444012201&b=180be0fa0e2a91&view=att&exp=etimedrealatid=f_...

Bruker Daltonik MALDI Biotyper Classification Results



Project Info:

Project Name:	Prof. Dr.Yesim AYSAN bakteri teshis__16102023
Project Description:	
Project Owner:	Admin@FLEX-PC
Project Creation Date/Time:	2023-10-16T05:14:55.860
Project Analyte Count:	4
Project Type:	Development
Validation:	not present
Validation Position:	

Result Overview

Analyte Name	Analyte ID	Organism (best match)	Score Value	Organism (second best match)	Score Value
H1 (+)(B)	NC Kinlik kavun	Enterococcus casseliflavus	1.825	Enterococcus casseliflavus	1.719
H2 (+)(B)	Ad. 4-2	Bacillus mojavensis	1.882	Bacillus subtilis	1.747
H3 (++)(A)	OG 1-2	Bacillus pumilus	2.133	Bacillus pumilus	1.945
H4 (+++)(A)	OG 7-7	Providencia rettgeri	2.386	Providencia rettgeri	2.082

23.04.2024 22:18
mal-attachment.gongxiusercontent.com/attachment/u0/?u=2&a=60Dca0fbc&atid=0.1&pennmagid=rug-f178053805444012201&b=180be0fa0e2a91&view=att&exp=etimedrealatid=f_...

EK 3. Birinci tohum denemesi hastalık oranı varyans analizi

HOMOGENEITY OF VARIANCES- RAW DATA

ANOVA

Source	df	Type I SS	MS	F	P

Main Effects					
C1	15	8519.622565	567.97484	69.39006	.0000 ***
Error	32	261.9279322	8.1852479	<-	

Total	47	8781.550497			

Model	15	8519.622565	567.97484	69.39006	.0000 ***

$$R^2 = SS_{\text{model}} / SS_{\text{total}} = 0.97017292876$$

$$\text{Root MSerror} = \sqrt{\text{MSerror}} = 2.86098722169$$

$$\text{Mean Y} = 34.5121001667$$

$$\text{Coefficient of Variation} = (\text{Root MSerror}) / \text{abs}(\text{Mean Y}) * 100\% = 8.2898091\%$$

Compare Means

Factor: 1) C1

Test: LSD

Significance Level: 0.05

Variance: 8.18524788268

Degrees of Freedom: 32

Keep If:

n Means = 16

LSD 0.05 = 4.75824835295

Rank Mean Name	Mean	n Non-significant ranges

1 HA3	55.8364196667	3 a
2 PK	52.876984	3 ab
3 AZ10-6-2	50.721501	3 b
4 HA9	50.617284	3 b
5 NÇ-YK-R	41.886512	3 c
6 OG 7-13	41.600529	3 c
7 NÇ-YK-I	38.818011	3 cd
8 DK-SARI	35.7142856667	3 de
9 YL4-3	32.6495726667	3 e
10 OG 1-2	27.7837196667	3 f
11 X-77	27.228164	3 f
12 OG 8-8	25.0848266667	3 fg
13 AY10M2	23.8095236667	3 fg
14 AD 4-2	21.4102563333	3 g
15 OG 7-7	14.7256726667	3 h
16 NÇ-KK	11.4303406667	3 h

EK 4. Birinci tohum denemesi hastalık şiddeti varyans analizi

HOMOGENEITY OF VARIANCES- RAW DATA

ANOVA

Source	df	Type I SS	MS	F	P

Main Effects					
C1	15	3.620102441	0.2413402	13.938295	.0000 ***
Error	32	0.554076756	0.0173149	<-	

Total	47	4.174179197			

Model	15	3.620102441	0.2413402	13.938295	.0000 ***

$R^2 = SS_{\text{model}}/SS_{\text{total}} = 0.86726090809$

Root MSerror = $\sqrt{MS_{\text{error}}} = 0.13158608827$

Mean Y = 0.56296429167

Coefficient of Variation = $(\text{Root MSerror}) / \text{abs}(\text{Mean Y}) * 100\% = 23.373789\%$

Compare Means

Factor: 1) C1

Test: LSD

Significance Level: 0.05

Variance: 0.01731489863

Degrees of Freedom: 32

Keep If:

n Means = 16

LSD 0.05 = 0.21884728566

Rank	Mean Name	Mean	n Non-significant ranges

1	PK	1.04398133333	3 a
2	HA-3	0.96094133333	3 a
3	HA-9	0.95449733333	3 a
4	AZ10-6-2	0.88239533333	3 ab
5	NÇ YAZLIK R	0.721539	3 bc
6	NÇ YAZLIK I	0.67994066667	3 bc
7	DKSar1KarpuzY	0.58730166667	3 cd
8	OG7-13	0.58101866667	3 cd
9	YL4-3	0.457265	3 de
10	AY10-M2	0.40277766667	3 def
11	OG 8-8	0.37608133333	3 defg
12	X77	0.37361866667	3 defg
13	OG 1-2	0.31259666667	3 efg
14	OG 7-7	0.285973	3 efg
15	ADIYAMAN4-2	0.226923	3 fg
16	N_KI^LIK S	0.160578	3 g

EK 5. İkinci tohum denemesi hastalık oranı varyans analizi

HOMOGENEITY OF VARIANCES- RAW DATA

ANOVA

Source	df	Type I SS	MS	F	P

Main Effects					
C1	6	726.3054977	121.05092	5.8679633	.0031 **
Error	14	288.807675	20.62912	<-	

Total	20	1015.113173			

Model	6	726.3054977	121.05092	5.8679633	.0031 **

$R^2 = SS_{\text{model}}/SS_{\text{total}} = 0.7154921414$

Root MSerror = $\sqrt{MS_{\text{error}}} = 4.54192906637$

Mean Y = 87.4023464762

Coefficient of Variation = $(\text{Root MSerror}) / \text{abs}(\text{Mean Y}) * 100\% = 5.1965757\%$

Compare Means

Factor: 1) C1

Test: LSD

Significance Level: 0.05

Variance: 20.629119644

Degrees of Freedom: 14

Keep If:

n Means = 7

LSD 0.05 = 7.95387613092

Rank	Mean Name	Mean	n Non-significant ranges

1	PK	100	3 a
2	NÇ-KK	88.8695653333	3 b
3	OG 1-2	88	3 bc
4	AD 4-2	87.5458936667	3 bc
5	X-77	84.6376813333	3 bc
6	OG7-7VE OG 1-2	81.9855073333	3 bc
7	OG 7-7	80.7777776667	3 c

EK 6. İkinci tohum denemesi hastalık şiddeti varyans analizi

HOMOGENEITY OF VARIANCES- RAW DATA

ANOVA

Source	df	Type I SS	MS	F	P

Main Effects					
C1	6	1.971755177	0.3286259	7.1776329	.0012 **
Error	14	0.640985984	0.0457847<-		

Total	20	2.612741161			

Model	6	1.971755177	0.3286259	7.1776329	.0012 **

$R^2 = SS_{\text{model}}/SS_{\text{total}} = 0.75466915987$

Root MSerror = $\sqrt{MS_{\text{error}}} = 0.21397362724$

Mean Y = 2.2514837619

Coefficient of Variation = $(\text{Root MSerror}) / \text{abs}(\text{Mean Y}) * 100\% = 9.5036718\%$

Compare Means

Factor: 1) C1

Test: LSD

Significance Level: 0.05

Variance: 0.04578471316

Degrees of Freedom: 14

Keep If:

n Means = 7

LSD 0.05 = 0.3747129692

Rank	Mean Name	Mean	n	Non-significant ranges

1	PK	2.68777	3	a
2	ADİYAMAN4-2	2.13678766667	3	b
3	OG 7-7	1.79833333333	3	c
4	X77	1.7421611	3	c
5	OG1-2 VE 7-7	1.677971	3	c
6	OG 1-2	1.6681449333	3	c
7	N_ Kİ^LIK S	1.601024	3	c

EK 7. Antagonistlerin çimlenme oranına etkisi varyans analizi

HOMOGENEITY OF VARIANCES- RAW DATA

ANOVA

Source	df	Type I SS	MS	F	P

Main Effects					
C1	6	74.66666667	12.444444	1.0888889	.4152 ns
Error	14	160	11.428571	<-	

Total	20	234.6666667			

Model	6	74.66666667	12.444444	1.0888889	.4152 ns

$$R^2 = SS_{\text{model}} / SS_{\text{total}} = 0.318181818$$

$$\text{Root MSerror} = \sqrt{\text{MSerror}} = 3.38061701891$$

$$\text{Mean Y} = 97.3333333333$$

$$\text{Coefficient of Variation} = (\text{Root MSerror}) / \text{abs}(\text{Mean Y}) * 100\% = 3.4732367\%$$

Compare Means

Factor: 1) C1

Test: LSD

Significance Level: 0.05

Variance: 11.4285714286

Degrees of Freedom: 14

Keep If:

n Means = 7

LSD 0.05 = 5.92017370187

Rank Mean Name	Mean	n Non-significant ranges

1 OG 1-2	100	3 a
2 NK	100	3 a
3 OG 7-7	97.3333333333	3 a
4 N_KI^LIK S	97.3333333333	3 a
5 ADIYAMAN4-2	96	3 a
6 OG1-2 VE 7-7	96	3 a
7 X77	94.6666666667	3 a

EK 8. Antagonistlerin IAA üretimi varyans analizi

HOMOGENEITY OF VARIANCES- RAW DATA

ANOVA

Rows of data with missing values removed: 0

Rows which remain: 87

Source	df	Type I SS	MS	F	P

Main Effects					
C1	28	303833.7008	10851.204	7.532e16	.0000 ***
Error	58	8.35598e-12	1.441e-13<		

Total	86	303833.7008			

Model	28	303833.7008	10851.204	7.532e16	.0000 ***

$R^2 = SS_{\text{model}} / SS_{\text{total}} = 1$

Root MSError = $\sqrt{MS_{\text{error}}} = 3.79563783e-7$

Mean Y = 39.7734482759

Coefficient of Variation = $(\text{Root MSError}) / \text{abs}(\text{Mean Y}) * 100\% = 9.5431e-7\%$

Compare Means

Factor: 1) C1

Test: Student-Newman-Keuls

Significance Level: 0.05

Variance: 1.4406867e-13

Degrees of Freedom: 58

Keep If:

n Means = 29

LSD 0.05 = 6.20357331e-7

Rank Mean Name	Mean	n Non-significant ranges

1 OG 7-7	170.5	a
2 OG 1-2	170.5	a
3 OG7-13	170.5	a
4 AD 4-2	170.5	a
5 HA-9	149.47	b
6 AZ106-2	73.88	c
7 NÇ-KK	26.3	d
8 X-77	16.49	e
9 Toros-6	16.2	f
10 OG 1-9	12.96	g
11 Myaprak-3	11.59	h
12 Toros5-1	11.25	i
13 Konya 5-1	11.25	i
14 NÇ-YK-R	10.46	j
15 HA-3	10.46	j

16 AY10-M2	10.46	j
17 LÇ-8	10.23	k
18 DK-SARI	10.12	l
19 OG 6-7	9.89	m
20 HA-8	9.89	m
21 OG 8-8	9.26	n
22 HA-1	9.04	o
23 HA-4	8.7	p
24 NÇ-YK-I	8.01	q
25 Toros 5-2	7.73	r
26 YL4-3	7.5	s
27 OG1-10	7.16	t
28 Log 6	6.76	u
29 Turunç 2-	6.37	v



EK 9.Antagonistlerin siderofor üretimi varyans analizi

HOMOGENEITY OF VARIANCES- RAW DATA

ANOVA

Source	df	Type I SS	MS	F	P

Main Effects					
C1	28	94.32088966	3.3686032	143.09286	.0000 ***
Error	58	1.3654	0.0235414<-		

Total	86	95.68628966			

Model	28	94.32088966	3.3686032	143.09286	.0000 ***

$R^2 = SS_{\text{model}}/SS_{\text{total}} = 0.98573045308$

Root MSerror = $\sqrt{MS_{\text{error}}} = 0.15343200224$

Mean Y = 1.21965517241

Coefficient of Variation = $(\text{Root MSerror}) / \text{abs}(\text{Mean Y}) * 100\% = 12.579949\%$

Compare Means

Factor: 1) C1

Test: Student-Newman-Keuls

Significance Level: 0.05

Variance: 0.02354137931

Degrees of Freedom: 58

Keep If:

n Means = 29

LSD 0.05 = 0.25076857122

Rank Mean Name	Mean	n Non-significant ranges

1 HA-4	2.65	a
2 Log 6	2.59	a
3 HA-8	2.55	a
4 YL4-3	2.52	a
5 HA-9	2.5	a
6 DK-SARI	2.4	ab
7 NÇ-YK-R	2.32	ab
8 AY10-M2	2.26	ab
9 OG7-13	2.11	bc
10 OG 1-2	1.95	c
11 OG 1-9	1.87	cd
12 NÇ-YK-I	1.87	cd
13 AD 4-2	1.57	de
14 AZ106-2	1.43	ef
15 OG 7-7	1.33	ef
16 Turunç 2-6	1.18	f
17 OG 8-8	1.14	f
18 HA-3	1.13	f

19 OG 6-7	0	
20 NÇ-KK	0	
21 OG1-10	0	
22 HA-1	0	
23 Toros 5-2	0	
24 Myaparak-3	0	
25 Konya 5-1	0	
26 X-77	0	
27 Toros-6	0	
28 LÇ-8	0	
29 Toros5-1	0	



EK 10. Antagonistlerin antibakteriyel etkisinin varyans analizi

HOMOGENEITY OF VARIANCES-RAW DATA

ANOVA

2024-05-18 12:19:45

Rows of data with missing values removed: 0

Rows which remain: 87

Source	df	Type I SS	MS	F	P

Main Effects					
C1	28	58.04149885	2.0729107	68.141475	.0000 ***
Error	58	1.7644	0.0304207<-		

Total	86	59.80589885			

Model	28	58.04149885	2.0729107	68.141475	.0000 ***

$R^2 = SS_{\text{model}}/SS_{\text{total}} = 0.97049789345$

Root MSError = $\sqrt{MS_{\text{error}}} = 0.17441527931$

Mean Y = 2.62988505747

Coefficient of Variation = $(\text{Root MSError}) / \text{abs}(\text{Mean Y}) * 100\% = 6.6320495\%$

Compare Means

Factor: 1) C1

Test: LSD

Significance Level: 0.05

Variance: 0.03042068966

Degrees of Freedom: 58

Keep If:

n Means = 29

LSD 0.05 = 0.28506354445

Rank	Mean Name	Mean	n Non-significant ranges

1	NÇ-YK-I	5.33	a
2	OG1-9	4.086666666667	b
3	TOROS6	3.683333333333	c
4	NÇ-KK	3.66	c
5	NÇ-YK-R	3.59	cd
6	YL4-3	3.32	de
7	DK-SARI	3.23	e
8	KONYA5-1	2.78	f
9	LOG6	2.77	f
10	OG1-2	2.75	fg
11	OG7-13	2.683333333333	fgh
12	TOROS5-1	2.65	fghi
13	AY10-M2	2.55	fghij

14 HA8	2.48333333333	ghij
15 TURUNÇ2-6	2.46	hij
16 HA1	2.38	ijk
17 TOROS5-2	2.38	ijk
18 OG7-7	2.27	jkl
19 AZ106-2	2.15	klm
20 OG6-7	2.1	klm
21 ADIYAMAN4-2	2.08	lmn
22 HA9	2.01	lmno
23 OG8-8	1.99666666667	lmno
24 MYAPRAK3	1.9	mnop
25 HA3	1.88	mnop
26 X77	1.81	nop
27 HA4	1.79333333333	op
28 OG1-10	1.78	op
29 LÇ8	1.71	p