

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

**ENDOFİTİK BAKTERİLERİN HIYAR
BİTKİLERİNDE DAYANIKLILIĞI UYARMA
YOLUYLA FUSARIUM SOLGUNLUĞUNA
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Davar FAKHRAEİ

Tez Danışmanı: Hatice ÖZAKTAN

İkinci danışmanı:Lalehan YOLAGELDİ

Bitki Koruma Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu : 501.03.01

Sunuş Tarihi : 15.06.2015

Bornova-İZMİR

Davar FAKHRAEI tarafından Doktora tezi olarak sunulan “**Endofitik Bakterilerin Hıyar Bitkilerinde Dayanıklılığı Uyarma Yoluyla Fusarium Solgunluğuna Etkililiğinin Araştırılması** ” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’ nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 15.06.2015 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı	: Prof. Dr. Hatice ÖZAKTAN	
Raportör Üye	:	
Üye	:	
Üye	:	
Üye	:	

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi / Doktora Tezi olarak sunduğum “Endofitik Bakterilerin Hıyar Bitkilerinde Dayanıklılığı Uyarma Yoluyla *Fusarium Solgunluğuna*(*Fusarium oxysporum* f.sp. *cucumerinum*) Etkisinin Araştırılması” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

15.06.2015

Davar FAKHRAEİ

ÖZET

**ENDOFİTİK BAKTERİLERİN HIYAR BİTKİLERİNDE
DAYANIKLILIĞI UYARMA YOLUYLA FUSARIUM SOLGUNLUĞUNA
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

FAKHRAEİ, Davar

Doktora Tezi, Bitki Koruma Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Hatice ÖZAKTAN

İkinci Danışman : Dr. Lalehan YOLAGELDİ

Haziran 2015, 135 sayfa

Bu tez çalışmasında; endofitik bakterilerin hıyarda *Fusarium solgunluk* etmeni *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* (FOC)'u engelleme ve bitki gelişimini artırma potansiyelleri araştırılmıştır. Bu amaçla; İzmir, Antalya ve Muğla illerinden sağlıklı hıyar ve kabak bitkilerinin içsel dokularından, 109 endofitik bakteri (EB) izole edilmiştir. İzole edilen EB'ler Indol-3 Asetik Asit (IAA), siderofor üretimi, fosfatı parçalama yeteneği, vigorite indeksine etkisi ve antibiyozis özellikleri gibi *in vitro* parametreler açısından testlenmiştir. *In vitro* testlerde başarılı bulunan 24 EB izolatu *in vivo* saksı denemeleri için seçilmiştir. EB'ler sisteme tohum kaplama ve kök içirme biçiminde iki kez uygulanmıştır. EB uygulaması gören bitkiler FOC spor süspansiyonu ile bulaşık torfa şaşırtılmıştır. Saksı denemelerinde, izolatların % 25'i, *in vivo* koşullar altında % 32 - 62 oranında hıyar bitkilerinde FOC'un gelişimini engellemiştir. Bu izolatlar arasından, 83 (*Pantoea agglomerans*) ve 99 (*Bacillus thuringiensis*) no.lu EB izolatları biyokontrol ve büyümeyi teşvik etkileri açısından sera denemesine seçilmiştir. Sera denemesinde, EB uygulamalarıyla etkililiğini karşılaştırmak amacıyla, konukçu bitkide sistemik dayanıklılığı uyaran bir kimyasal olan acibenzolar-s-methyl (ASM)'e de yer verilmiştir. Serada 83, 99 ve ASM uygulamaları, hastalığın şiddetini, hiç uygulama görmemiş ancak patojen ile inokule edilmiş pozitif kontrol ile karşılaştırıldığında, sırasıyla, %52, 49 ve 51 oranında azaltmıştır. Aynı zamanda, 99 no.lu EB ile uygulama gören hıyar bitkilerinde ise, hiç uygulama görmemiş ancak patojen de inokule edilmemiş negatif kontrol uygulaması ile karşılaştırıldığında, % 30 oranında verim artışı kaydedilmiştir. 83 ve 99 no.lu EB'lerin bitki içinde zamana bağlı olarak kolonizasyonu periyodik olarak değerlendirildiğinde, FOC'un 83 no.lu bakterinin kolonizasyonu üzerine olumsuz etkisi saptanmazken, 99 no.lu EB popülasyonu FOC'un varlığından olumsuz etkilenmiştir. FOC'un bitki içindeki kolonizasyonu ise, EB uygulamalarından etkilenmemiştir. Bu sonuçlar, EB'lerin konukçu bitkide sistemik dayanıklılığı uyarma potansiyeli olabileceğini göstermiştir.

Anahtar Sözcükler:Endofitik bakteri, *Fusarium oxysporum* f.sp. *cucumerinum*, hıyar, uyarılmış sistemik dayanıklılık

ABSTRACT**INVESTIGATION OF EFFECTS OF THE ENDOPHYTIC BACTERIA TO
FUSARIUM WILT BY INDUCING THE RESISTANCE IN CUCUMBER
PLANTS**

FAKHRAEI, Davar

Ph.D Thesis in Department of plant protection

Supervisor: Prof. Dr. Hatice ÖZAKTAN

Co-Supervisor: Dr.Lalehan YOLAGELDI

June 2015, 135 pages

In this study, 109 EB strains were isolated from internal tissues of healthy cucumber plants which were grown in greenhouse and field in Turkey. These isolates were screened *in vitro* for their plant growth promoting traits and antagonistic activity against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* (FOC). Out of 24 EB isolates exhibiting biocontrol and multiple plant growth promoting (PGP) traits were tested in growth chamber and greenhouse experiments. EB inoculation took place two times; before sowing as seed coating and after transplanting as substrate drenching. Cucumber plants with treated EB were transplanted to peat inoculated with FOC spore suspension (10^6 spor ml⁻¹) in order to observe the suppression of Fusarial wilt on cucumber plants. In pot experiments, 25% of the EB isolates inhibited Fusarium wilt disease on cucumber plants at the rate of 32 to 62% compared to pathogen alone treatment. Out of the isolates, EB strain 83 (*Pantoea agglomerans*) and 99 (*Bacillus thuringiensis*) were selected for further greenhouse experiments. Acibenzolar-s-methyl (ASM) was also tested as reference chemical for comparing the efficacy of EB strains in terms of inducing the systemic resistance in cucumber plants. The treatments of EB strains 83 and 99 inhibited the disease severity of FOC at the rate of 53% and 49%, respectively, compared to pathogen alone treatment, and found as effective as ASM treatment. Moreover, EB strain 99, without being any disease pressure, increased the total marketable fruit yield at the rate of 30%, compared to non treated cucumber plants in soilless cultivation. It was also monitored the colonization and population dynamics of EB strains in the plant tissues for 75 days. The population density of EB strains in cucumber plants was determined as approximately 10^3 - 10^5 cfu plant g⁻¹. We suggest that EB strains have the potential to activate inducible plant defense systems.

Keywords:Endophytic bacteria, *Fusarium oxysporum* f.sp. *cucumerinum* , cucumber, induced systemic resistance.

TEŞEKKÜR

Doktoramin başlamasından bitimine kadar her konuda her an fikirlerini ve yardımlarını benden esirgemeyen değerli hocam sayın Prof. Dr. Hatice ÖZAKTAN’a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam boyunca yardımlarını esirgemeyen ikinci danışmanım Dr. Lalehan YOLAGELDİ’ye , Prof. Dr. Ayşe GÜL hocama, Yrd. Doç. Dr. Ahmet AKKÖPRÜ’ye ve tez izleme komitesi üyeleri olarak devamlı desteklerini gördüğüm Prof. Dr. Pervin KINAY TEKSÜR ve Yrd.Doç. Dr. Birsen ÇAKIR’a teşekkürü bir borç bilirim. laborutavar arkadaşlarım başta Arş. Gör. Mustafa Akbaba, Hande Evren ARDA, Şahika AKAT, Gizem ERYİĞİT’e ve adını burada yazamadığım tüm arkadaşlarıma yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

Maddi ve manevi destekleri ve sonsuz sevgileriyle her zaman yanımda olan eşim ve ailesi, varlığıyla hayatıma anlam katan sevgili kızım Tansu FAKHRAEİ’ye teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Bu doktora tez çalışması TÜBİTAK tarafından COST 111 O 505 nolu projesiolarak desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	vii
ABSTRACT	ix
TEŞEKKÜR	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xvii
ÇİZELGE DİZİNİ	xxi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	7
2.1. Fusarium solgunluk hastalıkları	7
2.1.1. Fusarium solgunluğu etmeni	8
2.1.2. Fusarium solgunluğunun mücadelesi	8
2.3.2. Kültürel kontrolü	10
2.2. Endofitik bakteriler	15
2.2.1. Endofitlerin Tarihçesi Ve Tanımı.....	16
2.2.2. Endofit biyoçeşitliliği	18
2.2.3. Endofitik bakterilerin bitkide kolonizasyonu	20
2.2.4. Bakteriyel Endofitlerin İzolasyonu	26

İÇİNDEKİLER(devam)

	<u>Sayfa</u>
2.2.5. Endofit Fonksiyonel Çeşitliliği	27
2.2.6. Bitki Endofit etkileşimlerinin Genomik ve postgenomik incelenmesi	37
3. MATERYAL VE YÖNTEM	39
3.1. Materyal	39
3.1.1. Test Bitkisi	39
3.1.2. Test Patojeni.....	39
3.1.3. Endofitik Bakteriler.....	39
3.1.4. Çalışmada Kullanılan Besi Yerleri.....	39
3.1.5. Yetiştirme Ortamları	42
3.1.6. Bitki besin solüsyonları.....	43
3.1.7. Moleküler Çalışma Materyali.....	44
3.1.8. Bitki Uyarıcısı Olarak Kullanılan Kimyasal	44
3.1.9. Bitki Yetiştirme Koşul ve Ortamı	44
3.2. Yöntem	45
3.2.1.Çalışmada Kullanılacak Endofitik bakterilerin izolasyonu.....	45
3.2.2. İzole edilen endofitik bakterilerin ön tanısına dönük bazı testler	49

İÇİNDEKİLER(devam)

Sayfa

3.2.3. EB’lerin <i>in vitro</i> bitki gelişimini artırma potansiyellerinin belirlenmesi	49
3.2.4.EB’lerin <i>in vitro</i> biyokontrol potansiyellerinin belirlenmesi	50
3.2.5.Vigorite İndeksi testi ve <i>in vivo</i> testler için EB izolatlarının seçilmesi.....	51
3.2.6.Vigorite İndeksi testi	51
3.2.7.EB izolatlarının bitki büyüme odasında <i>in vivo</i> koşullarda <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>cucumerinum</i> (FOC)’a biyokontrol etki testleri	52
3.2.8. EB izolatlarının bitki içinde kolonizasyon ve populasyon değişimi ile FOC’ un bitkideki varlığının zamana bağlı olarak izlenmesi.....	58
3.2.9. Etkinlikleri onaylanarak seçilen EB izolatlarının konvensiyonel ve moleküler tanılama çalışmaları	59
3.2.10. Verilerin analiz	60
4. BULGULAR	61
4.1. Endofitik bakterilerin İzolasyon Sonuçları	61
4.2. FOC İzolasyon, Tanımlanması ve Patojenisite çalışmaları sonuçları	64
4.3. EB’lerin <i>İn vitro</i> bitki gelişimini artırma potansiyellerinin (PGPR) yönelik testler sonucu.....	63
4.4. Endofitik Bakterilerin (EB) FOC’a karşı <i>in vitro</i> ’da biyokontrol potansiyellerinin belirleme testleri sonuçları	70

İÇİNDEKİLER(devam)

Sayfa

4.5. Vigorite İndeksi testi ve <i>in vivo</i> testler için EB izolatlarının seçilmesine yönelik tartılı derecelendirme sonuçları	71
4.6. Vigorite İndeksi test sonuçları	73
4.7. EB izolatlarının bitki büyüme odasında <i>in vivo</i> koşullarda FOC'a biyokontrol etki testlerinin sonuçları	74
4.8. Serada, EB'lerin FOC'a biyokontrol etkisinin testlenmesinin sonuçlarıç	78
4.9.EB'lerin ve FOC'un bitki içindeki kolonizasyonunun araştırılmasının sonuçları	80
4.10.seçilen EB izolatlarının konvensiyonel ve moleküler tanılama çalışmaları sonuçları	84
5.TARTIŞMA	86
6.SONUÇ VE ÖNERİLER	103
KAYNAKLAR DİZİNİ	105
ÖZGEÇMİŞ	135

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Dünyada önemli hıyar üretici ülkelerin ve 2012 yılı toplam üretim miktarları	2
3.1. Sörvey alanlarında örtü altı ve tarlada solgun hıyar bitkilerinin yakın çevresinde sağlıklı bitkilerin kök, gövde ve yapraklarından örneklerin alınması .	45
3.2. 1-2 cm büyüklüğünde kesilerek EB izolasyonu amacıyla yüzey dezenfeksiyonu için hazırlanan kök, gövde ve yaprak örnekleri	46
3.3. Yüzeydezenfeksiyonunun kontrolü	47
3.4. Triturasyon yöntemi ile yapraktan EB izolasyonu	48
3.5. İmprinting yöntemi kullanılarak kök ve gövde örneklerinden EB izolasyonu.....	48
3.6. Vigorite İndeksi testi için hazırlık	52
3.7. EB'lerin tohuma uygulandıktan sonra torfa ekilmesi ve ilk gerçek yaprak aşamasında torfa EB süspansiyonlarının uygulanması	53
3.8. FOC spor süspansiyonunun üretilmesi, torfa inokulasyonu, bitkilerin inokulasyona hazırlığı ve FOC ile bulaşık torfa şaşırtılması ve bitki büyüme odasında 6 hafta süreyle bekletilmesi.....	54
3.9. EB'lerin tohuma uygulandıktan sonra torfa ekilmesi.....	56
3.10. EB uygulaması yapıldıktan sonra, FOC ile inokule edilmiş ve inokule edilmemiş fidelerin serada topraksız tarım sistemine aktarılması ve serada üretim sürecinin farklı büyüme aşamalarından kesitler	57
4.1. Tütünde HR testinde Pozitif sonuç veren EB izolatları	64

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.2. EB'lerin <i>in vitro</i> koşullarda IAA üretiminin testlenmesi	68
4.3. EB'lerin <i>in vitro</i> 'da NBRIP ortamında fosfatı çözme yeteneği	69
4.4. EB'lerin <i>in vitro</i> 'da CAS agar üzerinde farklı düzeyde siderofor salgılama yeteneği	69
4.5. EB izolatlarının <i>in vitro</i> 'da HCN üretiminin testlenmesi.....	70
4.6. Antibiozis yoluyla <i>in vitro</i> 'da FOC'un miselyal gelişimini engelleyen EB izolatları.....	71
4.7. Hücre duvarı lizisi yoluyla <i>in vitro</i> 'da FOC'un miselyal gelişimini engelleyen EB izolatları.....	71
4.8.EB izolatlarının hıyar tohumlarında Vigorite İndeksi (VI) sonuçlarının Negatif kontrol (NC) ile karşılaştırılması.....	74
4.9. 80 no.lu EB uygulamasının, sadece patojen ile inokule edilmiş PK uygulamasına göre FOC'u engelleyici ve bitki gelişimini artırıcı etkisi.....	75
4.10. A. FOC'u engellemede başarılı olan (sağda 49) ve etkisiz bulunan (solda 19) EB uygulamalarının, B. Başarılı bulunan 112 no.lu EB uygulamasının PK ile karşılaştırılması	76
4.11.FOC ile bulaşık ortamda EB izolatlarının hıyar bitkilerinin kök yaş ağırlığına etkisi.....	77
4.12. FOC ile bulaşık ortamda EB zolatlarının hıyar bitkilerinin toplam (yeşilaksam + kök) kuru ağırlığına etkisi.....	78

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.13. Serada gerçekleştirilen denemede pozitif kontrol (sadece FOC inokule edilmiş bitkiler)'de FOC'un zamana bağlı olarak hıyar bitkilerinde oluşturduğu solgunluk belirtilerinin 83 no.lu EB uygulaması ile karşılaştırılması	79
4.14. EB ve ASM uygulamalarının (soldan sağa: ASM, K-, BİON+FOC, K+, 83, 83+FOC, 99, 99+FOC) sera koşullarında, FOC varlığında ve yokluğunda toplam pazarlanabilir hıyar meyve verimine etkisi (seraya aktarıldıktan sonra 9 hafta süreyle yapılan üretim sonucunda elde edilen kümülatif meyve verileri).....	80
4.15.83 no.lu EB izolatının FOC ile inokule edilmiş ve edilmemiş hıyar bitkilerinin köklerinde ve yeşil aksamında zamana bağlı olarak kolonizasyonundaki değişim	82
4.16. 83 no.lu EB izolatının FOC ile inokule edilmiş ve edilmemiş hıyar bitkilerinin köklerinde ve yeşil aksamında zamana bağlı olarak kolonizasyonundaki değişim	83
4.17. Patojen fungus FOC'un endofitik bakteri uygulanmış ve uygulanmamış kontrol bitkilerinde, kök boğazından alınan kesitlerde	84
4.18. Çalışmada etkili bulunan EB'lerin 16 s r RNA hedef bölgesine göre dizayn edilmiş olan fD1/rD1 primerleriyle elde edilen PCR ürünlerinin Agarose jelde 1400 bp'de oluşturduğu bantların görüntüsü.....	85

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Dünyada hıyar’da ürün kayıplarına neden olan önemli Fungal, Viral ve Bakteriyel etmenlerden bazıları.....	3
3.1. Bakteri izolasyonu, pigment oluşumu ve genel besi yeri olarak kullanılan King B ortamı için gerekli kimyasallar ve miktarları.....	40
3.2. EB’lerin stok olarak saklanması için kullanılanglyceroliçeren NB ortamı ve gerekli kimyasallar ve miktarları.....	40
3.3 FOC’un bitki içinde izlenmesinde kullanılan seçici Komada ortamı için gerekli kimyasallar ve miktarları.....	40
3.4. FOC’un bitki içinde izlenmesinde kullanılan seçici Malachit Green Agar (MGA) ortamı için gerekli kimyasallar ve miktarları	41
3.5. EB’lerinin siderefor oluşturma yeteneklerinin belirlenmesinde kullanılan Blue-CAS Agar besi yeri.....	41
3.6. EB’lerinin fosfataz aktivitelerini belirlemek amacıyla kullanılan NBRIP Agar besi yeri için gerekli kimyasallar ve miktarları	42
3.7. Topraksız tarım sisteminde hyar yetiştiriciliğinde gelişme dönemlerine göre kullanılan besin solüsyonu	43
3.8. Topraksız tarım sisteminde hıyar yetiştiriciliğinde kullanılan Mikro besin solüsyonu.....	43
3.9.EB’lerin moleküler tanısı için primerler listesi ve teremal cycler çalışma koşulları.....	44
3.10. EB izolatlarıyla gerçekleştirilen <i>in vitro</i> testlere verilen puanlama	51

ÇİZELGELER DİZİNİ(devam)

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
3.11. Pyung et al.(1997)' den modifiye edilmiş 0-4 skalası.....	58
3.12. Fd1/Rp2 primerleri için kullanılan master mix için gerekli kimyasallar ve miktarları	60
4.1. Doktora çalışması sırasında izole edilmiş endofitik bakterilerine ilişkin bilgiler	61
4.2. Doktora çalışması sırasında elde edilen patojen Fusarium izolatlarının listesi.....	64
4.3. Elde edilen FOC izolatlarının farklı hıyar çeşitlerinde oluşturduğu hastalık Şiddeti (%)değerleri	65
4.4. Sağlıklı kabakgil bitkilerinden izole edilen endofitik bakterilerin <i>in vitro</i> bitki gelişimini artırma (PGPR) aktivitesi testi sonuçları.....	65
4.5. EB izolatlarının FOC'a karşı <i>in vitro</i> koşullarda biyokontrol potansiyelleri .	70
4.6. Vigorite testine alınmak üzere seçilmiş EB izolatlarına uygulanan tartılı derecelendirme değerlerine ilişkin bilgiler.....	72
4.7. EB izolatlarının hıyar tohumlarında Vigorite Indeksi (VI)	73
4.8. EB uygulamasının bitki büyüme odası koşullarında, saksı denemsinde FOC'un neden olduğu Fusarium Solgunluğunun gelişimine etkisi	74
4.9. EB'lerin FOC ile bulaşık ortamda, bitki büyüme odasında yetiştirilen hıyar bitkilerinde bazı bitki büyüme parametrelerine etkisi.....	76

ÇİZELGELER DİZİNİ(devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.10. EB uygulamasının serada topraksız yetiştiricilik koşullarında, perlit ortamında, FOC inokulasyonundan 10 hafta sonra, Fusarium Solgunluğunun gelişimine etkisi.....	79
4.11. 83 no.lu EB izolatının FOC ile inokule edilmiş ve edilmemiş hıyar bitkilerinin köklerinde ve yeşil aksamında zamana bağlı olarak kolonizasyonundaki değişim	81
4.12. 99 no.lu EB izolatının FOC ile inokule edilmiş ve edilmemiş hıyar bitkilerinin köklerinde ve yeşil aksamında zamana bağlı olarak kolonizasyonundaki değişim	83
4.13. Patojen fungus FOC'un endofitik bakteri uygulanmış ve uygulanmamış kontrol bitkilerinde izlenmesi.....	84

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

KISALTMALAR	AÇIKLAMA
ACC	Aminocyclopropane-1-carboxylic acid
ASM	Acibenzolar S-Methyl
CFU	Koloni oluşturan birim
CMC	Karboksi Metil Selüloz
EB	Endofitk Bakteri
FAO	Dünya Gıda ve Tarım Örgütü
HCN	Hidrojen Siyanid
IAA	Indol -3-Asetik Asit
ISR	Uyarılmış sistemik dayanıklılık (Induced Systemic Resistance)
OD	Optik yoğunluk
PGPB	Bitki büyümesini artıran bakteriler (Plant Growth Promoting Bacteria)
PGPR	Bitki büyümesini artıran kök bakteriler (Plant Growth Promoting Rhizobacteria)
FOC	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>cucumerinum</i>
SAR	Sistemik Uyarılmış Dayanıklılık (Systemic Acquired Resistance)
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu

1.GİRİŞ

Kabakgiller familyası 90 cins ve 750 tür içeren geniş bir familyadır. Hıyarın da içinde bulunduğu kabakgiller familyası birçok ülkede, ekonomik önemi olan pek çok sebze türünü içerir. Hıyar bu familyanın en popüler üyelerinden birisidir.

Hıyar (*Cucumis sativus*) Dicotyledoneae sınıfının Cucurbitales takımının Cucurbitaceae familyasına ait *Cucumis* cinsinin bir türüdür.

Hindistan orijinli olup 5000 yıldır varolduğu bilinmektedir. Hindistan'dan Çin'in doğusuna, Asya'nın batısına, Kuzey Afrika'ya ve Güney Avrupa'ya yayılmıştır. Ortaçağ'da Avrupa'da kültüre alınmıştır. 1494 Haiti'de Colombus tarafından ilk kez yetiştirilerek Yeni Dünya'ya tanıtılmıştır.

Sıcak ülke kaynaklı (Akdeniz veya tropik bölgeler arası) olan bu familyanın üyeleri, oldukça yüksek sıcaklık ihtiyacı içindedir, bu nedenle yazlık sebzeler grubunda yer alır.

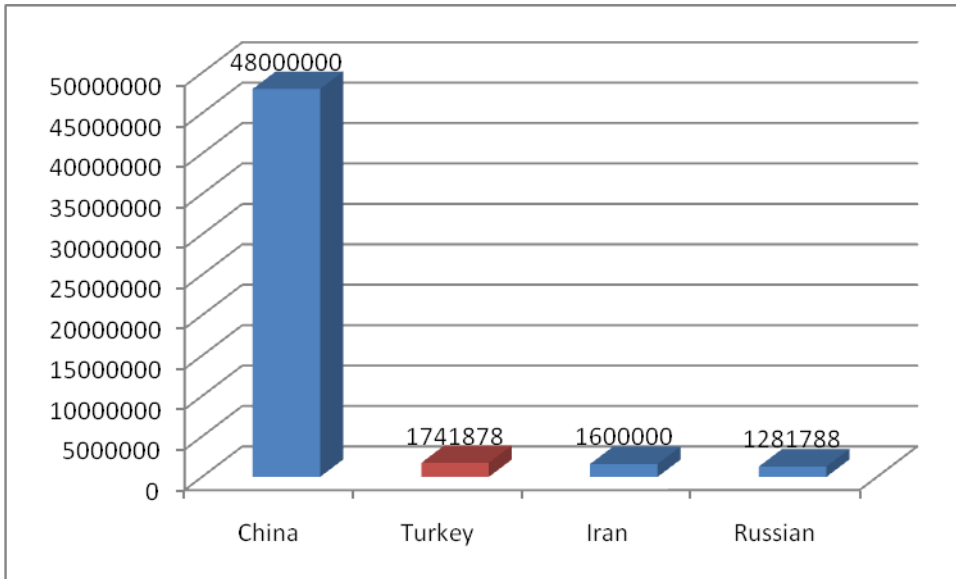
Hıyar bitkisinin kökleri, 30-35 cm derinliğe inebilen orta derinlikte bir yapıya sahiptir. Yapraklar basit yaprak formundadır. Çiçekleri genelde tek evcikli. Erkek çiçekler ana gövdede, dişi çiçekler ise yan dallar üzerinde açarlar. Hıyar meyvesi de, üzüksü meyvedir. Hıyar, besin maddesince zengin, kaba yapılı, iyi drene edilmiş, su tutma gücü yüksek sıcak ve havadar toprakları sever.

Tüketici istekleri ülkelere göre değişiklik gösterir. İnce kabuklu uzun ve dikenli tipler Asya marketlerinde popülerken Avrupa'da koyu yeşil meyve kabuğuna sahip tipler tercih edilir. Amerika'da 15-25 cm. uzunluğunda slicing tipler Türkiye'de ise beth-alpha tip denilen daha açık kabuk rengine sahip orta boyda meyve tipleri tercih edilir.

Kalorisi düşük sebzelerden birisidir. 100 g hıyarın kalori değeri 12'dir. Düşük kalorisi nedeni ile diyet yemeklerinde kullanılır. 100 g taze hıyar meyvesinde 97 g su, 0.6 g protein, 0.2 g yağ, 1 g karbonhidrat ve 45 IU vitamin A, 0.03 mg. B1, 0.02 mg B2, 0.3 mg. Niacin, 12 mg Ca, 0.3 mg. demir içerir. Proteinli besinlerin alınması

sonucu vücutta artan asidin nötralleştirilmesinde hıyardan yararlanılır (Sevgican, 2002) .

FAO'nun 2012 verilerine göre, Hıyar, Dünya toplam üretimi 65,134,078 milyon ton ile önemli bir pazar oluşturmaktadır. Türkiye ise hıyar üretiminde dünyada Çin'den sonra en çok hıyar üreten ikinci ülkedir (Şekil 1.1). Dünya pazarında yoğun olarak talep edilen hıyar, Türkiye'de 2012 yılı verilerine göre toplam 63000 Ha alanda 1,741,878 ton üretimle iç ve dış pazara ürün sunmaktadır. Hıyar; Türkiye'de meyvesi yenen sebzeler içerisinde toplam üretimdeki payı % 6.2 ile domates ve karpuzdan sonra üçüncü sırayı almakta, örtü altı yetiştiriciliğinde ise üretim payı olarak domatesten sonra ikinci sıradadır (FAO 2012, TÜİK 2013).



Şekil 2.1. Dünyada önemli hıyar üretici ülkeler ve 2012 yılı toplam üretim miktarları (FAO 2012, TÜİK 2013)

Türkiye'de örtü altı hıyar yetiştiriciliği özellikle kıyı bölgelerinden Akdeniz ve Ege bölgelerinin ekolojik koşullarının uygun olması nedeniyle yoğun bir şekilde yapılmaktadır. Sınırlı bölgelerdeki bu yoğun üretim Türkiye'de ve

dünyada, toprak yorgunluğu, toprak kirliliği, kontrolsüz ve gereksiz gübre kullanımı, toprak sterilizasyonu gibi sorunları beraberinde getirmektedir. Bunun yanı sıra, toprak kaynaklı pek çok patojen, seralarda yetiştirilen bitkilerde hastalıklara yol açmakta, çoğunlukla da kontrol altına alınmaları güç olduğundan, önemli zararlara neden

olmaktadır. Bu problemleri aşmak için dünyada topraksız tarım sistemlerine yönelim hızla artmaktadır. (Gül vd., 2000; Gül vd., 2005; Tüzel vd., 2005).

Kabakgiller familyasında bilinen 200'den fazla hastalık vardır (Zitter et al., 2010). Hıyar bitkisinde ise başta fungal hastalıklar olmak üzere, ardından zararlılar, viral ve bakteriyel etmenlerden dolayı önemli ürün kayıpları oluşmaktadır. Dünyada hıyarda en yaygın görülen, fungal, viral ve bakteriyel etmenlerin bazıları çizelge 1.2'de verilmiştir.

Çizelge 1 Hata! Burada görünmesini istediğiniz metne 0 uygulamak için Giriş sekmesini kullanın.2. Dünyada hıyar'da ürün kayıplarına neden olan önemli fungal, viral ve bakteriyel etmenlerden bazıları (Ramakers and O'Neill, 1999; Akköprü, 2012)

FUNGUS	VİRÜS	BAKTERİ
<i>Alternaria alternata</i> f.sp. <i>cucurbitae</i>	Cucumber mosaic virus (CMV)	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lachrymans</i>
<i>Colletotrichum orbiculare</i>	Zucchini yellow mosaic virus (ZYMV)	<i>Xanthomonas campestris</i>
<i>Phomopsis sclerotoides</i>	Cucurbit aphid-borne yellows virus(CABYV)	<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i>
<i>Cercospora citrullina</i>	Beet pseudo yellows virus (BPYV)	<i>Erwinia tracheiphila</i>
<i>Corynespora cassiicola</i>	Cucumber vein yellowing virus (CVYV)	<i>Agrobacterium</i> sp.
<i>Pseudoperonospora cubensis</i>	Cucumber yellow stunting disorder virus (CYSDV)	
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>cucumerinum</i>	Melon necrosis spot virus (MNSV)	
<i>Botrytis cinerea</i>	Tobacco necrosis virus (TNV)	
<i>Cladosporium cucumerinum</i>	Cucumber geen mottle mosaic virus (CGMMV)	
<i>Didymella bryoniae</i>		
<i>Sphaerotheca fusca</i>		
<i>Erysiphe orontii</i>		
<i>Leveillula taurica</i>		
<i>Pythium</i> spp.		
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>		
<i>Septoria cucurbitacearum</i>		
<i>Ulocladium cucurbitae</i>		
<i>Verticillium dahliae</i>		

Hıyarın en önemli hastalıklarından biri olan *Fusarium solgunluğu* (*Fusarium oxysporum* Schlechtend: Fr. (emend. Snyd. & Hans.) f. sp. *cucumerinum* J.H. Owen) birçok ülkede yaygın olarak bulunmaktadır. Bu ülkeler arasında Amerika Birleşik Devletleri, İngiltere, Yunanistan, İsrail, Japonya, Çin, Almanya, Avustralya, Hollanda, Fransa, İspanya, Türkiye, Japonya, Mısır, Güney Afrika sayılabilir (Vakalounakis and Fragkiadakis, 1999; Yıldız ve Delen, 1977; www.plantwise.org/knowledgebank).

Hastalık ilk kez 1925 yılında kayda geçmiş ve 1955 yılında da Florida’ da ekonomik kayıplara neden olduğu tespit edilmiştir (Martyn, 1996). Hastalık etmenini ilk olarak Owen tarafından *F. oxysporum* f.sp. *cucumerinum* olarak tanımlanmıştır (Owen, 1955).

Hıyar *Fusarium solgunluğu* Türkiye’de ilk kez 1976 yılında İzmir ili hıyar seralarında saptanmış (Yıldız and Delen tarafından 1977) ve günümüze kadar geçen sürede de hastalığın yaygınlığı artmıştır (Altın ve Bora, 2004).

Toprak kaynaklı olan ve tohumla da taşınabilen hastalık etmeni hıyar bitkisini bütün gelişme dönemlerinde hastalandırabilmektedir. Fidelik döneminde hem çıkış öncesi hemde çıkış sonrası çökertene neden olabilmektedir. Bitkinin ileri dönemlerinde hastalık alt yapraklardan sararmalar ile başlar ve bu sararmaların genelde tek taraflı olduğu görülmektedir. Bunun nedeni o bölgedeki iletim demetinin etmen tarafından işlevsiz kılınmasıdır. Daha ileri devrede etmenin diğer iletim demetlerine de geçmesi nedeniyle sararma ve solma bitkinin her tarafına görülmektedir. Topraktaki inokulum kaynağı etmenin klamidosporları ve hastalıklı bitki artıklarıdır (Owen, 1956; Martyn, 1996).

Genelde tüm Cucurbitaceae üyelerinde ve özelde de hıyar bitkisinde, *Fusarium solgunluğu* ile mücadelede ekim nöbeti, etmeden ari tohum ve fide kullanılması, dayanıklı çeşit üretilmesi, üretimin temiz alanlarda yapılması gibi kültürel önlemler ile toprak fümigantlarının kullandığı kimyasal savaş ve biyolojik savaş yöntemleri bulunmaktadır (Egel and Martyn, 2007; Martyn, 1996).

Bu hastalığa karşı uygulanan hiçbir yöntem tek başına yeterli olmamaktadır. Bu nedenle, dünyada entegre mücadelenin başarısını arttıran bir unsur olarak biyolojik savaş çalışmalarına da ağırlık verilmiş ve son derece başarılı sonuçlar elde edilmiştir (Altın ve Bora, 2004).

Biyolojik savaş kapsamında rizosfer bakterilerinin (plant growth promoting Rhizobacteria, PGPR), fungal ve bakteriyel patojenlere karşı geniş spektrumlu antagonistler olarak etkili oldukları bilinmektedir (Emmert and Handelsman, 1999 ; Kurze et al., 2001; Weller, 1988). Daha yeni çalışmalarda ise, içsel kök dokularını kolonize eden bakterilerin de bitki gelişimini ve bitki sağlığını artırabileceği gösterilmekte (Sturz et al., 1997) ve bu endofit bakteriler biyolojik savaş elemanı olarak kullanılmak üzere mükemmel adaylar olarak kabul edilmektedir (Tjamos et al., 2004).

Rhizobakteriler ve endofitik bakteriler farklı ekolojik nişlerde yaşamalarına rağmen, fitopatojenlerin kontrolünde ve bitki gelişimini teşvik etmede benzer mekanizmaları kullanmaktadırlar (Bloemberg and Lugtenberg, 2001; Dobbelaere et al., 2003; Glick, 1995; Hallman et al., 1997; Lodewyckx et al., 2002; Sturz et al., 2000).

Endofitik bakteriler yüzey dezenfeksiyonu yapılmış bitki dokularından izole edilen ya da bitkilerin içsel dokularından ekstrakte edilen ve bitkilere herhangi bir zarar vermeyen bakteriler olarak tanımlanır (Hallman et al., 1998). ve birçok bitkinin çiçek, yaprak, meyve, gövde, kök ve tohumlarından izole edilmişlerdir (Lilley et al., 1996).

Biyolojik savaş kapsamı içinde, bitki dayanıklılık sistemlerinin uyarılması yoluyla hastalıklarla mücadele, her geçen gün artan bir ilgiyi üzerine çekmektedir. Dayanıklılık mekanizması sınırlı bir patojen infeksiyonu, avirulent patojenler, bazı patojen olmayan bakteriler ve belirli kimyasallar tarafından uyarılabilir. Bitkinin uyarılma sonucunda ürettiği mobil sinyal bitkinin diğer bölümlerine taşınarak bitkide zaten inaktif halde var olan mekanizmaların uyarılmasını sağlar. Böylece sonradan gelen patojenin çoğalmasını, gelişmesini, yayılmasını ve belirti oluşumunu engelleyerek hastalığı sınırlandırır. Genel anlamda bitki dayanıklılığının uyarılması

iki ana mekanizma ile sağlanmaktadır. Birincisi; Bitki gelişimini uyarıcı kök bakterilerinin (Plant Growth Promoting Rhizobacteria-PGPR) kullanımı ile bitki gelişimini artırma ve bununla birlikte bitkilerin dayanıklılık sistemlerini uyarılmasıyla sağlanır. Bu dayanıklılıkta herhangi bir nekroz veya hastalık belirtisi oluşmaz. Bitkilerin bu tarzdaki dayanıklılığına; uyarılmış sistemik dayanıklılık (Induced Systemic Resistance -ISR) denmektedir. İkincisi ise; uyarılma bir patojenin sınırlı enfeksiyonu, avirulent patojenler, kimyasallar ve abiyotik stres faktörleri tarafından yapıyorsa buna ‘sistemik kazanılmış dayanıklılık’ (Systemic Acquired Resistance –SAR-) denmektedir. SAR uyarılması ile bitkide sınırlı da olsa nekrotik veya stres belirtileri gözlenir (Bakker, 2003; Durrant and Dong, 2004; Van Loon, 2003; 1998). Hıyar bitkilerinin ISR ve SAR sistemleri yoluyla uyarılması sonucu, bitki hastalıklarına karşı mücadele olanakları üzerine araştırmaların sayısı giderek artmaktadır. ISR ve SAR yoluyla bitki hastalıklarına karşı mücadelenin, kimyasal pestisitlerle yürütülen mücadeleye göre, sürdürülebilir ve çevre dostu olması nedeniyle, bitki koruma alanında önemli bir potansiyele sahip olduğu görülmektedir.

Bu doktora tez çalışmasında; açık ve örtü altında yetiştirilen hıyar bitkilerinden endofitik bakterilerin izole edilmesi, FOC’a karşı biyokontrol aktiviteleri açısından *in vitro* ve *in vivo* koşullarda testlenmesi ve bu testlerin sonucuna göre hastalık etmenine karşı etkili olabilecek bakteriyel endofitlerin iklim odasında ve serada hıyar bitkilerin gelişimi ise verimi artırıcı etkilerinin saptanması ve FOC’a karşı sistemik dayanıklılığı uyarma yoluyla biyolojik savaş potansiyellerinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. *Fusarium* Solgunluk Hastalıkları

Fusarium solgunluğu muz (Ploetz, 2005), domates (Volin and Jones, 1982; Walker, 1971), pamuk (Blasingame and Patel, 2005), hurma (Djerbi et al., 1986) gibi ekonomik açıdan önemli birçok tarım ürününün en yıkıcı hastalıklarından birisidir. Öyle ki, *Fusarium* solgunluğu neredeyse 1950' lerde, (Stover, 1962) Orta Amerika' da uluslararası muz ticaretini tahrip ederek yaklaşık 400 milyon dolar (ABD 2000 yılı değerine göre 2.3 milyar dolar)' lık kayıplara neden olmuştur (Ploetz, 2005).

Solgunluk belirtileri, fungus sporları ve miselyumunun ksilemi bloke etmesi, toksin üretimi, tylozis, zamklanma ve jeller konukçunun savunma yanıtlarının sonucudur (Beckman, 1987). Dış belirtilerden damarlarda renk açılmaları, yaprak epinastisi, solma, kloroz, nekroz ve absisyon sayılabilir. İçsel belirtiler ise, vasküler kahverengileşme olarak tanımlanabilir (MacHardy Beckman, 1981). Konukçu bitki hayatta olduğu sürece *F. oxysporum* ksilem dokusu içinde kalır. Ciddi şekilde enfekte olan bitkiler sonunda solar ve ölür böylece klamidosporeler enfekte ve çürümüş konukçu dokularından yeniden toprağa döner (DiPietro et al., 2003; Nash et al., 1961), bir kaç yıl orada canlı kalır (Ploetz and Pegg, 2000). Klamidosporeler çimlenerek yeni bir konukçu bitkiyi istila ettiğinde hastalık döngüsü tekrarlanır (Stover, 1962).

Hastalık etmeni, konukçu kökleri tarafından ya da konukçu olmayan bitkilerin kök sızıntılar tarafından uyarılınca kadar, çürümüş konukçu dokularında ya da toprakta klamidospore olarak dormant kalır (Beckman, 1990; Stover, 1962). Çimlendikten sonra, enfeksiyonu başlatmak üzere konukçunun kök yüzeyine yapışarak hif üretir (Bishop and Cooper, 1983). Lateral kök uçları doğal enfeksiyon için ilk giriş yerleridir (Beckman, 1990), fakat fungus, aynı zamanda, kök kıllarında ya da kök ucuna yakın epidermal hücrelerden, kök ucunun arkasından veya uzama bölgesinden girebilir (MacHardy and Beckman, 1981). Patojen sonra kök parankima dokusu hücreleri içi ve arasından protoxylem borularına ulaşana kadar hareket eder (Mai and Abawi, 1987). Oradan büyük ağsı damarları işgal eder ve damar duvarında

çukurlar aracılığıyla iletim demetlerine yayılır. Yaraya maruz kalan iletim demetleri, büyük ölçüde, enfeksiyon ve hastalık şiddetini artırmaktadır (Stover, 1972).

2.1.1. *Fusarium solgunluğu* etmeni

F. oxysporum dünyanın her yerinde toprakta bulunan kozmopolit bir fungusdur. Fungus bol havai misel üretimi ve kültürde koloninin ters tarafında beyaz, pembe, somon ve mor pigmentasyonu ile bilinir (Gerlach and Nirenberg, 1982; Nelson et al., 1983). *F. oxysporum* üç tür eşeysiz spor üretir: mikrokonidyum, makrokonidyum ve klamidospor (Kistler and Miao, 1992). *F. oxysporum* için teleomorph saptanamamıştır.

F. oxysporum morfolojik olarak ayırt edilemeyen patojenik ve patojenik olmayan üyeler içerir (Snyder and Smith, 1981). Patojenik formları hastalığa neden olduğu konukçu bitkiye göre yaklaşık 120 farklı *formae speciales* e ayrılır (Armstrong and Armstrong, 1981). Farklı konukçularda *Fusarium solgunluğu* hastalıklarına neden olan *F. oxysporum forma specialis* leri, her yerde bulunan ve adaptasyon kabiliyeti yüksek olan ve genelde tek bir ürün türüne saldıran toprak mikroorganizmalarıdır (Kistler, 1997).

Patojen olmayan formları korteks ile sınırlı kalarak endofit gibi hayatta kalmayı başarırlar. Patojenler ise kendi konukçusunun vasküler dokusuna girer ve solgunluğa neden olurlar (Ito et al., 2005; Olivain and Alabouvette, 1997, 1999). Patojen olmayan funguslar bitki köklerinde endofitik fungus gibi yaşamının dışında, kök rizosferinde, toprak ve organik madde üzerinde de saprofit olarak yaşayabilmektedir (Beckman, 1990; Di Pietro et al., 2003; Gordon and Martyn, 1997).

2.1.2. *Fusarium solgunluğunun* mücadelesi

Fusarium solgunluk hastalıklarıyla mücadele etmek oldukça zordur (Borrero et al., 2006; Elmer, 2006). Mücadele yöntemleri arasında kültürel, kimyasal, biyolojik mücadele metotları ve hastalığa dayanıklı çeşitlerin kullanımı sayılabilir. Bu yöntemlerden, dayanıklı çeşit kullanımı hastalıkların azaltılmasında, kimyasal ve kültürel önlemlere oranla daha etkili bir yoldur. Son yıllarda, biyolojik mücadele

ajanlarının kullanımı Fusarium solgunluğunun kontrolünde çevre dostu bir yaklaşım olarak popüler olmuştur.

2.1.2.1. Kimyasal mücadele

Fusarium solgunluğu şiddetini en aza indirmek için kullanılan fungusitler benzimidazol (benomil, karbendazim, fuberidazol, thiabendazol ve thiophanate-methyl) grubu fungusitlerdir. Benzimidazollerin ortak etki mekanizması, hücre bölünmesine ve hassas fungusların hifsel büyümesine müdahaledir (Uesugi, 1998). Ancak, son yıllarda Türkiye’ de sıcak kanlılarda toksisite ve kanserojenik riskler nedeniyle benomyl’ in ruhsatı iptal edilmiştir. Bu grup için bir başka olumsuzluk da, patojenin bu fungusitlere hızla dirençli hale gelmesidir.

Demetilasyon önleyici (DMI) fungusitler (prokloraz, propikonazol ve siprokonazol) fungus duvarlarında gerekli sterol biyosentezi için dimetilasyon aşamasını inhibe ederek hareket ederler. Prokloraz’ ın muz ve domateste Fusarium solgunluğuna karşı en etkili fungusit olduğu kanıtlanmıştır (Nel et al., 2007; Song et al., 2004). Strobilurin’ ler (azoksistrobin, kresoxym-metil ve trifloksistrobin) de etkili bir şekilde karanfil Fusarium solgunluğunu kontrol etmiştir (Elmer and Mc Govern, 2004; Gullino et al., 2002).

Fusarium solgunluklarına karşı başarılı bir şekilde kullanılabilinen diğer kimyasallar arasında yüzey sterilantları, fumigantlar ve bitki aktivatörleri vardır (Moore et al., 1999; Weststeijn, 1973). Ancak, Fusarium solgunluklarına etkili bir toprak fümigantı olan Metilbromid’ in kullanımı çevre ve insan sağlığı yönünden riskleri nedeniyle Avrupa Birliği ülkeleriyle birlikte Türkiye’ de de 2005 yılından beri yasaklanmıştır (Cebolla et al., 2000; Tamietti and Valentino 2006). 1,3-dikloropropen’ nin bir kombinasyonu ve kloropikrin gibi fumigantlar, *F.oxysporum* f.sp. *lycopersici*’ nin kontrolünde metilbromide’e alternatif olarak önerilmiştir (Gilreath and Santos, 2004). Ancak klamidosporların dayanıklı yapısı, geniş alanların fumige edilmesinin zor oluşu ve bitki köklerinin fümigantların ulaşamadığı toprak derinliklerine ulaşarak enfekte olabilme olasılıkları fumigasyonun tek başına yeterli bir yöntem olmasına engeldir.

Formaldehit gibi dezenfektanlar, Fusarium solgunluğunun bir alandan başka bir alana yayılmasını önlemek için ekipman, araç ve diğer aletlerin dezenfeksiyonunda kullanılır (Weststeijn, 1973).

2,6-dikloroizonikotinic asit (INA) ve benzo (1,2,3) tiadiazol-7-karbotioik asit S-metil ester (BTH) gibi bitki aktivatörleri ve ticari olarak bilinen Bion®, etkileri en iyi incelenmiş olan kimyasal elisitörlerdendir (Oostendorp et al., 2001). Bunlar bitki-patojen etkileşimlerinde sistemik uyarılmış dayanıklılığın bir formu olarak ortaya çıkmaktadırlar (Friedrich ve diğerleri, 1996; Vallad and Goodman, 2004). Bitki aktivatörleri genelde patojenlere karşı *in vitro*' da herhangi bir antimikrobiyal aktivite göstermemektedir (Kessmann et al., 1994). Örneğin, INA, *F. f.sp. cucumerinum*' a, validamisin A (VMA) ve validoxylamine A (VAA) ise *F.oxysporum f.sp .lycopersici*' ye karşı invitro testlerde antifungal etki göstermemiştir (Ishikawa et al., 2005; Métraux et al., 1991). Az miktarda toprağa eklendiği zaman kitin ve kitosan türevleri turp ve kereviz Fusarium solgunluğunu azaltmıştır (Bell et al., 1998; Mitchell and Alexander, 1962). Kitosan ve kitin bitki savunma tepkileri açısından, potansiyel elisitörler olarak bilinir (Benhamou and Theriault, 1992).

2.1.2.2. Kültürel önlemler

Fusarium solgunluğu ile mücadelede kullanılan kültürel kontrol stratejileri, ürün rotasyonu ve temiz üretim materyali kullanımını içerir. Geleneksel ürün rotasyonu birçok toprak kökenli hastalığın kontrolünde etkisi kanıtlanmış bir yöntem olmasına karşın *F. oxysporum*' un klamidosporlarının toprakta canlı kalma sürelerinin uzun olması bu uygulamanın etkinliğini sınırlamaktadır (King et al., 2008).

Toprağın yapısında bazı değişikliklerin yapılması Fusarium solgunluk hastalıklarının şiddetini azaltmak için kullanılmıştır. Elverişli topraklarda Fusarium solgunluğuna karşı CaCO_3 ya da Ca (OH)_2 gibi kalsiyum uygulaması *F.oxysporum f.sp. cubense* klamidosporlarının çimlenmesini önemli ölçüde azaltmıştır (Chuang, 1991; Peng et al., 1999). Azotlu gübre bileşimi, toprağın pH' sını ve hastalığın şiddetini etkileyebilir. Azot içeren gübrelerden nitrat azotu ($\text{NO}_3\text{-N}$), genellikle

amonyum azotu (NH₄-N) içeren gübrelere oranla *Fusarium* solgunluğunun daha az görülmesine yol açar. Çünkü, bu bileşim toprağın pH değerini arttırır ki bu mikrobelerin çözünürlüğünün azalmasına neden olur. Çinko, bakır, demir, fosfat, magnezyum ve manganez gibi mikrobelerin patojenin büyümesi ve sporulasyonu için gereklidir (Handreck and Black, 2002; Scher and Baker, 1982). Daha yüksek toprak pH düzeyleri topraktaki bakteriyel faaliyeti arttırarak *Fusarium* solgunluğunun gelişimini (Dominguez et al., 2001) ve *F.oxysporum* kladosporelerinin çimlenmesini azaltabilir (Chuang, 1991; Woltz and Jones, 1981). İhtiyaç duyulan seviyenin üzerinde fosfat oranları pamuk ve kavunda *Fusarium* solgunluğu şiddetini arttırabilir (Jones et al., 1989).

2.1.2.3. Dayanıklı çeşitlerinin kullanılması

Dayanıklı çeşitlerinin kullanılması *Fusarium* solgunlukları ile mücadelede etkili ve ekonomik bir yöntemdir. Ancak yeni patojenik ırkların ortaya çıkması veya etmenlerin tüm ırklarına karşı dayanıklı olabilecek çeşitlerin geliştirilmesinin zor olması başarı şansını kısıtlıyan bir sorundur (Egel and Martyn, 2007, Jarvis, 1998).

F.oxysporum f.sp. *cucumerinum*' un üç fizyolojik ırkı, yani. Irk 1, 2 ve 3 tespit edilmiştir (Armstrong et al., 1978). Hastalığa dayanıklılık ya polijenik (Kanno et al., 1991; Toshimitsu and Noguchi, 1975) ya da bir tek dominant genden kaynaklanabilir. "Foc" geni, patojenin 1 ve 2 nolu ırklarına karşı dayanıklılık kazandırmaktadır (Vakalounakis, 1996b, 1995, 1993). Hollanda tipi hıyar çeşitlerinin çoğu "foc" genine sahip olmaları dolayısıyla *Fusarium* solgunluğuna dayanıklıdır (Vakalounakis, 1993).

2.1.2.4. Biyolojik kontrol

Biyolojik kontrol ajanları, diğer kontrol stratejileri ile ilgili çevresel ve ekonomik kısıtlamalar nedeniyle *Fusarium* solgunluğunu yönetmek için kullanılır. Biyolojik kontrol hastalık yönetiminde tek başına ya da entegre mücadele kapsamında kullanılabilir.

Bitkiye yararlı kökü kolonize eden bakteri ve funguslar kök patojenlerine karşı bitkilerin korunmasında önemlidir (Haas and Defago, 2005). *Fusarium solgunluk* hastalıklarının kontrolünde bitkilere yararlı organizmaların belli başlı grupları *Pseudomonas* ve *Bacillus* genuslarına dahil olan bakteri türleri ve patojenik olmayan, *F. oxysporum*’ dan oluşmaktadır (Fravel et al., 2003; Haas and Defago, 2005). Diğer birçok mikroorganizmanın da *Fusarium solgunluğu*’nun etkisini azalttığı bildirilmiştir. Bunlar arasında, Actinomycetes’ ler (Cao et al., 2005; Meredith, 1943) ile *Trichoderma* ve. (Harman et al., 2004) ve *Gliocladium* (Sivan'ın ve Chet, 1986) türleri bulunmaktadır. Biyokontrol organizmaları tek başına hastalık şiddetini azaltma yeteneğine sahip olsalar da genellikle diğer biyokontrol ajanları ile birlikte kullanıldıklarında veya entegre mücadele içinde yer aldıklarında daha etkili olmaktadır.

Bitki-mikroorganizma etkileşimleri bitki gelişimini ve bitki sağlığını desteklemede dikkat çekici bir konu olmuştur. Bitkiler endofitik organizmalar için geniş ve çok çeşitli ekolojik niş oluşturmaktadır. Mikroorganizmalar arasında, endofitik bakteriler konukçularına zarar vermeden bitkilerin iç dokularını işgal ederler. Bitkiler ile bu mikroorganizmaların etkileşimini sağlayan mekanizmaların anlaşılması, verimli bir bitki–bakteri ilişkisi sağlanması ve biyoteknolojik potansiyellerinin anlaşılabilmesi için gerekli olabilir. Biyolojik kontrol ajanları ile *Fusarium solgunlukları*’nı önlemek üzere kullanılan mekanizmalar aşağıdaki gibi sayılabilir.

Bazı mikroorganizmalar diğer mikroorganizmalara toksik etki gösteren ikincil metabolitler üretebilir (Lorito et al., 1993; Milner et al., 1995; Salma ve et al., 1996). Geniş spektrumlu antibiyotik 2,4– diacetylphloroglucinol’ ün *F.oxysporum* dahil olmak üzere çeşitli bitki patojenleri ile biyolojik mücadelede önemli bir role sahip olduğu gösterilmiştir (Duffy et al., 2004). *Streptomyces* sp. Strain 385 tarafından üretilen s-1.3-glukanaz enzimi, hıyar *Fusarium solgunluğu* patojeni *F.oxysporum* f.sp.*cucumerinum*’ un hücre duvarını parçalayarak etki etmektedir (Singh et al., 1999). Endofitik *Streptomyces* strain NRRL30562 *in vitro* da, *F. oxysporum*’ u engellediğini belirlenmiştir (Castillo et al., 2002). Çoğu durumda *Pseudomonas*, *Bacillus* ve *Streptomyces* türlerine ait bakteriler antibiyozis mekanizmasını

kullanarak *F. oxysporum*' a karşı etki göstermektedirler (Getha and Vikineswary, 2002; Landa et al., 1997; Sturz et al., 1999; Taechowisan et al., 2005).

Karbon (C) için rekabet *Fusarium* solgunluklarını baskılayıcı topraklarda bulunan birincil mekanizmalarından biridir (Alabouvette and Lemanceau, 2000; Sivan and Chet, 1989). Alabouvette and Couteaudier (1992), bazı patojen olmayan *F. oxysporum* izolatlarının karbon için etkin bir şekilde patojenik *F.oxysporum* ile yarıştığını göstermiştir. Mikro element demir için rekabet , başka bir yoldur. Bu sayede özellikle floresan *Pseudomonas*' lar patojenleri engelleyebilir (Leong, 1986). Siderofor *P. fluorescens* tarafından demir almak için ortama salgılanan düşük molekül ağırlıklı moleküllerdir (Höfte, 1993). floresan *Pseudomonas*' lar tarafından üretililen sideroforlar demirin mikrobiyal yoldan elde edilmesini, demir eksikliği olan bir ortamda artırmaktadırlar (Neilands, 1973). Yüksek miktarda demir ve siderofor üreten *Pseudomonas* spp. eklenmesi turp, keten ve hıyar *Fusarium* solgunluğu şiddetini azaltılmıştır (Leeman et al., 1996;Scher and Baker, 1982).

ABD'de yapılan bir çalışmada *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum*' a karşı *Pseudomonas putida* kullanılmıştır. Yapılan denemler sonucunda *P. putida* ile uygulama görmüş hıyar bitkileri kontrolle karşılaştırıldığında hastalık çıkışında %40 oranında bir azalış meydana gelmiştir. Yapılan denemeler sonucu bunun siderofor etkiden kaynaklandığı anlaşılmıştır (Scher and Baker, 1982).

Kaliforniya' da yapılan başka bir çalışmada *Fusarium*' u baskılayan topraklardan 700 civarında bakteri ve Actinomycetes izole edilmiştir. Bu izolatlar fungal hücre duvarını yıkan enzim olan kitinase enzimi üretimi ile, klamidosporların çim borusu üretimini engelleme ve siderofor gibi floresan bileşikler üretme yetenekleri yönünden testelenmişlerdir. FP' lar tarafından siderofor üretimi ile bu FP' ların topraktaki klamidospor çimlenmesini engellenmeleri arasında direkt bir ilişki olduğu saptanmıştır. Bu durum araştırmacılar tarafından sideroforlar ile Fe^{+3} için yarışma mekanizması ile açıklanmaktadır (Sneh et al., 1984).

Sideroforlar *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* 'un klamidospor çimlenmesini %70.2 oranında engellemiştir. Ancak bu etki toprak fazla miktarda demir bulunması durumunda kırılmıştır. Siderofor gibi EDDHA (ethylenediamine di-o-hydroxy

phenyl acetic acid) da klamidosporların çimlenmesi üzerinde benzer etki göstermiştir. Fe EDDHA ise klamidospor çimlenmesini etkilemiştir (Elad and Baker ,1985b).

Kök bölgesi için rekabet *Fusarium* solgunluğun azaltılmasında rol oynamaktadır. *Pseudomonas türleri* ve diğer bitki büyümesini teşvik eden bakterilerin (PGPR), karbon kaynağı (Rovira, 1965), amino asitler (Simons et al., 1997) ve organik asitler (Welbaum et al., 2004) açısından zengin olan kök bölgesi için rekabet ettikleri bildirilmiştir (Lugtenberg et al., 1999).

Patojen olmayan *F. oxysporum* ile hıyar *Fusarium* solgunluğunun biyolojik kontrolünde rol oynayan mekanizmaları ortaya koymak amacıyla yürütülen bir çalışmada, patojen olmayan *F. oxysporum* strain C5, 1.08×10^4 cfu/g toprak yoğunluğunda, strain C14, 5×10^4 cfu/g toprak yoğunluğunda *F. oxysporum* f. sp. *cucumerunum* 'un hastalık oluşumunu önemli oranda azaltmıştır. Hastalık oluşumunun azalmasında 3 mekanizmanın rol oynadığı bildirilmiştir. Bu mekanizmalardan birincisi C5 ve C14 ile infekteli hıyar bitkilerinin rizosferinde *FOC* ' un klamidosporlarının çimlenmesinde meydana gelen azalma ikincisi strain C14 ile *FOC* arasında enfeksiyon bölgesindeki yarışma ve üçüncü mekanizma ise konukçunun sistemik dayanıklılığının artırılması olduğu bildirilmiştir (Mandeel and Baker,1991).

Uyarılmış dayanıklılık, önceden bir elisitör muamelesi ile bitkide bir patojenin olumsuz etkisini azaltan süreçtir (Van Loon, 1997;Van Loon et al., 1998). Bundan sonra, konukçu bitki patojen tarafından inokule edildiğinde bir dizi olayları tetikler bu da kimyasal ve yapısal savunma tepkilerinin indüklenmesine yol açar, bu tepkiler olarak sayılabilir : reaktif oksijen türleri, fenolikler, hidrolitik enzimler ve fitoaleksinlerin birikmesi (Niemann et al., 1990). Uyarılmış dayanıklılığın iki türü vardır, lokal kazanılmış dayanıklılık (LAR) ve sistemik dayanıklılık (SR). Sistemik dayanıklılık enfeksiyon yapılan bölgeden uzak olan dokulardır da dayanıklılığın oluşması olarak tanımlanır ve sistemik kazanılmış dayanıklılık (SAR) ve sistemik Uyarılmış dayanıklılık (ISR) diye ikiye ayrılır. SAR geniş bir yelpazede patojenleri etkiler (Vallad and Goodman, 2004) ve genelde kimyasal ve patojenik organizma tarafından indüklenir . Salisilik asit ve

patojenenezis ile ilgili proteinlerin (PR) birikimini tetikler (Sticher et al., 1997; Van Loonveet al., 1998). PGPR gibi bakteriler ISR'yi tetikleyerek (Van Loon et al., 1998) etilen ve Jasmonik asit- pathwaylerini uyarır (Pieterse et al., 1996).

Bazı biyolojik kontrol ajanı mikroorganizmaların bitkilerde ISR'ı uyardığı bilinmektedir. Bunlar arasında PGPR *Pseudomonas* spp. ve patojenik olmayan, *F. oxysporum* fungusu sayılabilir. Patojenik olmayan *F.oxysporum* Fusarium solgunluğunu muz (Gerlach et al., 1999), hıyar (Mandeel and Baker, 1991) karpuz (Larkin et al., 1996) ve domates te(Fuchs et al., 1997; Olivain et al., 1995) ISR ile azaltığını gösterilmiştir.

Bitki gelişimini uyaran kök bakterilerinden (PGPR) olan *Pseudomonas putida* strain 89B-27 ve *Serratia marcescens* 90-166 hıyarda antraknoz hastalığına neden olan *Colletotrichum orbiculare*'ye karşı testlenmiştir. Bu etmene karşı strain 89B-27 tarafından oluşturulan sistemik uyarılmış dayanıklılık ilk yaprak döneminde oluşmuş ve 5. yaprak dönemine kadar artarak devam etmiştir. Strain 90-166 tarafından oluşturulan sistemik uyarılmış dayanıklılık ise daha stabil halde ikinci, dördüncü ve beşinci yaprak döneminde olmuştur (Liu et al., 1995a).

Liu et al.; PGPR bakterilerinin (*Pseudomonas putida* strain 89B-27 ve *Serratia marcescens* 90-166) ve hıyar solgunluk etmeni *F.oxysporum* f. sp. *cucumerinum*'u aynı anda hıyar köklerine uyguladıklarında iki PGPR straininin de FOC'a karşı sistemik dayanıklılığı uyardığını saptamışlardır. PGPR strainleri 5 haftadan daha uzun süreyle hıyar bitkilerini solgunluktan koruyabilmişlerdir (Liu et al., 1995b).

2.2. Endofitik Bakteriler

Endofitler konukçu bitkilerinin, fizyolojik, gelişimsel ve morfolojik özelliklerini, rekabet güçlerini artırma, özellikle stresli ortamlarda, değiştirebilirler (Bacon, 1993; Malinowski and Belesky, 1999). Cook (1993) hedef konukçu bitkinin köklerinden izole edilen mikroorganizmaların, bitki türleri ile ve çalıştığı fiziksel çevre ile ilişkili olduğundan dolayı etkili ajanlar seçimi için daha iyi adaylar olduğunu belirtmiştir.

Endofit-bitki ilişkileri bitki türlerinin birçoğunda ve neredeyse her bitki parçasının içinde bulunan çeşitli bakteri türlerine göre çeşitlilik gösterir (McInroy, 1993). Endofitik bakteriler bitkilerin kortikal veya vasküler dokularının içinde hayatta kalırlar (Patriquin and Dödereiner, 1978). Rizosfer ve phylloplanle gibi yerlerin aksine, bu yerler endofitler için korumalı bir ortam da sağlarlar (Chen et al., 1995). Endofitik bakteriler önceden seçilmiş yararlı organizmalar olarak belirlenebilir ve bazıbiyolojik control ajanlarının aksine hastalığı kontrol etmede ,epifitlere oranla daha başarılıdır (Sturz and Nowak, 2000). Chen et al., (1995), pamuğun iç dokusunda bulunan endofitik bakteriler *B. Pumilus* ve *P. Putida*'nın pamuk vasküler solgunluk hastalığı etmeni *F.oxysporum* f.sp.vasinfestum 'un şiddetini azalttığını belirtmiştir. Nejad and Johnson (2000) da, domatesin köklerinin içinden izole edilen *Pseudomonas* spp'nin domates fidesinin, büyümesini artırmayı başardığını ve Fusarium solgunluğu şiddetini azattığını saptamıştır.

2.2.1. Endofitlerin tarihçesi ve tanımı

Endofit terimi (Gr: Endon; içinde ve piton; bitki) ilk DeBary (De Bary, 1866) tarafından bulunmuştur ve bir endofit, konukçu birbitkide hiç bir tipik belirgin hastalık belirtisine neden olmadan, yaşam döngüsünün tamamını veya bir kısmını geçiren bir bakteriyel veya fungal mikroorganizmadır.

Bakteriyel endofitler 100 yılı aşkın bir zamandır bilinmektedir.Sağlıklı bitkilerin dokuları içinde yerleşik bakteri varlığı ilk olarak 1926 gibi erken bir zamanda saptanmıştır (Hallman et al., 1997).1926 yılında, Perotti bakterilerin endofitik gelişimini onların hayatının belirli bir aşaması olarak tanımış ve infeksiyondan gelişmiş bir aşama olarak ve mutualistik simbiyozile yakın bir ilişkiye sahip olarak nitelendirmiştir.

Perotti (1926), kök dokularında patojenik olmayan floranin meydana gelmesini açıklayan ilk araştırmacıdır ve Henning and Villforth(1940) ise görünüşe göre sağlıklı bitkilerin yaprak, gövde ve köklerinde bakteri varlığını bildirmişlerdir. O zamandan beri, endofitler, yüzeyi sterilize edilmiş bitki organlarından izole edilebilen mikroorganizmalar olarak tanımlanmıştır. 1940'lardan beri çeşitli bitki dokularında endofitik bakteriler üzerinde çok sayıda rapor bulunmaktadır (Hallmann et al., 1997).

1980'lerde azot fikse etme yeteneğine sahip olan endofitik bakteriler buğdaygil bitkilerinde bulunmuştur (Reinhold-Hurek and Hurek, 1998b).

Bu endofit ilişkileri ilk olarak yüksek bitkiler yüz milyonlarca yıl önce yer yüzünde ortaya çıktığında gelişmeye başlamış olabilir. Mikroplarla ilişkili bitkilerin fosilleşmiş sap ve yaprak dokuları buna kanıt olarak gösterilmektedir (Taylor and Taylor, 2000). Bu uzun birlikteliğin bir sonucu olarak, endofitik mikroorganizmalardan bazılarının, genetik sistemlerini geliştirmeleri mümkündür, böylece kendileri ve yüksek bitkiler arasında ve tersine bilgi transferine izin vermekte rol oynamaktadırlar (Stierle et al., 1993).

Endofit terimi bakteriyel veya fungal mikroorganizmalar tarafından bitkilerin iç kolonizasyonu anlamına gelir. Endofit çeşitli yollarla tanımlanmıştır bu alanda araştırmalar ilerledikçe tanımları modifiye edilmiştir. Tervet and Hollis ,(1948) endofit mikroorganizmaları, hastalık belirtilerine neden olmadan bitkilerin içinde yaşayabilen canlılar olarak tanımlamıştır. 'Endofitik bakteriler' maddi zarar yapmadan veya ikamet güvenliği kazancı dışında yarar sağlamadan bir organizma içinde yaşayan bakteri nüfusedir (Kado, 1992). Quispel'in (1992) yaygın olarak kullanılan bir tanımına göre Endofitik bakteri veya funguslar, konukçu dokuya hasar vermeden ya da bitki hastalık belirtileri ortaya çıkarmadan içsel olarak dokuyu kolonize etmektedir. Yaşam döngüsünün tamamını veya bir kısmını bitki dokuları içinde yaşayan ve varlığından dolayı görünür belirtilere neden olmayan mikroorganizmalar endofit olarak tanımlanır (Wilson,1993). Bacon and White (2000) endofitleri 'canlı bitkilerin iç dokularını, herhangi bir anda, belirgin olumsuz etkilere sebep olmadan kolonize eden mikroplar' olarak tanımlanmıştır. Schulz and Boyle (2006) 'ya göre endofitik bakteriler bitkilerin iç dokuların kolonize ederek harici enfeksiyon belirtisi veya konukçu üzerinde olumsuz etkisi göstermeyen bakteriler olarak tanımlanabilir.

Endofitik bakteri için verilen tanımlar arasında Hallmann et al., (1997), tarafından verilen tanımın en uygun olduğu görülmektedir. Hallmann et al., (1997); endofitik bakteriler, konukçu bitkiler üzerinde gözle görülür hiçbir zararlı etkisi olmayan yüzeyi sterilize olan bitki dokularının içinden izole edilerek tespit edilebilen tüm bakteriler diye tanımlamıştır. Bu tanımlama, nötr davranış olan iç

kolonilerin yanı sıra simASMTları da içerir. Aynı zamanda endofitik aşama esnasında yüzeye ve bitkinin iç kısmı arasında ileri ve geri geçiş yapan bakterileri de içerir. Endofit ve konukçu bitkinin arasındaki ilişki gizli fitopatojenden mutualistik simbiyozla kadar değişebilir (Sturz et al., 1997).

Endofitik bakteriler, yaşam stratejilerine göre başlıca obligat veya fakültatif olarak sınıflandırılabilir. Obligat endofitik bakteriler, gelişebilmeleri ve hayatta kalabilmeleri için sıkıca konukçu bitkiye ihtiyaç duyan ve diğer bitkilere taşınımı dikey olarak ya da vektörler aracılığıyla gerçekleştirir. Fakültatif endofitlerin kendi yaşam döngülerinde konukçu bitkiler dışında var olduğu bir aşama vardır. Bakteriyel fitopatojenler genellikle bitkilerde avirulent formlarda meydana geldiğinden fakültatif veya obligatendofit olabilir. Bu şekilde bitki patojenlerinin avirulent formları endofit olarak kabul edilmelidir, bu organizmaların virulent formları endofitlere dahil edilmemelidir (Hardoim et al., 2008).

Fakültatif endofitlerin yaşam döngüsü, bitki ve çevrenin (özellikle toprak) arasında değişen şekilde bifazik olarak karakterize edilebilir. Bitkilerin içinde gelişebilen mikroorganizmaların büyük çoğunluğunun muhtemelen bifazik yaşam için bir eğilimleri vardır. Aslında, bitkilerin içinde gözlenen mikrobiyal çeşitlilik, çeşitli endofitlerin bitki içine girip devam etme yeteneği ile açıklanabilir (Rosenbleuth and Martinez-Romero, 2006).

2.2.2. Endofit biyoçeşitliliği

Toprak mikrobiyal toplulukları, ekosistem fonksiyonlarında tamamlayıcı ve çoğu zaman benzersiz bir rol oynayabilir ve biyosferde en karmaşık, farklı ve önemli topluluklar arasındadır (Zhou et al., 2003). Bitkilerin içinde yaşamak için iyi adapte olan bakterilerin doğal olarak seçilmiş olduğu gözlenmektedir. Endofitler büyük bir toprak havuzundan veya rizosferik tür ve klonlardan dışarı alınırlar. Endofitik bakteriler aktif veya latent şekilde bitkileri, lokal ya da sistematik olarak ve hem de hücreler arası ve hücre içi kolonize edebilirler. Çeşitli raporlar, bu bakterilerin çok sayıda bitki türleri içindeki çeşitli doku tiplerinde mevcut olduğunu göstermektedir ve hepsi değilse de, çoğu bir yerde yüksek bitkilerde varlığını düşündürmektedir. Tek

bir konukçu bitkide endofitik bakteri tek bir türle sınırlı değildir ve birkaç cins ve tür içermektedir (Ryan et al., 2008).

Endofitik bakterilerin geniş bir bitki çeşitliliğinden izole edildiği Sturz ve arkadaşları (2000) tarafından bildirilmiştir. Mundt and Hinkle (1976), 27 bitki türünde 46 gibi birçok farklı bakteri türleri bildirilmiştir.

Bitkilerde ve eski bitkilerdeki (*In planta* and *ex planta*) *Pseudomonas* türlerinin popülasyonu biyokimyasal özelliklerine göre ayırt edilebilir (Van Peer et al., 1990). McInroy and Kloepper (1991), endofitik bakteriyel popülasyonların mısır saplarında başlangıçta 1×10^3 ve 10 hafta sonra 1×10 cfu/ml arasında değişmekte olduğunu göstermiştir. Mavingui et al., (1992) *Bacillus polymyxa*'nin toprakta, rizosferde, rhizoplane ve buğday köklerinde endofit olarak izole edilmiş popülasyonlarının farklı olduğunu bulmuştur. Germida et al., (1998) endofitik nüfus çeşitliliğinin kök yüzey nüfusundan az olduğunu ve endofitlerin kök yüzey nüfusundan kaynaklandığını ortaya çıkararak bulmuşlardır.

Bakteriyel endofitler, çeşitli bitkilerde örneğin şeker pancarı (Dent et al., 2004), çayır bitkileri, tarımsal bitkiler (Zinniel et al., 2002), patates çeşitleri (Sessitsch et al., 2002), buğday (Germida and Siciliano, 2001) ve çeltikte (Sun et al., 2008) bulunmuştur.

Zinniel et al., (2002) dört kültür bitkisinde ve 27 çayır bitkisi türünden toprak üstü dokulardan 853 endofitik türü izole etmiştir. İzole edilen mikroorganizmaların (689 tür) büyük bir çoğunluğu mısır ve sorgum'dan; 45 türü soya ve buğdaydan elde edilmiş ve 119 tür 27 farklı çimen, forbs otlar, baklagiller ve yabani çiçek (wildflowers) konukçu türlerinden elde edilmiştir. Bir bütün olarak, çok yıllık bitkilerden, tarımsal ürünlere göre daha az izolat elde edilmiştir.

Bacillus ve *Pseudomonas* cinslerine ait bakteriler, kültürü kolay ve yetiştirmeye bağımlı olan ve çalışmalarda sık rastlanan endofitler olarak tanımlanmışlardır (Seghers et al., 2004).

Hıyar bitkisinden izole edilen *Agrobacterium* , *Bacillus*, *Burkholderia*, *Chryseobacterium*, *Clavibacter*, *Curtobacterium*, *Enterobacter*, *Miceococcus*, *Paenibacillus*, *Phyllobacterium*, *Pseudomonas* ,*Serrtia* ve *Stenotrophomonas* vb. bakteriyel genuslarda,endofitik bakteriler arasında antagonistik bakteriler kadar patojenlerin de yer aldığı gösterilmiştir (Mahaffee and Kloepper, 1997a, 1997b; McInory and Kloepper, 1995).

İlk güvenilir raporlar yüzey ısterilize edilmiş bitkilerden endofitik bakterilerin izolasyonu ile ilgili (Samish et al., 1960; Mundt and Hinkle, 1976) 200'den fazla cins 16 şube endofit bakteriyi olarak bildirmiştir. Bunlar,kültüre alınabilen ve kültüre alınamayan bakteri içerir ve *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Aquificae*, *Bacteroidetes*, *Cholorobi*, *Klorofleksi*, *Siyanobakteriler*, *Deinococcus-Thermus*, *Firmicutes*, *Fusobacteria*, *Gemmatimonadetes*, *Nitrospira*, *Planctomycetes*, *Proteobacteria*, *Spirochaetes* ve *Verrucomicrobiae* şubelerına aittir (Hallmann and Berg, 2006; Manter et al., 2010; Mengoni et al., 2009;Sun et al., 2006). Ancak, en ağırlıklı ve incelenmiş endofitler üç büyük şubelere (*Actinobacteria*'lar, *Proteobacteria* ve *Firmicutes*) aittir. Bu şubelere bağlı *Azoarcus* (Krause et al., 2006), (*Gluconobacter* olarak değiştirildi) *Asetobakter* (Bertalan et al., 2009),*Basil* (Deng et al., 2011), *Enterobacter* (Taghavi et al., 2010), *Burkholderia* (Weilharter et al., 2011), *Herbaspirillum* (Pedrosa ve ark. 2011), *Pseudomonas* (Taghavi et al., 2009), *Serratia* (Taghavi et al., 2009), *Stenotrophomonas* (Ryan et al., 2009) ve *Streptomyces* (Suzuki et al., 2005) cinslerde bulunmaktadır. Bu cinslerin üyeleri endofitik kolonilerin ana kaynağını temsil ederek toprak/rizosfer gibi her yerde bulunur (Hallmann and Berg, 2006). Endofitler için başka olası kaynaklar fillosfer, anthospher ve tohumlar sayılabilir (Compant et al., 2010).

2.2.3. Endofitik bakterilerin bitkide kolonizasyonu

Endofitik bakterilerin dış çevreden kaynaklanmakta ve stoma, lentisel, yaralar, lateral köklerin çıkma alanlardan ve kökçükler yoluyla bitkiye girmektedir (Huang, 1986). Birçok tohum, çeşitli endofitleri taşımaktadır (Coombs and Franco, 2003b; Hallmann et al., 1997). Endofitin tohumla taşınması, onların yeni bitkilerde varlığını temin etmektedir. Methyloleotroph'lar soyafasulyesinde tohumla taşınmaktadır (Holland and Polaco, 1994). Vejetatif yolla çoğalanlar (örneğin, patates yada

şekerkamışı) kendi endofitlerini yeni nesile aktarabilen ve enfeksiyon işlemini gerektirmeyen bitkilerdir.

2.2.3.1. Rhizoplanede kolonizasyon

Bakterilerin bitkinin içinde kolonizasyonu genellikle rizosferde başlar. Bu sürecin erken olayları tanıma ve kemotaksis gibi olaylar, kapsamlı şekilde Lugtenberg et al., (2001) Lugtenberg ve Kamilova (2009) tarafından araştırılmıştır. Rizosfer kolonizasyonunun ardından, bakteriler rhizoplane, yani kök yüzeyine tutunur. Bir dizi Mutasyon çalışmasında bakteriyel hücrelerin köke bağlanması endofitik ilişkinin kurulmasından sonraki adımlar için çok önemli olduğunu göstermiştir. Çeşitli bakteriyel yüzey bileşenleri bu sürece dahil edilebilir. *Azoarcus sp.* BH72 için, çltikte bir endofitik diazotrofu, pılAB tarafından kodlanan IV pili tipi, kök yüzeylerine tutturulmak için gereklidir(Dörr et al., 1998). pılAB ekspresyonunda bozulmuş bir mutant türü, pirinç bitkilerinin kök ve filizlerinin kolonizasyonunda başarısız olmuştur (Reinhold-Hurek et al., 2006). Başka bir diazotrofik endofitin, *Herbaspirillum seropedicae*, mısır kök yüzeylerine bağlanması LPS'e (liposakkarite) bağlıdır (Balsanelli et al., 2010). LPS çekirdek alanında monosakkarit kompozisyonu değişmiş olan bir mutant türü, yabani (doğal) tipiyle karşılaştırıldığında köke yapışması ve endofitik yayılmasını yüz kat daha az göstermiştir. Benzer bir çalışmada, çeltik bitkisinde, EPS'in (eksopolisakaridin), *Gluconacetobacter diazotrophicus'un* rhizoplane ve endosphere kolonizasyonu için gerekliliğini göstermiştir (Meneses et al., 2011).

2.2.3.2. Bitkiye giriş

Bakteriyel bağlanma ve ardından tercih edilen giriş yerleri olarak, hücre uzaması ve saçak kök bölgesi (aktif nüfuz bölgesi) gibi ince çeperli yüzey kök tabakası apikal kök bölgesi ve yan köklerin çıkmasına (pasif penetrasyon bölgesi) neden olan küçük çatlakları bulunan bazal kök bölgesidir. Bu bölgelerde, bakteriler genellikle her biri birkaç yüz hücre içeren mikrokoloniler şeklinde yer alır (Zachow et al., 2010). Aktif penetrasyon için, endofitik bakteriler, bitkinin exodermal hücre duvarlarını hidrolize edebilecek selülotik enzimlere sahip olmalıdır. Bu enzimlerin *in vitro* üretimi bir çok endofit için bildirilmiştir (Compant et al., 2005; Reinhold-Hurek

et al., 2006). Selüloz içinde $\beta(1\rightarrow4)$ bağlantısının hidrolizinden sorumlu olan ana selülaz, ekspresyonu, *Azoarcus* sp. BH72 girişinin birincil yerinde gözlenmiştir (Reinhold-Hurek et al., 2006).

Ayrıca, endoglukanazın rolü endofitik kolonizasyonun da mutasyon analizi ile teyit edilmiştir. Bir *eglA* mutantı, vahşi tip strain ve *eglA* ile tamamlanmış mutantın aksine, bitki hücrelerini etkin biçimde istilada ve sistematik olarak kolonizasyonda başarısız olmuştur.

Hücre çeperini bozan bakteriyel enzimlerin, bitki hücre duvarları ile savunma ve onarım işinde işbirliği yapan birçok proteinler gibi, bitki savunma yollarının ortaya çıkması ile ilgili olduğu bilinmektedir (Norman-Setterblad et al., 2000). Böyle bir uyarılma, genellikle bir bitki içindeki patojenin yayılmasını azaltma ile sonuçlanmaktadır (Iniguez et al., 2005).

Bu endofitler için söz konusu olmadığından endofitik bakteriler, bitki bağışıklık tepkisinden kaçabilmeli veya hatta bir ölçüye kadar onu azaltabilmelidirler. Sekans edilmiş endofitlerin genomik analizi bu kavramı doğrulamıştır. Bu sürecin mekanizmasının tam olarak aydınlatılması gerekmektedir.

Yan köklerin görüldüğü bölgelerde doğal çatlaklardan bitkiye giren bakteriler bitkinin bağışıklık sistemi için "görünmez" olarak kalır. Genellikle aktif penetrasyon ile kombine olan bu giriş durumu çeltikte *Azoarcus* sp. BH72 (Reinhold-Hurek and Hurek, 1998) ve *Burkholderia vietnamiensis* (Govindarajan et al., 2007) asmada *B. Phytofirmans* PsJN (Compant et al., 2005), dutta *B. Subtilis* Lu144 (Ji et al., 2008) ve *B. cepacia* Lu10-1 (Ji et al., 2010) şeker kamışında, *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 (James et al., 1994) ve çeltikte *Herbaspirillum seropedicae* Z67 için (James et al., 2002) öne sürülmüştür.

2.2.3.3. Bitki korteksinde kolonizasyonu

Arabidopsis ve *Paenibacillus polymyxa* ilişkisinde gösterildiği gibi, bakteriyel hücreler exodermal bariyeri geçtikten sonra, giriş yerinde kalabilir (Timmusk et al., 2005) veya daha içeri hareket edip korteks'de hücreler arası boşluğu işgal edebilirler

(Compant et al., 2005; Gasser et al., 2011; James et al., 1994; Roncato-Maccari et al., 2003). Endofitik bakterilerin bitki hücrelerine nüfuzu ve onlarda kök-nodülbakterilerinin yaptığı gibi özel morfolojik yapıların oluşumuna neden olması nadirdir. Bununla birlikte, son zamanlarda Huang et al., (2011), *Bacillus subtilis* GXJM08'in, baklagillerden *Robinia pseudoacacia* L. bitkisinin kökünü Rhizobia'dakine benzer bir şekilde kolonize etmesini göstermiştir. En dramatik değişiklikler (i) kök saçağının deformasyonu (şişme, dallanma) (ii) kök kortikal hücrelerinin duvarları arasındaki bakteriler ile enfeksiyon ipliklerinin gelişimi ve (iii) bitki kortikal hücrelerinin içinde bakteroid oluşumu sayılabilir. Bu türün, kök nodül bakterileri gibi N'i tespit edip etmediği bilinmemektedir.

2.2.3.4. Ksilem kolonizasyonu

Sadece birkaç bakteri endodermal bariyerine sızabilir ve ksilemin damarlarını istila edebilir (Compant et al., 2005; Gasser et al., 2011; James et al., 2002; Roncato-Maccari et al., 2003). Bu genellikle apikal kök bölgesinde suberin bulunmayan endodermal hücreler içinde ve /veya meydana gelen yan köklerin endodermal hücre duvarındaki kaspari şeridi sürekliliğinin kesintisinin olduğu bazal kök bölgesinde meydana gelir. Su, iyonlar ve düşük molekül ağırlıklı organik bileşikler, şekerler, organik ve amino asitler mevcut besin konsantrasyonlarının nispeten düşüklüğü ve bazı şekerler için 0.006 - 0.034 mol /g taze ağırlığı temsil etmesine rağmen uzun mesafede taşınmaktadır (Madore and Webb, 1981). Bu değerlerin endofitik bakterilerin büyümesini desteklemek için yeterli olduğu hesaplanmıştır (Sattelmacher, 2001, Bacon and Hinton, 2006). Bakteriyel endofitlerin bitki besini ile beslenmesine dair doğrudan kanıt birkaç radyoaktif etiketleme deneylerinden elde edilmiştir. Örneğin, $^{13}\text{CO}_2$ bulunan patates bitkilerinin inkübasyonundan sonra, Rasche et al., (2009) izotop etiketi ilk olarak, bitkinin fotosentez metabolitlerinde ve daha sonra, çeşitli endofitik bakterilerde tespit etmişlerdir.

Birkaç deneme endofitik yaşam tarzı açısından önemli olabilecek karbon kaynaklarını bulmak için yapılmıştır (Shishido et al., 1999; Krause et al., 2011; Malfanova et al., 2013). Shishido et al., (1999) endofitik *Paenibacillus polymyxa* Pw-2R türü ve *Pseudomonas fluorescens* Sm3-RN türünün karbon oksidasyon profillerini, endofitik olarak ladin ağacını kolonize edemiyen Rhizospherik

türlerinininkiler ile karşılaştırmışlardır. Pw-2R ve Sm3-RN türleri D-sorbitol ve D-galakturonik asidi metabolize ederken onların rhizosferik meslektaşları yapamamıştı. Malfanova et al., (2013) tarafından yapılan yeni bir çalışmada, çoğu rizosferik *Pseudomonas* spp.'lerin aksine (Iwai et al., 2003) salatalık bitkilerinden izole edilen endofitik *Pseudomonas*'ların, çeşitli bitkilerin ksilem sıvısında en bol bulunan şekerlerden biri olan L-arabinose'u, kullanmayı başardıklarını bulmuştur. Başka bir çalışmada, Krause et al., (2011) çeltik köklerinin içinde *Azoarcus* sp. BH72 kolonizasyonu süresince çeşitli bakteriyal alkol dehidrojenaz ekspresyonunun uyarılması, tespit edilmiştir. Alkol dehidrojenazları kodlayan genleri bozulmuş mutant strinler kök içinin kolonizasyonunda yabancı türü göre daha az başarılıdır. Su ile kaplanan çeltiklerde Etanol'un bol olduğu zaman, bitkinin içinde strain BH72 hücreleri için önemli karbon kaynaklarından biri olabileceğini işaret etmektedir. Bu çalışmalar, bakterilerin belirli bitki metabolitlerini kullanma yeteneğinin, başarılı endofitik ilişki kurulması için bir ön koşul olabileceğini göstermektedir.

2.2.3.5. Üreme organlarının kolonizasyonu

Bitki eksenı boyunca ksilemde mevcut besin konsantrasyonunun azalması muhtemeldir. Bu , endofitik bakterilerin çeşitliliği ve populasyon yoğunluğunun kökten uzaklaştıkça azaldığını ve sadece az sayıda bakterinin sürgünlerin üst parçaları, yaprak apoplastı ile çiçekler, meyveler ve tohumlar gibi üreme organlarına ulaşabilmesini açıklanabilir (Compant et al., 2010, Fűrnkranz et al., 2011). Bitkilerin üreme organlarında endofitik bakterilerin varlığı kültüre alma ile (Fűrnkranz et al., 2011;.Graner et al., 2003; Mundt and Hinkle, 1976; Okunishi et al., 2005; Samish and Etinger-Tulczynska, 1963) açıklanmış ve mikroskopik görüntüleme ile (Compant et al., 2011; Coombs and Franco, 2003) doğrulanmıştır. Büyük olasılıkla, bakteri hücreleri bitkinin vasküler dokuları aracılığıyla üreme organlarına girmektedir. Örneğın, pek çok fungal ve bakterial fitopatojenler, gelişen tohumları funiculus ve vasküler dokular yoluyla ve de stigma ve microfil yoluyla enfekte etmektedir (Agarwal and Sinclair, 1996). Aynı zamanda üreme hücrelerinden (yumurta hücresi ya da erkek gamet) birinin, bir mikrobu taşıdığı takdirde sonuçta embriyo ve endosperm kolonize olabilmektedir. Bu bitkilerden, tohumlara endofit transferini açıklayabilir. Ancak bugüne kadar üreme dokularının istilasını, sadece virüslerde (Agarwal and Sinclair, 1996) gösterilmiştir. Endofitik bakterinin vasküler

dokulardan üreme organlarına ve ardından yeni bitki nesiline tam bulaşma mekanizması henüz bilinmemektedir.

2.2.3.6. Bitki kolonizasyonunun diğer yolları

Rizosfer, endofitik kolonizasyonun ana kaynağı olarak kabul edilmesine rağmen, girişin diğer yerleri göz ardı edilemez. Bazı bakteriler stoma yoluyla bitkiye girer. Bu şeker kamışında *Gluconobacter diazotrophicus* (James et al., 2001) ve Rhododendron'da *Streptomyces galbus* için (Suzuki et al., 2005) gösterilmiştir. Sonuncu durumda, spesifik olmayan mum-bozan enzimlerin üretimi yaprak yüzeyi kolonizasyonu ve daha sonra bu mikroorganizmaların endofitik kuruluşunu kolaylaştırabilir (Suzuki et al., 2005). Bakteriler aynı zamanda çiçek, meyve ve tohum yoluyla bir bitkiye girebilirler. Ancak bu fitopatojenlere özel bilinen yollardır ve (patojenik olmayan) bakteriyel endofitler için belirlenmemiştir.

2.2.3.7. Endofitik kolonizasyonu etkileyen faktörler

Endofitik bakteriyel topluluklarda farklılıklar bitki yaşı, bitki kaynağı, doku tipi, örnekleme zamanı ve çevre koşullarına bağlanabilir (Kobayashi and Palumbo, 2000). Ayrıca, endofitik çeşitlilik içinde varyasyon, farklı kök salgılarının türünü ve miktarını etkileyebilen her bitkiye özgü, farklı olgunlaşma evrelerinin bir fonksiyonu olabilmektedir (Ferreira et al., 2008).

Endofit ile rekabet deneyleri, bazılarının daha agresif endofitler olarak diğerlerini yerlerinden ettiğini göstermiştir. Bu çeltikte, *Pantoea* sp., *Ochrobactrum* sp. (Verma et al., 2004) ve mısırdaki *Rhizobium etli* türlerinde (Rosenblueth and Martínez-Romero, 2004) gözlenmiştir. Ancak endofitlerden büyük bir çeşitliliği konukçu yelpazesi açısından analiz edildiğinde kesin bir özgülük gözlenmemiştir (Zinniel et al., 2002). Soya fasulyesinde farklı endofitik türlerin varlığı, bitki genotipine, bitki yaşına, bitki dokusuna ve izolasyon sezonuna bağlı olmuştur (Kuklinsky-Sobral et al., 2004). Toprak tipi buğdayda büyük ölçüde endofitik nüfusun belirlendiğini göstermiştir (Conn and Franco, 2004). Domates bitkilerinin büyümesinin teşvik edilmesinde inokulum düzeylerinde, rhizospheric

popölasyonlarında değil endofitik popölasyonda yükseliş ile korelasyonlar gözlenmiştir (Pillay and Nowak, 1997).

Endofit nüfus yoğunluğu oldukça değişkendir ve esas olarak bakteri türleri, konukçu genotipleri aynı zamanda konukçu gelişim aşaması, inokulum yoğunluğu ve çevre koşullarına bağlıdır (Pillay and Nowak, 1997;.Tan et al., 2003). *Gluconacetobacter diazotrophicus* tarafından şeker kamışında düşük azotla gübrelenen bitkilerin aksine yüksek azot gübreleme rejimi altındaki bitkilerin kolonizasyonunda bir azalma gözlenmiştir. Aynı zamanda organik iyileştiriciler bitkilerde endofitik popölasyonları etkilemektedir (Hallmann et al., 1997).

2.2.4. Bakteriyel endofitlerin izolasyonu

Genel olarak, endofitik bakteriler, rhizosferik bakteriler ya da patojen bakterilerden daha düşük bir nüfus yoğunluğuna sahiptir (Hallmann et al., 1997; Rosenblueth and Martínez-Romero, 2004). Endofitik niş bitki içsel dokularında kolonize olan bakteriler için dış çevreye karşı koruma sunmaktadır. Bu bakteriler genellikle hücreler arası boşluklarda kolonize olmaktadır ve tüm bitki bölümlerinden tohumlarda dahil olmak üzere izole edilmiştir (Posada and Vega, 2005). Meşe ve armut gibi odunsu ağaç türünden, şeker pancarı ve mısır gibi otsu ekin bitkilerine kadar değişen farklı kültürlerde endofitik bakteriler, monokotiledon ve dikotiledon bitkilerden izole edilmiştir. Bakteriyel endofit çeşitliliği üzerine çalışmalar bitkinin sodyum hipoklorit veya benzeri maddeler ile yüzeyleri dezenfekte edilen iç dokularından alınmış izolatların karakterizasyonu üzerinde odaklanmıştır (Miche and Balandreau, 2001). Lodewyckx et al., (2002) farklı bitki türlerinden endofitik bakterilerin izole edilmesi ve karakterize edilmesi için kullanılan yöntemleri ön plana çıkarmışlardır. Genel olarak bitki dokusunda, endofitik bakteriyel popölasyonlar gram başına 10^2 - 10^4 canlı bakteriler arasında bildirilmiştir (Kobayashi and Palumbo, 2000).

Bakterilerin kesin tanısında son yıllarda iyi korunmuş gen bölgeleri olan 16S rRNA (Moore et al., 2006; Pereira et al 2011) hedef bölgelerine göre dizayn edilmiş olan primerler kullanılmaktadır. Bu primerler ile yapılan PCR çalışması sonucu elde

edilen ürünlerin sekansa gönderilmesiyle elde edilen sekans sonuçları NCBI vb veri tabanlarındaki bilgiler ile karşılaştırılarak tanıları yapılmaktadır.

2.2.5. Endofit fonksiyonel çeşitliliği

Bitkilerin rizosferik bakteriden bir endofite göre daha fazla yararlanmaları mı ya da bakteri olarak endofitik olmanın mı rizosferik bakterilerle karşılaştırıldığında daha fazla avantajlı olduğu çözülememiştir, buna rağmen, endofit tarafından kazandırılan faydalar iyice tanınmıştır. Bitkilerle bakteriyel endofitlerin yakın birlikteliği, bitki koruma ve biyolojik mücadelede potansiyellerini uygulama için eşsiz bir fırsat sunmaktadır.

Bitki dokularının içinde yaşayan bakteriler patojenikten simbiyotike kadar değişen ilişkiler oluşturmaktadır. Bitki sağlığı açısından nötr görünen bakteriler çoğunlukla saplar, yapraklar, bitkilerin kökleri, tohum ve meyvede yaşamaktadırlar (Surette et al., 2003). Ancak, çeşitli çalışmalarda aynı zamanda bir çok endofitik birliklerin tamda nötr olmadığını, bitkiler için yararlı olduğunu ileri sürmüşlerdir (Barka et al., 2002; Bailey et al., 2006).

Mikroorganizmalar tarafından büyüme uyarımı; azot fiksasyonu (Hurek et al., 2002; Íñiguez et al., 2004; Sevilla et al., 2001) veya fitohormonların üretimi, kök bölgesinde fitopatojenlerin biyokontrolü (antifungal ya da antibakteriyel maddeler üretimi, siderofor üretimi, besin rekabeti ve sistematik kazanılmış konukçu direncinin indüksiyon veya bağışıklığı yoluyla), minerallerin kullanılabilirliğini arttırmanın (Sessitsch et al., 2002; Sturz et al., 2000) bir sonucu olabilir. Bakteriler tarafından üretilen bitki büyümesini teşvik açısından sorumlu 2-3 bütandiol ve aceotin gibi uçucu maddelerin yeni keşfedilmiş bir mekanizma olduğu görülmektedir (Ryu et al., 2003).

2.2.5.1. Endofitik bakteriler tarafından bitki büyümesinin teşvik edilmesi

Birçok araştırmalar, çeşitli endofitik bakterilerin, bitki büyümesini teşvik yetenekleri üzerinde yürütülmüştür. Bunlar, azot, fosfat ve diğer besleyiciler gibi besin ve minerallerin döngülerini iyileştirme yolu ile bitki büyümesini artırır. Bunlar

fosfat çözebilme aktivitesi (Verma et al., 2001; Wakelin et al., 2004), indol asetikasit üretimi (Lee et al., 2004) ve siderofor üretimini (Kosta and Loper, 1994) içerir. Aynı zamanda endofitik organizmalar bitkilere gerekli vitaminleri sağlayabilmektedirler (Pirttila et al., 2004). Ayrıca, endofitlere bağlanabilen bir dizi bitki büyümesi ile ilgili diğer yararlı etkiler, ozmotik ayarlama, stomaların düzenlenmesi, kök morfoloji değişikliği, minerallerin alınımını artırdığı ve azot birikimi ve metabolizmasının değiştirilmesi olarak sayılabilir (Compant et al., 2005). Son alanlar olarak bitki büyümesini teşvik eden bakteriyel endofitler, orman rejenerasyonu ve kirlenmiş toprakların fitoremediasyonu gibi gelişmekte olan alanlarda kullanılmaktadır. PGP bir çok endofitik bakteride (Zachow et al., 2010, Gasser et al., 2011; Malfanova et al., 2011) gösterilmiştir. Endofitik aracılığıyla doğrudan PGP, çok bitkiye gerekli besinleri sağlayan ve fitohormonlar üretimi ve/veya düzenlenmesine dayanmaktadır. Sudan sonra nitrojen bitkisel üretimi için önemli bir sınırlayıcı bileşiktir. Birçok bitki azotu bilinen BNF (biyolojik azot fiksasyon) süreç yoluyla elde edebilirler. Baklagiller tarafından BNF kök nodül olan azot bağlayıcı bakterilerle simbiyozda dayanmaktadır. Diğer önemli tarımsal bitkilerde örneğin mısır, pirinç, şeker kamışı ve buğday, çeşitli endofitik diazotroflarla işbirliğinden yararlanmaktadırlar. En iyi incelenmiş endofitik diazotroflar *Azoarcus*, *Burkholderia*, *Gluconobacter*, *Herbaspirillum* ve *Klebsiella* üyeleridir (James, 2000). Endofitik diazotrofların bitkilerde N₂ fiksasyonu için yeteneği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Bu endofitik aşamasında azot fiksasyonu, hücrelerinde nitrojenaz genlerin ekspresyonunu izleyerek (Egener et al., 1999; Roncato-et Maccari et al., 2003; Sen et al., 2005) veya izotop analizi ile (Sevilla et al., 2001; Elbeltagy et al., 2001) yapılmıştır. 15N₂ birleşme deneylerinin gösterdiğine göre, *G. diazotrophicus* Pal5 ile inoküle edilen şeker pancarı bitkilerinde 24 saat sürede toplam N BNF'de % 0.6 kadar, (Sevilla et al., 2001) bu değer *Herbaspirillum* sp. B501 barındıran pirinç bitkileri için % 0.14 kadar (Elbeltagy et al., 2001) olması, diazotrofik endofitlerin bir bitkiye önemli miktarda N katkısı olduğunu göstermektedir. Diğer çalışmalar bitkiler gerekli azotun % 70 BNF yoluyla endofitik diazotroflar aracılığıyla alabileceğini ileri sürmüştür (James, 2000).

Azot tespiti oksijen konsantrasyonu ve azot mevcudiyeti ile düzenlenmektedir. *Herbaspirillum* sp. B501'de nitrojenaz ekspresyonunun serbest havada (% 21 O₂) bastırılması ve microoksik (microoxic) koşullar altında tetiklenmesi (% 2 O₂) (Sen et

al., 2005) bitki için BNF'ye için uygun bir ortam olduğunu düşündürmektedir. Sevilla et al., (2001) *G.diazotrophicus* Pal5 vahşi tipi ile inoküle yapılmış şeker kamışı bitkilerinin N-eksikliği koşulları altında, sürgün kütlesi ve N içeriğinin inoküle edilmiş N₂ sabitleştirmesi yapamayan mutant bitkilere göre anlamlı derecede yüksek olduğu göstermiştir. BNF muhtemelen PGP'ye neden olması N açlığının bitki IAA hormone (indol - 3 - asetik asit) biyosentez baskılanmasının durdurulmasını açıklamaktadır. Örneğin, Brandi et al., (1996), azot sınırlayıcı koşulları altında *Erwinia herbicola* 299R kültüründe IAA sentezinin supernatantta 10-kat daha fazla olduğunu göstermiştir. IAA *G. diazotrophicus* kültürünün supernatantında tespit edilmiştir (Fuentes-Ramirez et al., 1993; Bastian et al., 1998). Bu nedenle, büyük olasılıkla bazı diazotrofik bakteriler özellikle IAA içinde hem N sağlayarak ve hem de fitohormonlar üreterek bitki büyümesini teşvik etmektedirler. IAA *in vitro* üretimi ve bitki gelişiminin artışı diğer pek çok endofitik bakterilerde de bildirilmiştir (Rothballer et al, 2008; Govindarajan et al, 2008; Jha and Kumar, 2009; Malfanova et al., 2011). Ancak, mutasyon çalışmaları kullanılarak, IAA'nın PGP'de başlıca rolü, sadece kök bakterileri için doğrulanmıştır (Patten and Glic, 2002) Gingseng bitkilerinden ön-madde olarak triptofan ilave edilmiş besleyici sıvı içinde IAA önemli miktarlarda üreten on iki endofitik bakteri izole edilmiştir (Thamizh et al., 2010).

Hung et al., (2007) tarafından yabani ve kültür soya fasulyesi çeşitlerinin kök, gövde ve nodüllerinin sterilize yüzeyinden endofitik bakteri izole edilmiştir. Dokuz izolat dışında, kalan tüm 56 endofit, G. Max'den IAA üretimi gözlenmiştir. Onbeş izolattan ön-madde triptofan varlığında 25 µg/ml'den fazla IAA üretilmiştir.

Vetrivelkalai et al., (2010) ondokuz endofitik bakteri izolatları ile tohum bakterizasyonunda, dört izolat yanı EB3, EB16, EB18 ve EB19 çimlenme yüzdesi, sürgün ve kök uzunluğu vigorite indeksi rulo havlu ve saksı kültür metotları ile anlamlı ölçüde arttığını bildirmişlerdir.

Tüm 18 endofitik bakteri izolatu Gujarat'ın farklı bölgelerinden toplanan domates (*Lycopersicon esculentum*) bitkilerinden ki kök ve gövdelerinden izole edilmiş önemli miktarda IAA üretimini sergilemiştir (Patel et al., 2012).

Birçok IAA üreten endofitler bitkinin etilen seviyesini düşürmekten sorumlu ACC (1-aminosiklopropan-1-karboksilat) - deaminaz aktivitesine sahiptir (Long et al., 2008). Bazı streslerden dolayı etilenin yüksek seviyelerinin kök uzaması ve yanal kök ortaya çıkmasını engellediği bilinmektedir (Ivanchenko et al., 2008). Glick, (2005) tarafından önerdiği modele göre, bakteril IAA aktivitesi, ACC, etilenin ön-maddesi, üretimi ile sonuçlanır. Bazı bakteriler birbesin kaynağı olarak ACC kullanmakta ve böylece bitkilerin etilen sentezini azaltmaktadır. ACC-deaminaz aktivitesi; *Burkholderia* (Gasser et al., 2011; Sun et al, 2009) , *Herbaspirillum* (Rothballer et al., 2008) ve *Pseudomonas* (Long et al., 2008) gibi bitki büyüme-teşvik edici endofitik türleri için açıklanmıştır. Sun et al., (2009) tarafından bitki büyümesinin teşviğinde ACC-deaminaz'ın rolü bir mutasyon çalışmasıyla daha doğrulanmıştır. ACC deaminase kodlayan *acdS* geninin susturulması ile, *B.phytofirms* PsJN de kanola fideleri kök uzunluğunun % 32 azalması ile sonuçlanmıştır.

Endofitik bakteriler tarafından üretilen diğer fitohormonlar şunlardır, ABA (abscissik asit) (Cohen et al., 2008), sitokininler (Sgroy et al., 2009) ve Gb'ler (gibberellinler) (Lucangeli and Bottini, 1997; Malfanova et al., 2011). Mısırın GB üreten endofitik *Azospirillum* spp. ile inokülasyonu, bitki köklerinde GA3 düzeyini arttırmış ve bitki büyüme promosyonu ile sonuçlanmıştır (Lucangeli and Bottini, 1997). ABA üreten *Azospirillum* straini ile *A. thaliana* inokülasyonundan sonra ABA içeriğinde bir artış gözlenmiştir (Cohen et al., 2008).

Endofitik bakteriler fosfatları çözebilme kapasitesine sahiptir ve soya fasulyesinde endofitik bakterilerin aynı zamanda, fosfata asimilasyonuna katılabilir olması araştırmacılar tarafından önerilmiştir (Kuklinsky-Sobral et al., 2004).

Lond et al., (2008) tarafından yetmiş yedi endofitik bakteri izolatu, Jena, Almanya'da iki farklı yerli ortamlarında büyüyen siyah it üzümü bitkilerin (*S. nigrum*) kök, gövde ve yapraklardan izole edilmiş ve altı izolatin organik fosfat çözebildiği belirlenmiştir.

Thamizh et al., (2010) tarafından Gingseng bitkilerden izole edilmiş 18 Endofitk arasından 9'u fosfat çözebilme yeteneğine sahip olduğunu ve glükozun tek

karbon kaynağı olarak hücre dışı çökmüş trikalsiyum fosfat çözülmesinin tespit edildiğini bildirmiştir.

Patel et al., (2012) domatesten elde edilen 18 endofit arasından 8'inin fosfat çözülebilirlik aktivitesini göstermiştir. Sonuçlar PGPR strainlerin çoğunluğunda fosfat çözücü etkinliğinin var olduğunu göstermiştir.

Kumar and Jha, (2007) *Typha australis*' da 10 izolatdan, yedi endofitik izolatın, endofit kültür süzuntüsü içinde IAA varlığını saptamış ve IAA üretimi için pozitif olduğu rapor etmiştir.

Harish et al., (2008) muz ve mısır bitkilerinin köklerinden kırk endofitik bakteri izolatı elde etmiş ve bitki büyümesinin teşviki üzerine etkinliğini değerlendirmiştir. EPB5, EPB22 ve EPB31 endofitik bakteriyel izolatlarının, önemli ölçüde rulo havlu ve saksı kültür metotları ile çeltik fidelerinin Vigorite indeksini arttırdığı bulunmuştur. Maksimum Vigorite indeksi (5002), EPB22 süspansiyonu ile muamele edilmiş çeltik fidelerinde ve ardından EPB5'te (4680) kaydedilmiştir. Oysa en düşük vigorite indeksleri (791) muamele edilmemiş kontrolde kaydedilmiştir. Rhizobacterial strainler PF1 ve CHA0 sırasıyla 4528 ve 4298 gibi yüksek bir Vigorite indeksi kaydedilmiştir.

2.2.5.2. Bitki patojenlerinin endofitik bakterilerle biyokontrolü

Endofitik bakteriler belirli patojenik organizmaların zararlı etkilerini azaltabilir veya önleyebilir. Fungal, bakterial, viral kökenli hastalıklar ve hatta bazı durumlarda böcek ve nematodların neden olduğu hasarlar, önceden endofitle inokülasyon yapılırsa, azaltılabilir (Sturz et al., 2000; Berg and Hallmann, 2006). PGPB aracılığıyla patojenlerin geniş bir spektrumuna yaygın olarak bilinen biyokontrol mekanizmaları: ekolojik niş ya da substrat için rekabet, inhibitör allelo kimyasalların üretimi, (Bloembergen and Lugtenberg, 2001) ve/veya konukçu bitkilerde abiyotik streslerde sistemik dayanıklılığın (ISR) indüksiyonu sayılabilir.

Bir bitki hastalığını engelleyen endofitlere ilişkin ilk kayıt bir fungus olan *Epichloe typhina* ile infekte Timothy (*Phleum pratense*) bitkilerinde *Cladosporium*

phlei fungusuna karşı dayanaklılığın gözlenmesi Shimanuki, (1987) tarafından yapılmıştır. Bazı durumlarda, endofitler fide çıkışını hızlandırmakta ve olumsuz koşullar altında bitkinin korumasını teşvik etmekte ve bitki büyümesini / gelişmesini artırmaktadır (Pillay and Nowak, 1997).

Ayrıca, çok sayıda antagonistik endofitik bakteri türleri bir limon çeşidinde (*Citrus jambhiri*) köklerinin ksileminden, kök patojenlerine karşı izole edilmiştir . Bunlar arasında *Achromobacter* sp., *Acinetobacter baumannii*, *A. lwoffii*, *Alcaligenes-Moraxella* sp., *Alcaligenes* sp., *Arthrobacter* sp., *Bacillus* spp., *Burkholderia cepacia*, *Citrobacter freundii*, *Corynebacterium* sp., *Curtobacterium flaccumfaciens*, *Enterobacter cloacae*, *E. Aerogenes*, *Methylobacterium extorquens*, *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Pseudomonas* spp. sayılabilir (Araújo et al., 2001; Lima et al., 1994).

Endofitik bakterilerin biyokontrol etkisi, iyi bilinmekteyken (Berg and Hallmann 2006; Scherwinski et al., 2008; Malfanova et al., 2011), biyokontrol mekanizmaları daha az aydınlatılmıştır. Fitopatojen mikroorganizmaların biokontrolü antibiyozis, besin ve yer için rekabet ve ISR gibi çeşitli mekanizmalara dayanabilir. Şimdiye kadar, bitkilerde endofit aracılığıyla biyolojik kontrolde sadece ISR'nin rolü teyit edilmiştir. Bu teyit, bitki içinde endofitin kendisinin bulunmadığı yerlerde hastalık belirtilerinin azalması ve ISR ile ilişkili morfolojik değişikliklere neden olduğunun mikroskopik gözlemleri ile kanıtlanmıştır. Örneğin, Melnick et al., (2008) bazı *Bacillus* spp.nin kakao bitkilerini kolonize etme yeteneğini değerlendirmiş ve *Phytophthora capsici*'nin neden olduğu siyah kök çürüklüğü belirtilerini azaltabilmiştir. Bakterilerin küçük bir alt popülasyonunun (% 5-15), sadece yaprağın iç dokularından geri kazanılmış olması, vasküler dokularda veya yeni gelişmiş yapraklarda daherhangi bir bakteri saptanmamış olması nedeniyle bakterilerin bitkide sistemik biçimde kolonize olamadığı belirtilmiştir. İnokülasyondan 26 gün sonra, yeni gelişmiş ve endofitik bakterinin kolonize omadığının saptandığı yapraklarda etkili bir biyokontrolün gözlenmesi, kakao bitkilerinde *Bacillus* tarafından sistemik dayanaklılığının uyarıldığını göstermiştir.

Biyokontrolde etkili olan endofitlerle bitkilerin kolonizasyonu, bitki patojenlerinin potansiyel saldırı yerlerinde hücre-duvarında kaloz, pektin, selüloz ve

fenolik bileşiklerinin birikmesi gibi yapısal bir bariyer oluşumunu uyarmaktadır (Benhamou et al., 2000; Benhamou et al., 1998). Patojen ile rekabet eden bakterize olmuş bitkilerin başka bir ortak yanıtı, peroksidazlar, kitinazlar ve β -1,3-glukanaz gibi savunma ile ilgili proteinlerin indüksiyonudur (Fishal et al., 2010). Buna, *Pythium*'la infekteli salatalık bitkilerinde patojen fungusun hifsel büyümesinin, oomiset inokülasyonundan beş gün sonra kökün dış dokusunda ciddi şekilde sınırlanması örnek olarak verilebilir (Benhamou et al., 2000). Ayrıca, köklere nüfuz etmeye çalışan oomiset hiflerinin % 80'i epidermis bariyerlerinde bozulmuştur. Buğday bitkisinin *B. subtilis* ile (Liu et al., 2009), muz bitkisinin ise patojen uygulamasından 72 gün önce *Pseudomonas* ve *Burkholderia* ile muamele görmesi (Fishal et al., 2010) sonucunda endofitik olarak kolonize edilmesinin hastalığın baskılanmasında önemli olduğu bildirilmiştir.

Büyük olasılıkla, endofitik bakteriler aracılığıyla çeşitli biyolojik savaş mekanizmaları kombinasyon şeklinde iş görmektedir. Bu düşünce bazı antimikrobiyal bileşiklerin hem antibiosis ve hem ISR'nin tetiklenmesiyle ilgili olması gerçeği ile desteklenmektedir (Ongena et al., 2007).

Endofitik bakteriyel biyolojik ajanları iki gruba ayrılabilir: (i) yoğun bir şekilde bitki iç dokularını kolonize eden ve yer için yarışan, antibiosis veya her iki şekilde patojenleri bastıran strainler, ve (ii) öncelikle kök korteksini kolonize eden, ve bitkinin savunma/dayanaklılık mekanizmalarını uyaran strainler. Bitkilerin daha geniş ve sürekli kolonizasyonu birinci tip endofitler için gerekli olabilir, çünkü patojen propagülü ile karşılaşma rastlantısal antagonizm için gerekli olacaktır.

Backman et al., (1997), göre Biyolojik kontrol ajanları olarak (BCAs) endofitlerin etkinliği birçok faktöre bağlıdır. Bu faktörler şunlardır: konukçuya özgülleşme, popülasyon dinamikleri ve konukçu kolonizasyon modelleri, konukçu dokuları içinde hareket yeteneği ve sistemik dayanıklılığı uyarma yeteneği.

Jetiyanon, (1994) serada endofit tarafından kolonize olan lahanada savunma mekanizmalarını uyarma yolu ile sezon boyunca tarlada Siyah çürüklük hastalığının azaldığını belirtmiştir. Endofitlerle muamele görmeyen lahana bitkilerinde *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris* inokülasyonundan yaklaşık 33 gün sonra

tipik hastalık belirtileri gözlenirken, bitkiler 9.0 cfu/mL yoğunluğunda düşük virulent *X. campestris* pv. *campestris* straini veya uyumlu olmayan patojen *X. campestris* pv. *malvacearum* ile muamele edildiğinde hastalık yavaş ilerlemiştir. Endofit tarafından kolonize olan lahana bitkileri *X. campestris* pv. *Campestris* inokulasyonundan yaklaşık 50 gün sonrasına kadar hastalığın ekonomik zarar eşiğine ulaşmaması nedeniyle hasat edilmiştir.

Birçok bakteriyel endofitin bitkilerin sağlığını iyileştirdiği ve büyümeyi desteklediği bildirilmiştir (Hallmann et al., 1997) ve bu nedenle biyolojik kontrol ajanları için önemli kaynak olabileceği öne sürülmüştür. Örneğin, *Pseudomonas* sp.nin çeşitli izolatları, *Curtobacterium luteum* ve *Pantoea agglomerans*'da dahil olmak üzere çok sayıda endofitik bakteri tarafından *Erwinia caratovora*'nın bitkileri enfeksiyonu önlenmiştir (Sturz et al., 1999). Meşe solgunluk patojeni *Ceratocystis fagacearum*'a karşı meşe ağacından biyolojik olarak aktif endofitik bakteriler izole edilmiştir (Brooks et al., 1994). Ayrıca, Wilhelm et al., (1997) sağlıklı kestane ağaçlarının ksilem öz suyundan izole ettikleri *Bacillus subtilis* strainlerinin kestane kanseri etmeni *Cryphonectria parastica*'ya karşı antifungal etki gösterdiğini kanıtlamışlardır.

İlginç bir şekilde, patates yumrularından izole edilen ve patojen gelişimini önleme yeteneği olan endofitik bakteriler, konukçu bitkinin içinde kolonize olarak patojenin enfeksiyonunu azaltmıştır. Bu konukçu içindeki yaşam alanına bakteriyel adaptasyonların oluşumunda doku tipi ve dokudaki spesifik yerlerin olmasının rol oynadığı öne sürülmüştür (Struz et al., 1999). Örneğin, soğanda endofit olan *Pseudomonas* sp. strain PsJN, *Botrytis cinerea*'yi önlemiş ve asmalarda da kolonize olarak asmanın büyümesini teşvik etmiştir, böylece endofitlerin farklı konukçularda da kolonize olabileceği gösterilmiştir (Barka et al., 2002). Birden çok konukçunun birçok endofit türü ile kolonize olduğu gözlenmiştir. Örneğin: *Pseudomonas putida* 89 B - 27 ve *Serratia marcescens* 90 -166 hıyarda Cucumber Mozaik Virüsünün yanı sıra, domates ve hıyarda (Raupach et al., 1996) antraknoz ve hıyarda fusarium solgunluğunu (Liu et al., 1995) azaltmıştır.

Sturz et al., (1999) patates gövde dokulardan elde ettikleri 192 endofitik bakteri izolatu arasından 61'inin *Clavibacter michiganensis* subsp.*sepedonicus*'e karşı etkili

biyolojik ajanı olduklarını bulmuştur. Araştırmacılar *Bacillus mycoides* bacj izolatı (Bargabus et al., 2002) ve *Bacillus pumilis* 203-7 izolatının (Bargabus et al., 2004), şeker pancarında *Cercospora* yaprak lekesini bastırdığı sonucuna varmıştır. *Erwinia carotovora* ile enfekte olan patateslerde enfekte olmayan kontrol bitkilerle karşılaştırıldığında Bakteriyel endofitlerin çeşitliliğinde bir artış bulunmuştur (Reiter et al., 2003).

Belirtisiz *Xylella fastidiosa* patojeni ile enfekte turunçgil bitkilerinden sık olarak bir endofit olan *Curtobacterium flaccumfaciens* izole edilmiş ve bu endofitik bakterilerin turunçgil bitkilerinde patojenik enfeksiyona karşı yardımcı olabileceği ileri sürülmüştür (Araujo et al., 2002). Patates bitkilerden izole edilen endofitik bakteriler funguslara karşı antagonistik aktivite göstermiş (Berg et al., 2005a; Sessitsch et al., 2004) ve aynı zamanda *Erwinia* ve *Xanthomonas* cinsine ait olan bakteriyel patojenleride engellemiştir (Sessitsch et al., 2004). Bazı endofitik bakteri izolatları *in vitro*'da antibiyotik ve siderofor üretmiştir (Sessitsch et al., 2004).

Meşe solgunluk patojeni *Ceratocystis fagacearum*'un engellenmesi için test edilen 889 endofitik bakteriden 183 izolat başarılı bulunmuştur (Brooks et al., 1994). Rizosferde, fillosfer, endosphereve endorhizadan toplam 2.648 bakteriyel izolat incelenmiş ve Brassica tohumunda *Xanthomonas* sp.'ya karşı oldukça etkili antagonist olan tek bir kök endofiti *Serratia plymuthica* olmuştur (Berg et al., 2005 b). Endofitik Actinobacteria'lar buğdaydaki patojenik fungus *Gaeumannomyces graminis*'de etkili antagonistlerdir (Coombs et al., 2004) ve bu endofitlerden bazıları *Rhizoctonia solani*'ya karşı da antagonizm göstermiştir (Parmeela and Johri, 2004).

Aravind et al., (2009) karabiberde *Phytophthora capsic*'ye karşı endofitik bakteriler izole etmiş ve sera denemelerinde hastalığı % 70 engellenen üç izolat bulunmuştur. Bu endofitik bakteriler kara biber *Phytophthora* gövde (Foot) çürümesine karşı biyolojik kontrol için etkili antagonist endofitler olarak tespit edilmiştir.

ISR'yi tetikleyen endofitler bitki hücre çeperi mukavemetini güçlendirmekte, konukçu fizyolojisi ve metabolik yanıtları değiştirmekte ve patojenlerin saldırısına ve/veya abiyotik stres faktörlere karşı bitki savunma kimyasallarının sentezinin artışına yol açmaktadır (Nowak and Shulaev, 2003). Domatesin endofitik *P.*

fluorescens WCS417r ile aşılmasından sonra, epidermal veya hipodermal hücreleri kolonize olduğu zaman kortikal hücre duvarlarının birinci tabakası dış teğetsel ve radyal tarafının dıştaki parçasının kalınlaşması meydana gelmiştir (Duijff et al., 1997).

Bakterize olduktan sonra patojeniyle karşılaşan ve uyarılan bir bitkide, yanıtın tipi patojenin saldırı yerinde fenolik bileşiklerin birikmesi ve kaloz çökmesi sebebiyle kalınlaşmış hücre duvarı papillaları gibi yapısal engeller oluşumu ile sonuçlanmıştır (Benhamou et al., 1998). Bitkilerde biyokimyasal ve ya fizyolojik değişikliklere örneğin ek olarak PR-1, PR-2 gibi patogenezis ile ilişkili proteinlerin (PRproteinler) sentezi, kitinazlar ve bazı peroxidazların birikimi de gözlenir (M'Piga et al., 1997).

Kloepper et al., (2004) *B. subtilis* GB03 izolatu, *B. amyloliquefaciens* IN937a izolatu ve *B. Subtilis* IN937b izolatu, kitosan ile birlikte kombinasyonunun domates, dolmalık biber, hıyar ve tütünde anlamlı ölçüde büyümeyi artırdığı ve uyarılmış dayanıklılığı teşvik ettiğini bildirmiştir.

Melnick et al., (2008) tarafından sebze bitkilerinden izole edilen dört *Bacillus* sp. Kakao fidelerini kolonize etme ve siyah pod çürümesi (*Phytophthora capsici*) şiddetini azaltma yeteneği yönünde değerlendirilmiştir. Test edilmiş *Bacillus* sp. 'ler arasında, *B. cereus* izolatlarından domates için BT8, patates için BP24'ün, polysilikon sürfaktan Silwet L-77 (0.24% hacim/hacim) ile birlikte uygulaması, kakao yapraklarının uzun vadeli (> 68 gün) kolonizasyonu ile sonuçlanmıştır. Bu yeni geliştirilmiş, BT8 izolatu için muhtemel hastalık baskılanma mekanizmasının uyarılmış sistematik dayanıklılık kaynaklı olduğu, yaprakları kolonize olan bitkilerle karşılaştırıldığında, yaprakları kolonize olmayan bitkilerde de hastalığın baskılanması ile açıklanmıştır (Melnick et al., 2008).

Harish et al., (2008) rhizobacterial ve endofitik bakteriyel karışımı yani EPB5+EPB22+PF1+CHA0 formülasyonları ile muamele olmuş doku kültüründe geliştirilen muz bitkilerinde, % 33.33 düzeyinde Bunchy top virüsü enfeksiyonu saptanan kontrol bitkileriyle karşılaştırıldığında, tarla koşullarında hastalığın % 60 düzeyinde azaldığını bildirmiştir.

2.2.6. Bitki endofit etkileşimlerinin genomik ve postgenomik incelenmesi

Son yıllarda, bir dizi endofitik bakterinin genomları sekans edilmiştir. Yukarıda tartışılan tüm yararlı özellikler (N fiksasyonu, IAA, ACC deaminaz, vb), endofitik bakterilerin genomlarında saptanmıştır. Ayrıca, genomlarının analizi demir alımında ve metabolizmasında görev alan çok sayıda gen varlığını da ortaya çıkarmıştır. Örneğin, *Enterobacter* sp. 638 genomunda siderofor kompleksleri için ABC taşıyıcılarından dokuz'u vardır *E. coli* K12'de dördü vardır (Taghavi et al., 2010). *Azoarcus* sp. BH72 22 demir TonB reseptör geni, serbest yaşayan toprak meslektaşı EbN1'nin, iki katı kadardır (Krause et al., 2006). Bu veriler göstermektedir ki endofitik bakteri düşük demir içeren bir ortamda hayatta kalmak için iyi donanımlıdır ve etkin bir şekilde, diğer mikroorganizmalar ile fitopatogenler de dahil olmak üzere bu element için rekabet girebilirler.

Yukarıda sözü edilen bitkiler için yararlı olan bu özelliklerden başka, QS (quorum sensing) ile ilgili bir dizi gen, endofitik genomlarında tespit edilmiştir. Örneğin, 24 luxR QS genleri *Serratia proteamaculans* 568 genomu içinde mevcut bulunmaktadır. İlgili endofitik strain olarak *S. plymuthica*'da G3 QS, kolonizasyonla ilişkili yüzme hareketliliği ve biyofilm oluşumu gibi özellikleri kontrol etmektedir (Liu et al., 2011). İlginç olarak, bazı serbest yaşayan *Serratia* spp.'de bu özellikler, QS'den bağımsızdır. QS'in kesin rolünün bakterinin yaşam tarzına bağlı olduğunu düşündürmektedir.

Başka genom analizleri, endofitik yaşam tarzı için önemli olabilecek genleri ortaya çıkarmıştır. Örneğin, diazotrofik *Klebsiella pneumoniae* (Kp) 342 genomu bitkideki ROS'a (reactive oxygen species) karşı bakteriyel hücrelerin korunmasına katılan süperoksit dismutazlar, putatif katalazlar, peroksidazlar ve redüktazlar içermektedir (Fouts et al., 2008). Ayrıca, Kp342'nin genom analizi geniş bir yelpazede bitki şekerleri, karbonhidratlar ve hemisellüloz gibi substratları metabolize etme yeteneğini ortaya çıkartmıştır. Bundan başka, bitkiden izole edilen Kp342 ile klinik izolat MGH78578'in genomunun karşılaştırması metabolizmalarında, yüzeye yapışmalarında ve salgılarında önemli bir fark ortaya çıkarmıştır. Bu veriler Kp342'nin bitki savunma reaksiyonlarından kaçabildiği ve başarılı bir şekilde bitkinin içinde kendini koruduğunu düşündürmektedir.

çeltikte bol bulunan bir endofitik bakterinin metagenomik analizi endofitler arasında paylaşılan ve bu nedenle bitkiler ile etkileşimlerinde önemli potansiyel olan özelliklerini doğrulamıştır (Sessitsch et al., 2012). Bunlar (i) pirincin endofitlerin arasında muhafaza edilmemiş tip III salgı sistemleri dışında özel salgı sistemlerinin bütün dizisi (ii), selülotik ve pektolitik enzimleri, (iii) flagelllar, (iv) ROS degradasyonuna katılan enzimler, (v) demir alım için reseptörleri ve taşıyıcıları, (vi) QS sistemleri, (vii) degradasyon için metabolik yolların bitki bileşikleri ve (viii) çok sayıda bitki büyüme teşvik ve biyokontrol özelliklerini (ACC deaminaz aktivitesi, BNF, antimikrobik bileşikleri, fitohormonların üretimi ve uçucu maddeleri) kapsamaktadır.

Metaproteomik, metaproteogenomik ve metatranskriptomik gibi böyle postgenomik yaklaşımların uygulanması, genomik potansiyelini, fonksiyonu ile bağlayabilir ve dolayısıyla bitki- endofit etkileşimlerinde daha derin bir anlam yükleyebilir. Bu araçlar mikrobiyal topluluklardan küresel proteinlerin ekspresyonu (metaproteomics) veya mRNA (metatranscriptomics) ile ilgilidir. Metaproteogenomik çevresel örneklerde proteom ve genomu bağlamaktadır. Bu, tek başına proteomike göre daha çok proteinlerin (fonksiyonlar) belirlenmesini sağlar. Son zamanlarda, metaproteogenomik yaklaşım pirinç phyllosfer ve rizosferinde mikroorganizma topluluklarını incelemek için kullanılmıştır (Knief et al., 2011). Sonuçlar her iki mikroortamlardan *nifH* genlerinin varlığına rağmen dinitrogenase redüktazın sadece rizosferde tespit olunduğunu göstermiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1. Test Bitkisi

Çalışmada test bitkisi olarak hıyar (*Cucumis sativus*) bitkisi kullanılmıştır. hıyar bitkisinin çeşidini seçmek amacı ile standart çeşitlerden Çengelköy, hibrit çeşitlerden ise Gordion F1 ve Sardes F1 çeşitleri kullanılmıştır.

3.1.2. Test Patojeni

Doktora çalışması kapsamında hastalık belirtisi gösteren hıyar bitkilerden izole edilenler ile E.Ü.Z.F. Bitki Koruma Bölümü mikoloji laboratuvarı stoklarında bulunan izolatların yanı sıra, Belçika'dan ve Yunanistan' dan temin edilen FOC izolatları patojenisite testlerine tabi tutulmuştur. Bu testlerin sonucunda en yüksek virülense sahip olduğu belirlenen FOC izolatının kullanılmasına karar verilmiştir.

3.1.3. Endofitik Bakteriler

2011 ve 2012 yıllarında İzmir, Antalya ve Mugla ili ve çevresinde hıyar yetiştirme dönemlerinde açık ve örtü altı kabakgil yetiştirilen alanlarda sörveyler yapılmıştır. Bu sörveyler sırasında tarla ve serada yetiştiriciliği yapılan kabakgilerden endofitik bakteriler (EB) izole edilmiştir.

3.1.4. Çalışmada Kullanılan Besi Yerleri

Çalışmada EB'lerin izolasyonunda, stok olarak uzun süreli saklamada, inokulum üretiminde, popülasyon takibi ve etki mekanizmalarının tespitine yönelik çalışmalarda ve patojenin bitki içinde izlenmesinde Çizelge 3.1-3.6'de belirtilen çeşitli besi yerleri kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. Bakteri izolasyonu, pigment oluşumu ve genel besi yeri olarak kullanılan King B ortamı için gerekli kimyasallar ve miktarları

King's B (King, et al., 1954)	Kimyasal	Miktar
	Pepton	20 g
	K ₂ HPO ₄	1,5 g
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,5 g
	Gliserol	10 ml
	Agar	16 g
	121°C'de 20 dk. Otoklavlanır.	

Çizelge 3.2. EB'lerin stok olarak saklanması için kullanılan glycerol içeren NB ortamı ve gerekli kimyasallar ve miktarları

NUTRIENT BROTH (NB + 15% glycerol (100 ml))	Kimyasal	Miktar
	Nutrient Broth	0.8 g
	Destile su	85.0 ml
	glycerol	18.75 g

Çizelge 3.3. FOC'un izolasyonun'da ve populasyon takibinde kullanılan seçici Komada ortamı için gerekli kimyasallar ve miktarları

Komada Besi ortamı (Komada,1975)		
Temel besi yeri	Kimyasal	Miktar
	K ₂ HPO ₄	1.0 g
	KCL	0,5 g
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5 g
	F ₃ NaEDTA	0.01g
	L Asparagine	2g
	D Galactose	20g
	Agar	15 g
	Destile su	1 litre
121°C'de 15 dk. otoklavlanır ve PH %10'luk Fosforik Asit'le 3.8±0.2 ayarlanır		

Çizelge 3.3.' un devamı

Antimikrobiyal katkıları	PCNB Terrachlor	1g
	Oxgall	0.5g
	Na ₂ B ₄ O ₇ .10H ₂ O	1g
	Streptomycin sulfate	0.3g
	Destile su	10ml
55°C'ye soğutulmuş temel besi yerine ilave edilir		

Çizelge 3.4. FOC'un izolasyonun'da ve popülasyon takibinde kullanılan seçici Malachit Green Agar (MGA) ortamı için gerekli kimyasallar ve miktarları

MGA Besi ortamı	Kimyasal	Miktar
	Pepton	15g
	KH ₂ OP ₄	1.0 g
	MgSO ₄ 7H ₂ O	0,5 g
	MG oxalat	0,0025g
	Agar	20 g
	Destile su	1 litre

Çizelge 3.5. EB'lerinin siderefor oluşturma yeteneklerinin belirlenmesinde kullanılan Blue-CAS Agar besi yeri

İzolatların siderefor üretimlerini belirlemek için CAS AGAR (1 litre besi ortamı)		
Blue -CAS Agar (Klement, et al., 1990)	1. solüsyon (casamino asit solusyonu)	1.) 60.5 mg chrome azurol S (CAS) (50ml saf su içinde çözüldü)
		2.) 10 ml Demir (III) solusyonu (1 mM FeCl ₃ .6H ₂ O(0,027g/100ml10 mM HCl), 10 mM HCl (0,036g/100ml)içinde çözülür)
		3.) 72.9 mg HDTMA (40 ml su içinde çözüldü, 1 ve 2 basamağa eklenir)
		Koyu mavi süspansiyon Otoklavda sterilizasyonu 121°C / 15 dk.
	Free asid solüsyonu (750 ml suda)	30.24 g Pipes(Free asit)
		12 g NaOH (50% (w/v)
		3 g/l KH ₂ PO ₄ (0,3 g/100ml)
		5g/l NaCl (0,5 g/100ml)

Çizelge 3.5.' in devamı

	Tuz solüsyonu (toplam 100 ml)	10 g/l NH_4Cl (1 g/100ml)
		20 mM MgSO_4 (0,492 g/100ml)
		1 mM CaCl_2 (0,110 g/100ml)
		15 g Agar
		Free asit ve Tuz solüsyonları karıştırılarak 121°C 'de 15 dk. Otoklav da sterilize edilir.
	Filtre ile steril edilecek	10 ml (% 20'lik Sukroz veya Gulukoz solüsyonu - 4 g/ 20ml Destile su-)
		Casamino acid 30ml (%10 w/v) 4g/40ml su flitre
	İsteğe bağlı diğer	Antibiyotik v.b

Çizelge 3.6. EB'lerinin Fosfataz aktivitelerini belirlemek amacıyla kullanılan NBRIP Agar besiyeri için gerekli kimyasallar ve miktarları.

Fosfataz aktivitesin belirlenmesi için kullanılan NBRIP besiyeri (1 L için)		
NBRIP Agar (Nautiyal, 1999)	Kimyasal	Miktar
	Glucose	10 g
	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	5 g
	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.1 g
	KCl	0.2g
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.25 g
	$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	5 g
	pH 7,0' ye ayarlandı.	
	Agar	15 g
	121 °C de 20 dk. Otoklavlandı.	

3.1.5. Yetiştirme Ortamları

İklim odasında yürütülen çalışmalarda kullanılan bitkilerin yetiştirme ortamı

olarak steril torf kullanılmıştır. Cam Serada Topraksız tarım sisteminde substrat kültürü materyali olarak perlit kullanılmıştır.

3.1.6. Bitki besin solüsyonları

Hıyar yetiştiriciliği için gerekli besin elementleri Gül ve ark. (2000)'nın belirttikleri oranlarda ve yöntemde hazırlanarak uygulanmıştır.

Çizelge 3.7. Topraksız tarım sisteminde hıyar yetiştiriciliğinde gelişme dönemlerine göre kullanılan besin solüsyonu

Besin Elementleri	Solüsyon	
	1-4. Hafta	5-10. hafta
Kalsiyum Nitrat- $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	600 gr/m ³	600 gr/m ³
Sequestrene (EDTA) - $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$	20 gr/m ³	20 gr/m ³
Potasyum Nitrat- KNO_3	750 gr/m ³	950 gr/m ³
Magnezyum Sülfat- MgSO_4	500 gr/m ³	550 gr/m ³
MESS	100 ml/m ³	100 ml/m ³
Fosforik Asit - H_3PO_4	90 ml/m ³	100 ml/m ³
Nitrik Asit- HNO_3	100 ml/m ³	110 ml/m ³

Çizelge 3.8. Topraksız tarım sisteminde hıyar yetiştiriciliğinde kullanılan Mikro besin solüsyonu

MESS (Mikro Element Besin Solüsyonu)	
Mangansülfat- MnSO_4	23 gr/L
Boric Asit- H_3BO_3	22,5 gr/L
Çinkosülfat- ZnSO_4	22 gr/L
Bakırsülfat- CuSO_4	4 gr/L
Amonyummolibdat- $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$	1 gr/L

3.1.8. Moleküler çalışmada kullanılan primerler

EB'lerin moleküler tanısında 16 s rRNA bölgesine spesifik FD1/RP2 ve 27F/1492R primer çiftleri (Jiang et al., 2006; Weisburg et al., 1991) kullanılmıştır.

Çizelge 3.9. EB'lerin moleküler tanısı için kullanılan 16 s rRNA primerlerin listesi ve Teremal cycler çalışma koşulları

Fd1 / Rp2 (Weisburg,1991)	Forwardprimer (5'–3')		Reverseprimer (5'–3')		Amplicon uzun.(bp)
	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG		ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT		1400
27F/1492R (Jiang,2006)	AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG		GGT TAC CTT GTT ACG ACT T		1460
Teremalcycler çalışma koşulları					
1 döngü	35 döngü			1 döngü	1 döngü
95 °C	94 °C	55°C	72 °C	72 °C	15 °C

3.1.9. Bitki uyarıcısı olarak kullanılan kimyasal

Çalışmada bitki aktivatörü olarak Syngenta Firması tarafından üretilen ticari ismi ASM MX 44 WG (%4 acibenzolar-S-methyl) (ASM) olan preparat kullanılmıştır.

3.1.10. Bitki yetiştirme koşul ve ortamı

Hıyar bitkileri ile yapılan çalışmalar, E.U Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma ve bahçe bitkileri bölümleri, ayarlanabilir sıcaklık ve ışık sistemine sahip bitki büyüme odaları ile cam sera koşullarında otomatik nem ve sulama sistemine sahip topraksız tarım serasında yürütülmüştür. Diğer çalışmalar, E.U Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü Bakteriyoloji laboratuvarında yapılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Çalışmada kullanılan endofitik bakterilerin izolasyonu:

3.2.1.1.Örnekleme

2011 ve 2012 yıllarında İzmir, Antalya ve Muğla ili ve çevresinde hıyar yetiştirme dönemlerinde açık ve örtü altı kabakgil yetiştirilen alanlarda sörveyler yapılmıştır. Bu sörveyler sırasında tarla ve serada yetiştiriciliği yapılan kabakgillerden solgun hıyar bitkilerinin yakın çevresinde sağlıklı bitkilerin kök, gövde ve yapraklarından örnekler alınmıştır.



Şekil 3.1. Sörvey alanlarında örtü altı ve tarlada solgun hıyar bitkilerinin yakın çevresinde sağlıklı bitkilerin kök, gövde ve yapraklarından örneklerin alınması

3.2.1.2 EB'lerin izolasyonu

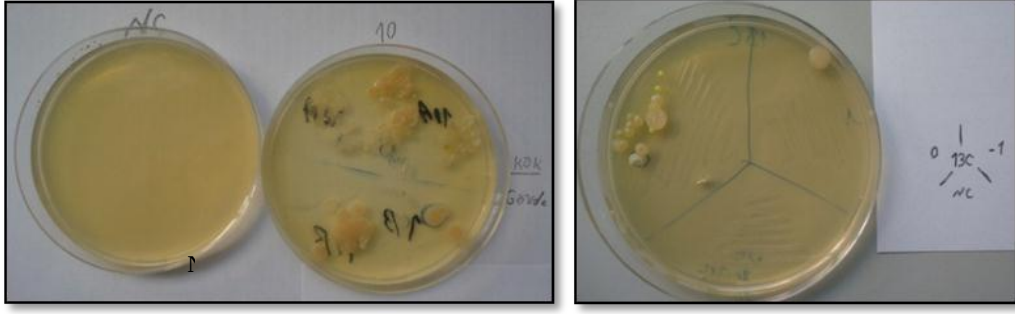
Sörvey alanlarında belirlenen sağlıklı bitkilerin kök, gövde ve yapraklarından örnekler alınarak laboratuvara getirilmiş ve aşağıdaki protokol izlenerek endofitik bakteriler izole edilmiştir:

1-2 cm büyüklüğünde kesilerek hazırlanan kök, gövde ve yaprak örnekleri (Şekil 3.2), Tween 20 (polyoxyethylene sorbitan monolaurate) ilave edilmiş % 5 oranında hazırlanmış Sodyum Hipoklorite daldırılarak 10 dk, daha sonra % 70'lik Ethanol'e aktarılarak 5 dk bekletilmiş ve üç kez steril distile su ile durulanarak Alkol ve Sodyum Hipoklorit uzaklaştırılmıştır. Hazırlanan örnekler steril kurutma kağıtlarında kurutulmuştur.



Şekil 3.2. 1-2 cm büyüklüğünde kesilerek EB izolasyonu amacıyla yüzey dezenfeksiyonu için hazırlanan kök, gövde ve yaprak örnekleri

Yukarıda belirtilen işlemlerden sonra, bitki örneklerinin üzerindeki epifitik bakterilerden tamamen arındığından emin olmak için; üçüncü durulama işleminde kullanılan steril distile sudan 0.1 ml alınarak Tryptic Soya Agar (TSA) ortamına yayılarak 24 °C inkübasyona bırakılmıştır. 48 saat sonunda herhangi bir bakteriyel gelişmenin olmaması durumunda yüzey dezenfeksiyonunun başarılı bir şekilde yapıldığına karar verilmiştir (Şekil 3).



Şekil 3.3. Yüzey dezenfeksiyonunun kontrolü: (A: solda- üçüncü durulama suyundan 0.1 ml alınarak ekim yapılması sonucunda herhangi bir epifitk bakteriyel gelişme olmaması (NC); sağda- ise kök ve gövde kesitlerinden imprinting yöntemi ile yapılan izolasyon sonucunda yoğun EB gelişmesi izolasyon işleminin başarısını göstermektedir. B: Benzer şekilde yapraktan tritürasyon yöntemi ile izolasyon sonrası farklı seyreltme basamaklarında EB kolonileri gözlenirken petrideki NC bölümünde son yıkama suyundan yapılan ekimde hiçbir bakteriyel gelişme olmaması)

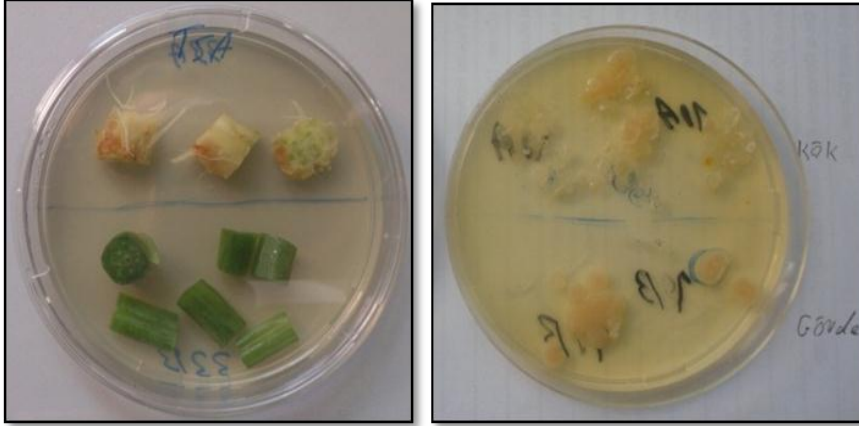
Hazırlanan bitki dokularından endofitik bakteri izolasyonu için dokulara göre iki yöntem kullanılmıştır: tritürasyon yöntemi ve imprinting yöntemi

Tritürasyon yöntemi nde yapraklar steril fosfat buffer tuz solüsyonunda (NaCl , 8 g/l; KH_2PO_4 , 0,2 g/l; NaHPO_4 , 1,1 g/l; KCl , 0,2 g/l; pH 7,4) stoemaker yardımı ile ezilmiştir. Elde edile süspansiyon 10 ve 100 kez seyreltilip TSA ortamına ekilmiş ve bakteriyel koloniler gelişene kadar 24°C ' de inkübasyona bırakılmıştır (Şekil 3.4.).

imprinting yönteminde kök ve gövde kısımları dezenfekte edilip kurutulduktan sonra bir steril bistüri ile uzunlamasına 2 parçaya kesilmiştir. Parçalar aseptik koşullarda TSA ortamına aktarılmıştır. Bir saat sonra parçalar kaldırılmış ve bakteriyel koloniler gelişene kadar 24°C 'de inkübasyona bırakılmıştır (Şekil3.5.).



Şekil 3.4. Triturasyon yöntemi ile yaprakтан EB izolasyonu: (üstte - yüzey dezenfeksiyonu yapılan yaprak dokularının stoemaker yardımıyla ezilerek, seyreltme serilerinin hazırlanması. Altta - EB izolasyonu amacıyla TSA besiyerine ekimi ve farklı seyreltme basamaklarında gelişen EB kolonileri, NC: yüzey dezenfeksiyonu kontrolünde hiçbir bakteriyel gelişme olmaması EB izolasyonunun başarısını göstermektedir.)



Şekil 3.5. İmprinting yöntemi kullanılarak kök ve gövde örneklerinden EB izolasyonu. **A.** yüzey dezenfeksiyonu yapılmış kök ve gövde örneklerinin TSA besiyerine bırakılması; **B.** 1 saat sonra bu kesitlerin besiyerinden uzaklaştırılması ve kök/gövde kesitlerinde yoğun EB kolonilerinin gözlenmesi

Gelişen farklı koloniler seçilip saflaştırılmış, daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere -80°C’de ve %15 gliserol içeren nutrient broth içerisinde saklanmıştır.

3.2.2. İzole edilen endofitik bakterilerin ön tanısına dönük bazı testler:

Seçilen endofitik bakterilerden King-B (King et al.,1954) besi yerine ekim yapılmıştır. Besiyerinde geliştirilen bakterilerin koloni morfolojileri, UV’de pigmentasyonu, Gram reaksiyonları ve Tütünde hipersensitif reaksiyonu değerlendirilmiştir.

3.2.3. EB’lerin *in vitro* bitki gelişimini artırma potansiyellerinin belirlenmesi

EB’lerin *in vitro* PGPR aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla, CAS agarda siderofor üretme aktivitesi, IAA üretme aktivitesi, HCN üretme aktivitesi, Fosfataz aktivitesi gibi *in vitro* testler yapılmıştır.

3.2.3.1. Indol Asetik Asit (IAA) aktivitesi

Kökbakterilerinin IAA üretimi tryptophane (L-TRP)’ın varlığında kolorometrik olarak değerlendirilmiştir. Bu amaçla 100 ml’lik erlenlere Nutrient Broth (NB) besiyeri otoklavda sterilize edilmiştir. Hazırlanan NB besiyerine, bakteri filitresinden geçirilerek sterilize edilmiş 5 ml L-TRP (% 0,05) ilave edilmiştir. Ardından yoğunluğu 10^8 cfu/ml kökbakterisinden 100 µl eklenerek, 24 °C’de 120 rpm’de inkübasyona bırakılmıştır. Elde edilen sıvı kültür 6000 rpm’de 10 dk. edilmiş ve süpernatant alınarak Whatman (No: 2) filtre kağıdından geçirilmiştir. Elde edilen filtrat 10000 rpm’de 5dk tekrar santrifüj edilmiştir. İşlem sonunda elde edilen süpernatanttan 3 ml alınarak ayrı bir tüpe alınmış ve üzerine 2 ml Salkowski ayırıcı (2 ml 0,5 M FeCl₃ + 98 ml %35’lik HClO₄) ilave edilmiş ve 30 dk renk oluşumu için beklenmiştir. Süre sonunda spektrofotometrede 535 nm’de okunarak absorbans(Abs) değeri belirlenmiştir (Bric et al., 1991). Elde edilen Abs değerlerini µg/ml’ye dönüştürmek için farklı ppm düzeylerinde IAA süspansiyonu hazırlanarak ölçümler yapılmış ve bir küre

edilmiştir. Elde edilen kurveye göre kök bakterilerinin IAA üretimi hesaplanmıştır (Almonacid ve ark., 2000).

3.2.3.2. Fosfatı (P) çözme aktivitesi

In vitro'da endofitik bakterilerin fosfatı çözme aktivitesini test etmek için NBRIP Agar (çizelge3.6) ortamı kullanılmıştır (Nautiyai, 1999). EB'lerin bu ortamda nokta ekiminden 14 gün sonra kolonilerin çevresinde belirgin zonların oluşumuna bakılmış, zonların genişliği mm olarak değerlendirilmiştir.

3.2.3.3. Siderofor üretme aktivitesi

İzolatların siderofor üretme aktiviteleri, Blue CAS Agar ortamında (çizelge3.5) nokta ekiminden 7 gün sonra kolonilerin çevresinde oluşturdukları belirgin sarı/turuncu zonların çapı ölçülerek (mm) değerlendirilmiştir.

3.2.3.4. HCN üretiminin saptanması

Triptic Soya Agar içeren petrilere 4.4 g/l glycine içeren solusyondan 100µl eklenmiş (%10 oranında) ve bakteriler inokule edilmiştir. Petriler 24°C'de 2 gün inkubasyona bırakılmıştır. Süre sonunda %0.5 picric asit - %2 sodyum karbonat solusyonu bir parça filtre kağıdına emdirilerek petri kapağının iç yüzeyine yerleştirildikten sonra petriler ters çevrilmiş. Petriler 24°C'de tekrar 3 – 5 gün süreyle inkubasyona bırakılmış. Filtre kağıdındaki sarıdan- kahverengi turuncuya doğru renk değişikliğine bakılarak HCN üretiminin değerlendirmesi yapılmıştır. Bu şekilde renk değişikliği gözlenenler HCN pozitif kabul edilmiştir.

3.2.4. Endofitik Bakterilerin (EB) *in vitro* biyokontrol potansiyellerinin belirlenmesi

İzole edilen EB'lerin test patojeni FOC'a karşı *in vitro* biyokontrol özellikleri ikili kültür yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Karşılaştırma denemesi PDA (potato dextrose agar) içeren 90 mm'lik petri kaplarında FOC ve EB izolatu karşılıklı ekim yapılarak gerçekleştirilmiştir. Patojenin miselyal gelişimindeki engellenme %'si, petri kaplarına tek başına ekilmiş FOC'un (Kontrol) miselyal gelişme çapı ile

karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. *In vitro* testler 4 yinelemeli olarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.5 Vigorite İndeksi testi ve *in vivo* testler için EB izolatlarının seçilmesi

Tez çalışmasında izole edilen EB izolatları *in vitro* PGPR ve biyokontrol testlerindeki performansları ve çalışmada önemsenen kriterler doğrultusunda tartılı derecelendirme yöntemi ile Çizelge 3.10’de belirtilen puanlamalar dikkate alınarak seçilmeye çalışılmıştır. Örneğin, HCN üretimi çok istenmeyen bir özellik olduğu için 100 üzerinden 4 puan verilirken, *in vitro* biyokontrol önemli ve istenen bir kriter olduğu için, etkili bulunan EB izolatına 100 üzerinden 40 puan verilmiştir. Böylece; hem PGPR etkisi yüksek, hem de FOC’u başarıyla engelleyebilecek izolatların seçilmesine çalışılmıştır.

Çizelge 3.10. EB izolatlarıyla gerçekleştirilen *in vitro* testlere verilen puanlama

<i>In vitro</i> TESTLER	TEST SONUÇLARINA VERİLEN PUAN
Indol Asetik Asit (IAA) salgılama testi	12
Fosfatın (P) çözünürlüğü testi	12
Siderofor salgılama testi	32
HCN üretimi	4
<i>In vitro</i> biyokontrol etki testi	40
Toplam	100

3.2.6.Vigorite İndeksi testi

Tüm izole edilen EB’lerin arasından hem PGPR etkileri hem de FOC’a karşı biyokontrol etkileri olması koşulu dikkate alınarak tartılı derecelendirme yöntemi ile seçilen EB izolatlarına Vigorite indeksi testi uygulanmıştır.

Yıkanmış (tohum ilaçlaması yapılanlar için) ve yüzey dezenfeksiyonu yapılmış hıyar tohumları (cv. Gordion) endofitik bakterilerin 24-48 saatlik TSA’da gelişen kültüründen %1.5 CMC (10 ml / 9 cm petri kabı)’da süspanse edilerek hazırlanmış bakteri süspansiyonu ile uygulama görmüş ve 30 dakika süreyle 121 rpm’de çalkalanarak kaplanmıştır. Kaplama işleminden sonra kurutma kağıtları arasında tutulan tohumlar nemlendirilmiş steril kurutma kağıtlı petrilere ekilmiştir. Her izolat 3 petride, her petride 10 tohum olacak şekilde yinelenmiştir. Negatif Kontrol

tohumları ise sadece CMC (%1.5) çözeltisi ile kaplanmıştır. 24°C'de 7 günlük inkubasyondan sonra, çimlenme %'si, radisil ve hipokotil uzunluğu ölçülerek aşağıda belirtilen formüle göre Vigorite İndeksi hesaplanmıştır (Gerhardson et al., 1985)(Şekil 3.6.). Vigorite testleri 2 kez yinelenmiştir.

Vigorite İndeksi (VI): % çimlenme X (radicil uzunluğu + hipokotil uzunluğu)



Şekil 3.6. Vigorite İndeksi testi için hazırlık: (A. EB süspansiyonunun hazırlanması, B. 121 rpm.de 30 dakika tohum bakterizasyonu, C. tohumların kurutulması, D ve E. tohumların çift katlı, nemlendirilmiş kurutma kağıtlı petriye ekilmesi ve inkubasyona bırakılması)

3.2.7. EB izolatlarının *in vivo* koşullarda (FOC)'a karşı biyokontrol etki testleri

İn vivo biyokontrol etki testleri bitki büyüme odası ve sera koşullarında gerçekleştirilmiştir.

3.2.7.1. EB izolatlarının bitki büyüme odasında (FOC)'a karşı biyokontrol etki testleri

Yıkanmış (tohum ilaçlaması yapılanlar için) ve yüzey dezenfeksiyonu yapılmış hıyar tohumları endofitik bakterilerin 24-48 saatlik TSA'da gelişen kültüründen %1.5 CMC (10 ml / 9 cm petri kabı)'da süspanse edilerek hazırlanmış bakteri süspansiyonu ile uygulama görmüş ve 30 dakika süreyle 121 rpm'de çalkalanarak kaplanmıştır. Kaplama işleminden sonra kurutma kağıtları arasında tutulan tohumlar 24°C'de 1 saat kurumaya bırakılmıştır. Kurutulan tohumlar steril torf içeren viyollere ekilmiştir (Şekil3.7.).

Kotledon ilk gerçek yaprak aşamasına gelmiş hıyar fidelerine, sıvı TSB'da 48 h süreyle 120 rpm'de geliştirilip santrifüjle yoğunlaştırılıp pelleti elde edilen EB izolatlarının steril suda hazırlanan süspansiyonları (10^9 cfu/ml (OD600 = 0.5)) her bitki başına 20 ml olacak şekilde içirme biçiminde uygulanmıştır (Şekil3.7.).



Şekil 3.7. EB'lerin tohuma uygulandıktan sonra torfa ekilmesi ve ilk gerçek yaprak aşamasında torfa EB süspansiyonlarının uygulanması

FOC inokulumu, fungusun Potato Dextrose Broth ortamında oda sıcaklığında (25 ± 1 oC) 7 gün boyunca çalkalanarak inkube edilmesi ile üretilmiştir. Sıvı ortamda gelişen fungus kültürü steril tülbentten süzülerek hişlerinden ayrılmış ve spor yoğunluğu Thoma lamı ile ölçülerek istenen spor yoğunluğuna ayarlanmıştır. Torf materyali, 106 konidi/ gr torf oranında (Fuchs et al., 1997) FOC spor süspansiyonu ile karıştırılarak inokule edilmiştir. Gelişen 2 gerçek yapraklı aşamadaki hıyar fidelerinin kökleri hafif traşlanarak FOC ile bulaşık torfa ekilmiştir (Şekil3.8).



Şekil 3.8. FOC spor süspansiyonunun üretilmesi, torfa inokulasyonu, bitkilerin inokulasyona hazırlığı ve FOC ile bulaşık torfa şaşırtılması ve bitki büyüme odasında 6 hafta süreyle bekletilmesi

Denemeler 10 tekerrürlü ve her tekerrürde 1 bitki yer alacak şekilde TB deneme desenine göre planlanmıştır. EB'lerle uygulama görmemiş, ancak FOC ile inokule edilmiş torfa ekilmiş bitkiler Pozitif Kontrol, hiç uygulama görmemiş hıyar bitkileri ise Negatif Kontrol olarak değerlendirilmiştir. Bitkiler fidelerin şaşırtılmasından altı hafta sonra hastalık belirtilerinin görülme durumuna göre Pyung et al.(1997)' den modifiye edilmiş 0-4 skalası : (0: hiç belirti yok, 1- Bitkinin %25'inde sararma ve solma, 2-Bitkinin %50' sinde sararma ve solma, 3-Bitkide cüceleşme ,%75'inde sararma ve solma, 4-Tümüyle solmuş ya ölmüş bitki) kullanılarak değerlendirilmiştir.Elde edilen skala değerleri Townsend Heuberger formülü* yardımı ile hastalık şiddeti (%) değerlerine dönüştürülmüştür. Elde edilen hastalık şiddeti (%) sonuçları, Abbot formülü** yardımı ile kontrole göre % etki değerleri olarak hesaplanmıştır. Ayrıca, her uygulama için tekerrürlerde yer alan bitkilerin kök ve yeşil aksam yaş ve kuru ağırlıkları da tartılarak

hesaplanmış, yaprak, çiçek ve meyveler sayılmıştır. Böylece; EB uygulamalarının FOC baskısı varlığında ve yokluğunda hıyar bitkisinin büyüme parametrelerine etkisi de değerlendirilmiştir.

*Townsend Heuberger formülü :Hastalık Şiddeti (%)= $\Sigma (n \times V / Z \times N) \times 100$

n: skalada farklı hastalık derecesine giren bitki sayısı; V: skala değeri; Z: en yüksek skala değeri; N: gözlem yapılan toplam bitki sayısı

$$**\%Etki = \frac{\text{Kontroldeki hastalık şiddeti-Uygulamadaki hastalık şiddeti}}{\text{Kontroldeki hastalık şiddeti}}$$

3.2.7.2. Serada, topraksız tarım sisteminde EB'lerin FOC'a karşı biyokontrol etkisinin testlenmesi

3.2.7.1. bölümünde belirtildiği gibi EB'lerle tohum bakterizasyonu yapılan ve teril torfa ekilen hıyar tohumları kotiledon ilk gerçek yaprak aşamasına geldiğinde yine 3.2.7.1. bölümünde belirtildiği biçimde EB izolatlarının steril suda hazırlanan süspansiyonları [10^9 cfu/ml ($OD_{600}=0.5$)] ile her bitki başına 20 ml olacak şekilde içirme biçiminde uygulama görmüştür (Şekil 3.9). FOC inokulumu da, yukarıda 3.2.7.1. bölümünde belirtildiği gibi, üretilmiş ve torf materyali, 10^6 konidi/ cm^3 torf oranında FOC spor süspansiyonu ile karıştırılarak inokule edilmiştir. Gelişen 2 gerçek yapraklı aşamadaki hıyar fidelerinin kökleri hafif tıraşlanarak FOC ile bulaşık torfa ekilmiştir (Şekil 3.9).

Serada topraksız tarım sisteminde substrat olarak perlit kullanılmıştır. Bir hafta önce FOC ile inokule edilmiş torfa şaşırtılmış ve EB ile tohum bakterizasyonu, fidelere kök içirme uygulaması yapılmış hıyar bitkileri perlit içeren topraksız tarım saksılarına (18 lt hacimli, 30X40X15 cm boyutunda) şaşırtılmıştır (Şekil 3.9.). Şaşırtma işleminden hemen sonra ikinci EB kök içirme uygulaması [$(10^9$ cfu/ml ($OD_{600}=0.5$), 30 ml/bitki)] yapılmıştır. Bitkiler 3.1.6. bölümünde içeriği belirtilen besin çözeltisi ile damla sulama sistemi aracılığıyla düzenli bir program kapsamında beslenmiştir. Hıyar fidelerinin serada topraksız tarım sistemine aktarılmasından (Şekil 3.10) yaklaşık 21 gün sonra ilk hasat yapılmıştır. Ayrıca, seradaki deneme

deseninde EB uygulaması görmüş, ancak, FOC ile inokule edilmemiş bitkiler de yer aldığı için EB uygulamalarının FOC baskısı altında olan ve olmayan hıyar bitkilerinde pazarlanabilir meyve verimine etkisi de değerlendirilmiştir. EB'lerle uygulama görmemiş, ancak FOC ile inokule edilmiş torfa ekilmiş bitkiler Pozitif Kontrol, hiç uygulama görmemiş hıyar bitkileri ise Negatif Kontrol olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca, bir kimyasal sistemik dayanıklılık uyarıcı preparat olan Acibenzolar S methyl (ASM, Syngenta, %0.1) sera denemesinde karşılaştırma preparatı olarak yer almıştır. EB uygulamalarına benzer şekilde, Acibenzolar S methyl ile önerildiği şekilde yeşil aksam uygulaması hem FOC ile inokule edilmiş hem de inokule edilmemiş bitkilere yapılmıştır. Böylece, Acibenzolar S methyl uygulamasının patojen baskısı varlığında ve yokluğunda bitki gelişimi ve verime etkisi de değerlendirilmiştir. Denemeler 4 tekerrürlü ve her tekerrürde 2 saksı ve her saksıda 2 bitki yer alacak şekilde TB deneme desenine göre planlanmıştır (Şekil 3.10). Fidelerin seraya perlit ortamına aktarılmasından yaklaşık 9 hafta sonra ise deneme sona erdirilmiş ve bitkilerde 0-4 skalasına göre değerlendirme yapılarak EB uygulamalarının hıyarda *Fusarium solgunluğu*na etkisi Abbott formülüyle değerlendirilmiştir. EB uygulamalarının ve kimyasal sistemik dayanıklılığı uyarıcı preparatın FOC baskısı varlığında ve yokluğunda; pazarlanabilir kümülatif meyve verimine etkisini değerlendirmek amacıyla; ilk hasattan başlayarak 5 hafta boyunca hasat edilen hıyar meyveleri tartılmış ve tekerrürlerde bitki başına ortalama verim (g/bitki) olarak kaydedilmiştir.



Şekil 3.9. EB'lerin tohumla uygulandıktan sonra serada topraksız tarım sistemine aktarılma süreci (sağdan sola ilk gerçek yaprak aşamasında torfa EB süspansiyonlarının uygulanması, FOC spor süspansiyonunun üretilmesi ve torfun FOC spor süspansiyonu ile inokule edilmesi. EB uygulaması görmüş fidelerin FOC ile bulaşık torf içeren saksılara şaşırtılması, bu fidelerin topraksız tarım sistemine aktarılmak üzere perlit içeren saksılara aktarılması)



Şekil 3.10. EB uygulaması yapıldıktan sonra, FOC ile inokule edilmiş ve inokule edilmemiş fidelerin serada topraksız tarım sistemine aktarılması ve serada üretim sürecinin farklı büyüme aşamalarından kesitler

3.2.8. EB izolatlarının bitki içinde kolonizasyon ve populasyon değişimi ile FOC' un bitkideki varlığının zamana bağlı olarak izlenmesi

FOC'a karşı saksı denemelerinde biyolojik savaş ve bitki gelişimi parametreleri açısından başarılı bulunarak seçilen 2 EB izolatu rifampicin (200 ug/ml)'e dayanıklı kılınarak etiketlenmiş ve EB uygulamalarının FOC 'a karşı biyokontrol etkisinin testlendiği saksı denemelerine benzer bir patosistem yaratılarak EB'lerin patojenlerin varlığında ve yokluğunda hıyar bitkilerinde zamana bağlı olarak kolonizasyonu ve populasyon dinamikleri aşağıda belirtilen uygulamalar için araştırılmıştır:

EB'lerin ve FOC'un kolonizasyonunun araştırılmasında yapılan uygulamalar aşağıda belirtilmiştir:

- 1-EB₁ + FOC uygulanmış bitkilerde
- 2-EB₂ + FOC uygulanmış bitkilerde
- 3-Sadece EB₁ uygulanmış bitkilerde
- 4-Sadece EB₂ uygulanmış bitkilerde
- 5-Sadece FOC uygulanmış bitkilerde

EB kültürleri (200 ppm Rifampicin'e dayanıklı) %1,5'luk CMC (Karboksi Metil Selüloz) ile süspanse edilmiş ve hıyar tohumlarıyla kaplanmıştır. Süre sonunda bu tohumlar kurutma kâğıtlarına aktarılmış, kuruması için 24h beklenmiş ve tohumlar steril torfla doldurulmuş plastik saksılara ekilmiştir. Kotiledon yaprakları görüldükten sonra EB'ler toprağa içirme biçiminde tekrar uygulanmıştır. FOC spor süspansiyonu (10^6 konidi/ gr torf) bölüm 3.2.7.1'de belirtilen şekilde torfa inokule

edilerek, 2 gerçek yapraklı aşamadaki hıyar fidelerinin kökleri hafif tıraşlanarak FOC ile bulaşık torfa ekilmiştir. Endofitik bakteri ile kaplanmış tohum ve bitkilerin içerisinde zamana ve bitki gelişme aşamalarına bağlı olarak EB ve FOC populasyonundaki değişiminin izlenmesi Çizelge 3.11’de gösterildiği gibi planlanmıştır.

Çizelge 3.11. EB’lerin ve FOC’un bitki içerisinde kolonizasyonunu takip etmek için uygun görülen örnek alınma zamanları

1. Tohum bakterizasyonundan 30 dk. sonra tohumdaki EB’lerin kolonizasyonunun incelenmesi
2. Tohum bakterizasyonundan 24 h. Sonra, yüzey dezenfeksiyonu yapılan tohumdaki EB’lerin kolonizasyonunun incelenmesi
3. Kotiledon başlangıcı döneminde alınan bitki örneklerinde EB’lerin kolonizasyonunun incelenmesi
4. Kotiledon sonu döneminde alınan bitki örneklerinde EB’lerin kolonizasyonunun incelenmesi
5. 1. gerçek yaprak döneminde alınan bitki örneklerinde EB’lerin kolonizasyonunun incelenmesi
6. 2. gerçek yaprak döneminde alınan bitki örneklerinde EB’lerin kolonizasyonunun incelenmesi,
7. FOC’un inokulasyonundan 72 h. sonra alınan bitki örneklerinde FOC ve EB’lerin kolonizasyonunun incelenmesi
8. FOC’un inokulasyonundan 7 gün sonra alınan bitki örneklerinde FOC ve EB’lerin kolonizasyonunun incelenmesi,
9. FOC’un inokulasyonundan 14 gün sonra alınan bitki örneklerinde FOC ve EB’lerin kolonizasyonunun incelenmesi,
10. FOC’un inokulasyonundan 30 gün sonra alınan bitki örneklerinde FOC ve EB’lerin kolonizasyonunun incelenmesi
11. FOC’un inokulasyonundan 45 gün sonra alınan bitki örneklerinde FOC ve EB’lerin kolonizasyonunun incelenmesi

Hıyar bitkilerinde EB’lerin popülasyonunu izlemek amacıyla alınan bitki örneklerinin sadece köklerine yüzey dezenfeksiyonu uygulanmıştır. Daha sonra bitki örnekleri, kök ve gövde kesitleri şeklinde ikiye ayrılmıştır. Ayrı ayrı tartılarak ağırlıkları belirlenen kök ve gövde kesitleri, steril polietilen torbalara konularak stomaker yardımıyla ezilmiştir. Kök ve gövde kesitlerinin ağırlıklarının 10 katı steril saf su bu torbalara konulmuş ve 30 dakika 120 rpm de çalkalayıcıda karıştırılmıştır. Elde edilen bu süspansiyondan seyreltme basamakları oluşturularak Rifampicin (200 ppm) içeren TSA ortamına 20 µl damlatılarak ekimler yapılmış ve gelişen koloniler sayılarak EB populasyonu ve zamana bağlı olarak kolonizasyonu değerlendirilmiştir

(cfu/g tohum ya da bitki olarak). Aynı hıyar bitkilerinde, *FOC* izolatının bitki içinde zamana bağlı kolonizasyonunun izlenmesi işlemi, *FOC* inokulasyonundan 72 saat, 7 gün, 14 gün, 30 gün ve 45 gün sonra alınan bitki kesitlerinden yüzey dezenfeksiyonu yapılarak (tek parça halinde 5 dakika NaClO içinde bırakılıp durulamayı takiben bir gün kurutulduktan sonra parçalara ayırarak) bu kesitlerin seçici ortamlara (Komada (Kom) ve Malachit Green Agar (MGA)) bırakılmaları şeklinde gerçekleştirilmiştir. Fungus sadece bir kesitte saptansa dahi varlığı teyit edilmiştir. EB'lerle uygulama görmemiş, ancak patojen fungus ile inokule edilmiş bitkilerdeki patojen kolonizasyonu EB'ler ile uygulama görmüş bitkilerdeki patojen kolonizasyonu karşılaştırılmıştır. Denemeler TB deneme desenine göre, her örnekleme döneminde örnekler 3 tekerrürlü olarak alınacak şekilde kurulmuştur. Böylece EB'lerin teksel olarak patojen baskısı olmaksızın hıyar bitkisinin kök ve toprak üstü dokularındaki kolonizasyonu ve *FOC* baskısı altında EB'lerin ve *FOC*'un zamana bağlı kolonizasyonu değerlendirilmiştir.

3.2.9. Etkinlikleri onaylanarak seçilen EB izolatlarının konvensiyonel ve moleküler tanılama çalışmaları

FOC'un varlığında ve yokluğunda bitki büyüme parametreleri, biyokontrol özellikleri ve bitki gelişimini artırma açısından başarılı bulunan 2 EB izolatının konvensiyonel ve moleküler tanılama çalışmaları yapılmıştır. Bu amaçla, 16s rRNA hedef bölgesine göre dizayn edilmiş olan **Fd1/Rp2** ve **27F/1492R** primerleri kullanılmıştır. Hazırlanan master mix (çizelge 3.12) PCR tüplerine 20 µl olarak bölünmüş ve Çizelge 3.9'deki belirtilen koşullarda programlanan Termal Cycler'de çoğaltılmıştır. Çalışma sonunda elde edilen PCR ürünleri TAE buffer ile hazırlanan %1,5'luk Agaroz jelde 80 Voltta 1saat. elektroforezde koşularak sonuçları değerlendirilmiştir. Elde edilen PCR ürünleri sekans analizi için MACROGEN firmasına gönderilmiştir. Elde edilen sekans sonuçları NCBI veri tabandaki bilgiler ile karşılaştırılarak tanıları yapılmıştır.

Çizelge 3.12. Fd1/Rp2 ve 27F/1492R 16 s rRNA primerleri için kullanılan master mix için gerekli kimyasallar ve miktarları.

16s rRNA Fd1/Rp2 ve 27F/1492R primerleri için master mix			
Gerekli Kimyasallar	Başlangıç Stok	Final Konsantrasyon	1 örnek için gerekli miktar
TaqKClBuffer	10 X	1 X	2 µl
MgCl ₂	25 mM	1,5 mM	1,2 µl
dNTP	2,5mM	0,2 mM	1,6 µl
Fd1 Forward	10 mM	1 mM	2 µl
Rp2 Reverse	10mM	1 mM	2 µl
H ₂ O	-	-	8 µl
TaqPolimeraz	5 U	1 U	0,2 µl
Örnek Nükleik Asit	10 ⁷ Cfu/ml (OD ₆₀₀ ; 0,5)		3 µl
Toplam hacim	-	-	20 µl

3.2.10. Verilerin analizi

Elde edilen verilere, bilgisayarda **SPSS** (SPSS Inc. PASW Statistics versiyon 18) paket programı ile varyans analizi uygulanmış ve ortalamalar arasındaki farklılıklar % 5 hata olasılığı ile yapılan **DUNCAN testiyle** belirlenmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Endofitik Bakterilerin İzolasyon Sonuçları

Endofitik bakterilerin izolasyon amacı ile toplam **44 farklı** örnekleme alanından sağlıklı kabakgil bitki örnekleri alınmıştır. Bu örneklerden 13'ü İzmir Menderes ilçesi seralarından, 21'i ise Antalya ve Fethiye çevresindeki seralardan olmak üzere toplam 34 sera ve Ödemiş, Bayındır çevresinden ise toplam **9** tarladan sağlıklı hıyar örnekleri alınmıştır(Çizelge 4.1.).

Alınan kabakgil bitki örneklerinden endofitik bakteri izolasyonları yapılmıştır. Elde edilen endofitik bakterilerin izole edildikleri yerler ve ön tanıma dönük Gram reaksiyonu, UV ışık altında floresan renk vermesi ve hipersensitif reaksiyonu (HR) özellikleri çizelge 4.1.'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Doktora çalışması sırasında izole edilmiş endofitik bakterilere ilişkin bilgiler

Örnek No	İzolat No	Örneğin alındığı				İzolatların Ön Tanımaya Dönük Bazı özellikleri		
		Tarih	yer	bitki organı	Bitki	Gram	Floresan	HR
1	CB1/1	19.11.2011	Altuntepe Mah.	gövde	Hıyar,Şampiyon	-	-	-
2	CB1/2	19.11.2011	Altuntepe Mah.	gövde	Hıyar,Şampiyon	-	-	-
3	CB2/1	19.11.2011	Altuntepe Mah.	gövde	Hıyar,Şampiyon	+	-	-
4	CB2/2	19.11.2011	Altuntepe Mah.	gövde	Hıyar,Şampiyon	+	-	-
5	CB2/3	19.11.2011	Altuntepe Mah.	gövde	Hıyar,Şampiyon	-	-	-
6	CB3	19.11.2011	Altuntepe Mah.	gövde	Hıyar,Sardes	+	-	-
7	CB4	19.11.2011	Çamönü	gövde	Hıyar,Habana	-	-	-
8	CC4	19.11.2011	Çamönü	yaprak	Hıyar,Habana	-	-	-
9	CB5/1	19.11.2011	Çamönü	gövde	Hıyar,Gordion	+	-	-
10	CB5/2	19.11.2011	Çamönü	gövde	Hıyar,Gordion	-	-	-
11	CB7	19.11.2011	Çamönü	gövde	Hıyar,Erdemli	-	-	-
12	CC7/1	19.11.2011	Çamönü	yaprak	Hıyar,Erdemli	-	+	-
13	cc7/2	19.11.2011	Çamönü	yaprak	Hıyar,Erdemli	-	-	-
14	CB8/1	19.11.2011	Çamönü	gövde	Hıyar,Habana	-	-	-
15	CB8/2	19.11.2011	Çamönü	gövde	Hıyar,Habana	+	-	-
16	CB9/1	19.11.2011	Çamönü	gövde	Hıyar,Gordion	+	-	-
17	CB9/2	19.11.2011	Çamönü	gövde	Hıyar,Gordion	-	-	-
18	CB9/3	19.11.2011	Çamönü	gövde	Hıyar,Gordion	-	-	-
19	CA10	17/03/2012	Altınova-Düden	Kök	Hıyar, 22403(Silor)	-	+	-
20	CB10	17/03/2012	Altınova-Düden	gövde	Hıyar, 22403 (Silor)	-	-	-
21	CC13	17/03/2012	Kocayatak	yaprak	Hıyar, Gurme (Silor)	+	-	-
22	CA13/1	17/03/2012	Kocayatak	Kök	Hıyar, Gurme (Silor)	+	-	-
23	CA13/2	17/03/2012	Kocayatak	Kök	Hıyar, Gurme (Silor)	-	-	-
24	CB13	17/03/2012	Kocayatak	gövde	Hıyar, Gurme (Silor)	+	-	-

Çizelge 4.1.' in devamı

25	CA15	17/03/2012	Kocayatak	Kök	Hıyar, Gurme 3116		-	-
26	CB15/1	17/03/2012	Kocayatak	gövde	Hıyar, Gurme 3117	+	-	-
27	CB15/2	17/03/2012	Kocayatak	gövde	Hıyar, Gurme 3118	-	-	-
28	CA17/1	17/03/2012	Kocayatak	Kök	Hıyar, Gurme	-	-	-
29	CA17/2	17/03/2012	Kocayatak	Kök	Hıyar, Gurme	-	-	-
30	CA17/3	17/03/2012	Kocayatak	Kök	Hıyar, Gurme	-	+	-
31	CA17/4	17/03/2012	Kocayatak	Kök	Hıyar, Gurme	+	-	-
32	CB17/1	17/03/2012	Kocayatak	gövde	Hıyar, Gurme	+	-	-
33	CB17/2	17/03/2012	Kocayatak	gövde	Hıyar, Gurme	-	-	-
34	CA18	17/03/2012	Komluca	gövde	Hıyar, Silor tipi	+	-	-
35	CB18/1	18.03.2012	Komluca	gövde	Hıyar, Silor tipi	+	-	-
36	CB18/2	18.03.2012	Komluca	gövde	Hıyar, Silor tipi	-	-	-
37	CB20/1	18.03.2012	Komluca, Beşikçi köyü	gövde	Kabak (Iskender F1)	+	-	-
38	CB20/2	18.03.2012	Komluca, Beşikçi köyü	gövde	Kabak (Iskender F1)	-	+	-
39	CB20/3	18.03.2012	Komluca, Beşikçi köyü	gövde	Kabak (Iskender F1)	-	-	-
40	CC23/1	18.03.2012	Komluca, Beykonak	yaprak	Hıyar, ermesos	-	-	-
41	CC23/2	18.03.2012	Komluca, Beykonak	yaprak	Hıyar, ermesos	+	-	-
42	CA24	18.03.2012	Demre	Kök	Hıyar	+	-	-
43	CB24	18.03.2012	Demre	gövde	Hıyar	+	-	-
44	CA25	18.03.2012	Demre	Kök	Hıyar	-	-	-
45	CB25	18.03.2012	Demre	gövde	Hıyar	+	-	-
46	CC25/1	18.03.2012	Demre	yaprak	Hıyar	-	+	-
47	CC25/2	18.03.2012	Demre	yaprak	Hıyar	-	+	-
48	CC26	18.03.2012	Yeşilköy (Kaş)	yaprak	Hıyar, Termesos	-	-	-
49	CA27/1	19.03.2012	Yeşilköy (Kaş)	Kök	Hıyar	-	-	-
50	CA27/2	19.03.2012	Yeşilköy (Kaş)	Kök	Hıyar	-	+	-
51	CC27	19.03.2012	Yeşilköy (Kaş)	yaprak	Hıyar	-	+	-
52	CB27/1	19.03.2012	Yeşilköy (Kaş)	gövde	Hıyar	+	-	-
53	CB27/2	19.03.2012	Yeşilköy (Kaş)	gövde	Hıyar	+	-	-
54	CA28/1	19.03.2012	Yeşilköy (Kaş)	Kök	Hıyar	-	-	-
55	CA28/2	19.03.2012	Yeşilköy (Kaş)	Kök	Hıyar	-	+	-
56	CA28/3	19.03.2012	Yeşilköy (Kaş)	Kök	Hıyar	-	+	-
57	CB28	19.03.2012	Yeşilköy (Kaş)	gövde	Hıyar	+	-	-
58	CA29/1	19.03.2012	Patara	Kök	Hıyar, Gözde	-	+	-
59	CA29/2	19.03.2012	Patara	Kök	Hıyar, Gözde	-	+	-
60	CB29/1	19.03.2012	Patara	gövde	Hıyar, Gözde	-	+	+
61	CB29/2	19.03.2012	Patara	gövde	Hıyar, Gözde	-	+	+
62	CC29/1	19.03.2012	Patara	yaprak	Hıyar, Gözde	-	-	-
63	CC29/2	19.03.2012	Patara	yaprak	Hıyar, Gözde	-	-	-
64	CC29/3	19.03.2012	Patara	yaprak	Hıyar, Gözde	+	-	-
65	CC30	19.03.2012	Patara	yaprak	Hıyar, Rivo	-	+	-
66	CB31	11/05/2012	Menderes	gövde	Hıyar, Şampiyon	+	-	-
67	CA32/1	11/05/2012	Menderes	Kök	Hıyar, Şampiyon	-	-	-
68	CA32/2	11/05/2012	Menderes	Kök	Hıyar, Şampiyon	+	-	-
69	CA33/1	11/05/2012	Menderes	Kök	Hıyar, Opal	+	-	-
70	CA33/2	11/05/2012	Menderes	Kök	Hıyar, Opal	-	+	-
71	CA34	11/05/2012	Çamönü	Kök	Hıyar, -----	+	-	-
72	CB34	11/05/2012	Çamönü	gövde	Hıyar, -----	+	-	-
73	CC35/1	19/05/2012	Ödemiş	yaprak	Hıyar, Kornişon	-	+	-
74	CC35/2	19/05/2012	Ödemiş	yaprak	Hıyar, Kornişon	+	-	-
75	CC35/3	19/05/2012	Ödemiş	yaprak	Hıyar, Kornişon	-	-	-
76	CA36	19/05/2012	Ödemiş	Kök	Hıyar, Kornişon	+	-	-
77	CB36/1	19/05/2012	Ödemiş	gövde	Hıyar, Kornişon	-	-	-
78	CB36/2	19/05/2012	Ödemiş	gövde	Hıyar, Kornişon	+	-	-
79	CC37/1	19/05/2012	Ödemiş	yaprak	Hıyar, Kornişon	+	-	-
80	CC37/2	19/05/2012	Ödemiş	yaprak	Hıyar, Kornişon	-	-	-

Çizelge 4.1.' in devamı

81	CC37/3	19/05/2012	Ödemiş	yaprak	Hıyar,Kornişon	+	-	-
82	CA38	19/05/2012	Ödemiş	Kök	Hıyar,Kornişon	+	-	-
83	CB38/1	19/05/2012	Ödemiş	gövde	Hıyar,Kornişon	+	-	-
84	CB38/2	19/05/2012	Ödemiş	gövde	Hıyar,Kornişon	-	-	-
85	CA39/1	19/05/2012	Ödemiş	kök	Hıyar,Kornişon	-	-	-
86	CA39/2	19/05/2012	Ödemiş	kök	Hıyar,Kornişon	+	-	-
87	CB39	19/05/2012	Ödemiş	gövde	Hıyar,Kornişon	+	-	-
88	CC39 /1	19/05/2012	Ödemiş	yaprak	Hıyar,Kornişon	+	-	-
89	CC39 /2	19/05/2012	Ödemiş	yaprak	Hıyar,Kornişon	+	-	-
90	CC39 /3	19/05/2012	Ödemiş	yaprak	Hıyar,Kornişon	+	-	-
91	CA40	21/06/2012	Bayındır-buruncuk	kök	Hıyar,Kornişon	+	-	-
92	CB40/1	21/06/2012	Bayındır-buruncuk	gövde	Hıyar,Kornişon	-	+	-
93	CB40/2	21/06/2012	Bayındır-buruncuk	gövde	Hıyar,Kornişon	-	+	-
94	CC40/1	21/06/2012	Bayındır-buruncuk	yaprak	Hıyar,Kornişon	-	-	-
95	CC40/2	21/06/2012	Bayındır-buruncuk	yaprak	Hıyar,Kornişon	-	-	-
96	CA41/1	21/06/2012	Bayındır-buruncuk	kök	Hıyar,Kornişon	+	-	-
97	CA41/2	21/06/2012	Bayındır-buruncuk	kök	Hıyar,Kornişon	-	-	-
98	CA41/3	21/06/2012	Bayındır-buruncuk	kök	Hıyar,Kornişon	+	-	-
99	CC41/1	21/06/2012	Bayındır-buruncuk	yaprak	Hıyar,Kornişon	+	-	-
100	CC41/2	21/06/2012	Bayındır-buruncuk	yaprak	Hıyar,Kornişon	-	-	-
101	CA42	21/06/2012	Bayındır-buruncuk	kök	Hıyar,Kornişon	-	-	-
102	CB42/1	21/06/2012	Bayındır-buruncuk	gövde	Hıyar,Kornişon	+	-	-
103	CB42/2	21/06/2012	Bayındır-buruncuk	gövde	Hıyar,Kornişon	+	-	-
104	CC42/1	21/06/2012	Bayındır-buruncuk	yaprak	Hıyar,Kornişon	-	-	-
105	CC42/2	21/06/2012	Bayındır-buruncuk	yaprak	Hıyar,Kornişon	-	-	-
106	CC43	21/06/2012	Bayındır-buruncuk	yaprak	Hıyar,Kornişon	+	-	-
107	CA44/1	21/06/2012	Bayındır-buruncuk	kök	Hıyar,Kornişon	+	-	-
108	CA44/2	21/06/2012	Bayındır-buruncuk	kök	Hıyar,Kornişon	-	-	-
109	CC44	21/06/2012	Bayındır-buruncuk	yaprak	Hıyar,Kornişon	-	+	-

Çizelge 4.1.'de görüldüğü gibi, bu örneklemeler ve izolasyonlar sırasında toplam **109 adet EB** izolatu elde edilmiştir. Bunlardan 2'si (**60 ve 61 no.lu EB** izolatları) tütün bitkisinde **HR (+)** bulunduğu için bitki patojeni olma endişesi ile proje çalışmasından çıkartılmıştır (Şekil 4.1). Ayrıca, **9, 16 ve 62 no.lu EB** izolatları ise çok zayıf gelişme göstermeleri ve yeterince saf olmamaları nedeniyle izolat listesinden çıkartılmıştır. Çalışmanın bundan sonraki aşamasında 104 EB izolatu ile testlere devam edilmiştir. 104 EB izolatının 46'sı Gram (+), 18'i floresan Pseudomonas ve geri kalan 40'ı ise diğer Gram (-) bakteriler olarak nitelendirilmiştir.



Şekil 4.1 Tütünde HR testinde Pozitif sonuç veren EB izolatları

4.2. FOC izolatlarının elde edilmesi, tanılanması ve patojenisite çalışmaları sonuçları

FOC' un izolasyonu amacı ile, İzmir, Antalya ve Muğla illeri civarında açıkta, örtü altında ve serada hıyar yetiştiriciliği yapılan alanlardan hastalık belirtisi gösteren hıyar örnekleri alınmıştır. Toplanan örneklerden elde edilen patojen *F. oxysporum* izolatlarıyla ilgili bilgiler Çizelge 4.2.'de görülmektedir.

Çizelge 4.2. Doktora çalışması sırasında elde edilen *F. oxysporum* izolatlarının listesi

NO	İzolat kodu	Alındığı yer	Bitki çeşidi	Tanı sonucu
1	TH96	Mikoloji Lab. Stokları	Hıyar,-	FOC
2	G2	Mikoloji Lab. Stokları	Hıyar,-	FOC
3	FO6	Serik, Antalya	Hıyar, cv.Gordion	FOC
4	FO14A	Serik, Antalya	Hıyar, cv. Gurme 3116	FORC
5	FO15	Serik, Antalya	Hıyar, cv. Gurme 3116	FORC
6	FO16B	Serik, Antalya	Hıyar,-	FORC
7	FO17A	Serik, Antalya	Hıyar, cv.Gurme	FORC
8	FO17B	Kumluca, Antalya	Hıyar, cv.Gurme	FORC
9	FO22A	Kumluca, Antalya	Hıyar, cv.Termesos	FORC
10	FO22B1	Kumluca, Antalya	Hıyar, cv.Termesos	FOC
11	FO22B2	Kumluca, Antalya	Hıyar, cv.Termesos	FOC
12	FO24A	Demre, Antalya	Hıyar,-	FORC
13	FO24C	Demre, Antalya	Hıyar,-	FORC
14	FO25	Kaş, Antalya	Hıyar,-	FORC

Çizelge 4.2' de görüldüğü gibi, solgunluk ve kuruma belirtisi gösteren hıyar bitkilerinden elde edilen toplam 14 *F. oxysporum* izolatının 9' unun *F. oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum* (FORC) olduğu, 5' inin ise *F. oxysporum* f.sp.*cucumerinum* (FOC) olduğu belirlenmiştir. Elde edilen FOC izolatları ile Yunanistan ve Belçika' dan sağlanan 2 referans FOC izolatı 3 farklı hıyar çeşidi kullanılarak patojenisite testine tabi tutulmuşlardır. Sonuçlar Çizelge 4.3' de verilmiştir.

Çizelge 4.3. Elde edilen FOC izolatlarının farklı hıyar çeşitlerinde oluşturduğu hastalık Şiddeti (%)değerleri

İzolat No	Farklı hıyar çeşitlerinde saptanan ortalama hastalık şiddeti (%)*		
	STANDART	GORDION F1	SARDES F1
TH96	40	40	36,6
FO6	46,6	50	46,6
G2	40	40	20
FO22B1	40	46,6	40
FO22B2	20	20	40
AFu-21(Yunanistan)	40	45	35
9906/3 (Belçika)	60	56	40

*Değerler 0-4 skalasına göre elde edilen 4 tekrerrün ortalamasıdır

İzolasyonlardan elde edilen yerel izolatların virülensliğinin düşük olması nedeniyle, sonraki aşamalarda çalışma zorluğu yaratacağı endişesiyle doktora çalışmasına Belçika Scientia Terrae Enstitüsü'nden gönderilen ve kesin teşhisi moleküler yöntem ile kendileri tarafından gerçekleştirilen (Lievens et al., 2007) 9906/3/vcg0184 kodlu izolat ile devam etmeye karar verilmiştir.

4.3. EB'lerin *in vitro* bitki gelişimini artırma potansiyellerinin (PGPR) saptanmasına yönelik testlerin sonucu

Tez çalışmasında sırasında 104 EB izolatının *in vitro* PGPR aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla, CAS agarda siderofor üretme aktivitesi, IAA üretme aktivitesi, HCN üretme aktivitesi, Fosfataz aktivitesi gibi testler yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.4'de toplu olarak görülmektedir.

Çizelge 4.4. Sağlıklı kabakgil bitkilerinden izole edilen endofitik bakterilerin *in vitro* bitki gelişimini artırma (PGPR) aktivitesi testi sonuçları

80C'deki izolat NO	izolatın adı	IAA ktivitesi (µg/ml)*	Fosfatı çözme aktivitesi (mm)**	siderofor üretimi (mm)**	HCN üretimi**
2	CB1/1	31	0	1	-
3	CB1/2	25	0	0	-
4	CB2/1	30	0	0	-
5	CB2/2	100	0	12	-
6	CB2/3	44	0	10.5	-
7	CB3	17	0	0	-
8	CB4	37	3	5	-
9	CC4	7	1	1	-

Çizelge 4.4.' un devamı

11	CB5/2	26	1	7	-
12	CB7	22	2	5	-
13	CC7/1	12	0	13	-
14	cc7/2	30	2,5	5	-
15	CB8/1	37	3	5	-
16	CB8/2	2	0	10	-
18	CB9/2	13	1	7	-
19	CB9/3	33	0	12	-
20	CA10	6	0	0	-
21	CB10	6	9	12	-
22	CC13	6	0	0	-
23	CA13/1	6	0	0	-
24	CA13/2	5	0	0	-
25	CB13	15	0	0	-
26	CA15	3	2	0	-
27	CB15/1	5	0	0	-
28	CB15/2	10	0	0	-
29	CA17/1	12	0	0	-
30	CA17/2	6	0	9	-
31	CA17/3	9	0	7	+
32	CA17/4	27	0	2	-
33	CB17/1	6	0	0	-
34	CB17/2	--	0	0	-
35	CA18	7	0	6.5	-
36	CB18/1	6	1	0	-
37	CB18/2	7	1	7	-
38	CB20/1	7	0	0	-
39	CB20/2	11	3	8	-
40	CB20/3	9	1	1	-
42	CC23/1	7	2	2	-
43	CC23/2	10	2	1	-
44	CA24	6	1	0	-
45	CB24	18	2	1	-
46	CA25	32	0	3	-
47	CB25	12	1	3	-
48	CC25/1	26	0	14	-
49	CC25/2	34	1	9	-
50	CC26	16	0	0	-
51	CA27/1	9	0	0	-
53	CA27/2	9	4	11	+
54	CB27/1	7	0	0	-
55	CB27/2	6	0	0	-
56	CA28/1	13	0	12	-
57	CA28/2	5	0	6	-

Çizelge 4.4.' un devamı

58	CA28/3	15	0	19	-
59	CB28	0	0	0	-
60	CA29/1	25	2	3	-
61	CA29/2	14	0	16	-
65	CC29/2	7	0	0	-
66	CC29/3	12	0	0	-
68	CC30	24	2	16	-
69	CB31	5	0	-	-
70	CA32/1	35	0	2	-
71	CA32/2	35	0	8	-
72	CA33/1	7	0	4	-
73	CA33/2	14	3	6	-
74	CA34	5	0	1	-
75	CB34	5	0	1	-
76	CC35/1	16	0	8	-
77	CC35/2	7	0	2	-
78	CC35/3	8	0	12	-
79	CA36	8	0	1	-
80	CB36/1	125	4	7	-
81	CB36/2	20	0	10	-
82	CC37/1	5	0	3	-
83	CC37/2	45	6	7	-
84	CC37/3	15	0	5	-
85	CA38	5	0	6	-
86	CB38/1	6	0	4	-
87	CB38/2	50	1	6	-
88	CA39/1	12	0	12	-
89	CA39/2	13	0	4	-
90	CB39	12	0	1	-
91	CC39 /1	8	0	3	-
92	CC39 /2	15	0	1	-
93	CC39 /3	39	0	1	-
94	C40	12	0	3	-
95	CB40 /1	11	3	11	-
96	CB40 /2	18	0	19	-
97	CC40 /1	5	0	2	-
98	CC40 /2	32	1,5	4	-
99	CA41 /1	6	0	1	-
100	CA41 /2	11	0	2	-
101	CA41 /3	9	0	2	-
102	CC41 /1	8	0	0	-
103	CC41 /2	41	3,5	3	-
104	CA42	8	0	0	-
105	CB42 /1	26	0	1	-

Çizelge 4.4.' un devamı

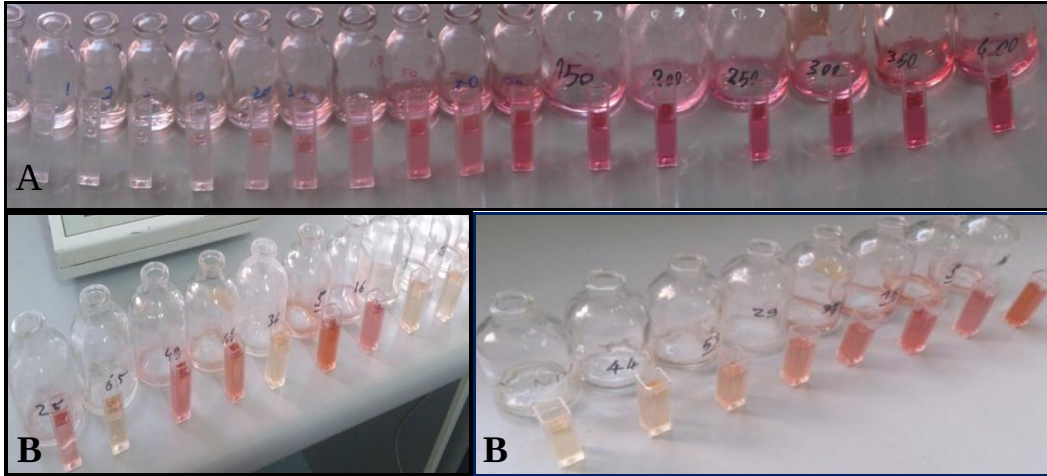
106	CB42 /2	6	0	0	-
107	CC42 /1	41	5	1	-
108	CC42 /2	15	1	1	-
109	CC43	7	1	0	-
110	CA44 /1	6	0	0	-
111	CA44 /2	8	0	1	-
112	CC44	8	1.5	6	-

*IAA düzeyleri 325 nm dalga boyunda spektrofotometrede optik geçirgenlik ölçümü yapıldıktan sonra elde edilen değerlerin IAA standart eğrisi ile karşılaştırılması yoluyla elde edilmiştir.

**Değerler 4 tekerrür ortalamasıdır

***renk değişimine göre değerlendirildi

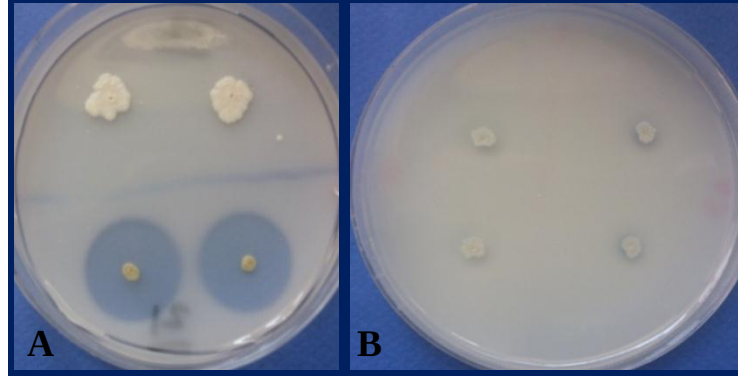
Çizelge 4.4'de görüldüğü gibi testlenen EB izolatlarının 72'si *in vitro*'da 5-20 µg/ml arasında değişen IAA üretirken, 28'i ise 20-125 µg/ml arasında değişen oldukça yüksek bir IAA aktivitesi göstermiştir (Şekil 4.2). Bu sonuç, izole edilen EB'lerin bitki gelişimi için önemli bir büyüme hormonu olan IAA üretme aktivitesi açısından zengin olduğunu göstermiştir.



Şekil 4.2. EB'lerin *in vitro* koşullarda IAA üretiminin testlenmesi: **A.** IAA standart eğrisini oluşturmak üzere hazırlanan farklı IAA doz serileri, **B.** Bazı EB izolatlarının IAA üretim düzeylerindeki farklılığı gösteren kolorimetrik renk skalası (pembe renk yoğunluğu IAA düzeyinin yüksek oluşunun göstergesidir)

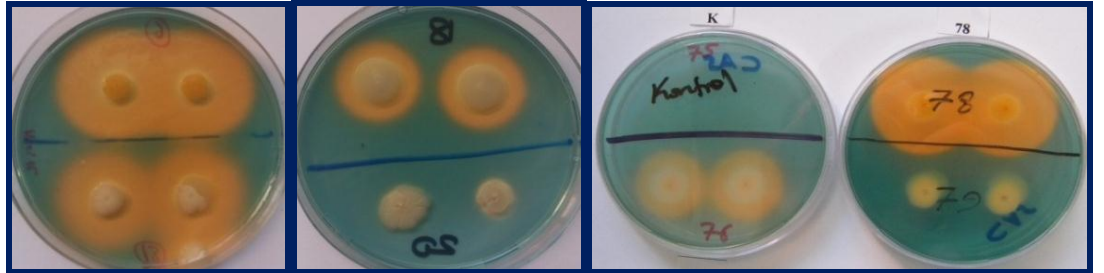
In vitro'da fosfatı çözme yeteneği açısından testlenen 104 EB izolatının 33'ü NBRIP ortamı üzerinde genişliği 1-9 mm arasında değişen erime zonları

oluşturmuştur. Ancak, testlenen toplam EB popülasyonunun yaklaşık %68'inin fosfatı çözme yeteneğinin olmadığı saptanmıştır (Çizelge 4.4, Şekil 4.3).



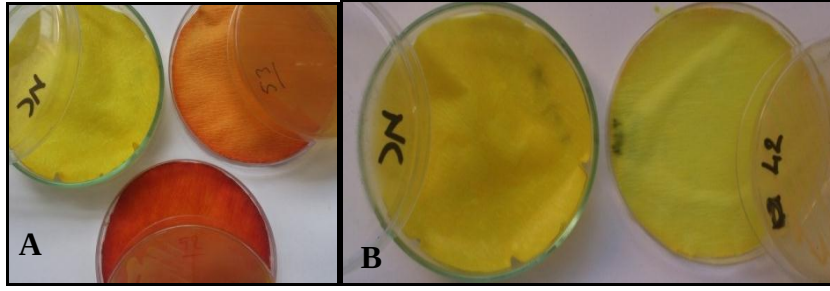
Şekil 4.3. EB'lerin *in vitro*'da NBRIP ortamında fosfatı çözme yeteneği: **A.** Fosfatı çözme yeteneği saptanan EB izolatının oluşturduğu erime zonu, **B.** Fosfatı çözme yeteneği saptanamayan EB izolatlarının petrideki görünümü

EB izolatlarının önemli bir PGPR ve biyokontrol parametresi olarak *in vitro*'da CAS Agarda siderofor üretme potansiyelleri de araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.4'de görülmektedir. Testlenen EB izolatlarının yaklaşık %50'si *in vitro*'da 3-19 mm arasında değişen zonlar oluşturarak siderofor üretme potansiyelleri olduğunu göstermiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. EB'lerin *in vitro*'da CAS agar üzerinde farklı düzeyde siderofor salgılama yeteneği

Bu tez çalışmasında *in vitro*'da HCN üretimi açısından araştırılan 104 EB izolatı arasından sadece 2'sinin HCN ürettiği sonucuna varılmıştır (Çizelge 4.4., Şekil 4.5). Bu izolatların da floresan *Pseudomonas* grubundan olduğu belirlenmiştir. Geri kalan EB izolatlarında HCN üretimi saptanamamıştır.



Şekil 4.5 EB izolatlarının in vitro’da HCN üretiminin testlenmesi: A. turuncu-kırmızı renk HCN (+), B. Sarı renk HCN (-) olduğunu göstermektedir.

4.4. Endofitik Bakterilerin (EB) FOC’a Karşı *in vitro*’da Biyokontrol Potansiyellerini Belirleme Testleri Sonuçları

Testlenen EB izolatlarının %53’ü *in vitro* testlerde FOC’un miselyal gelişimini %20-64 oranında engellemeyi başarmıştır. Bu engelleme ya antibiyotik/ toksik maddeler üreterek antibiozis (Şekil 4.6), ya da FOC hiflerinin lizisi yoluyla gerçekleşmiştir (Şekil 4.7). Testlenen ve FOC’a karşı etkili bulunan EB izolatlarının büyük bölümünde antibiozis gözlenmiştir.

Çizelge 4.5 EB izolatlarının FOC’a karşı *in vitro* koşullarda biyokontrol potansiyelleri

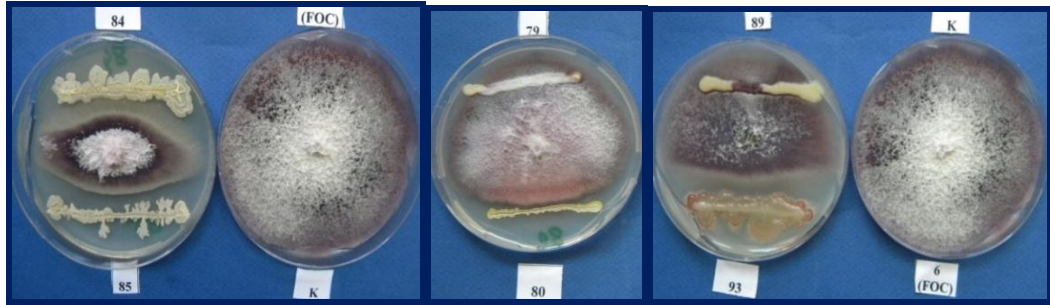
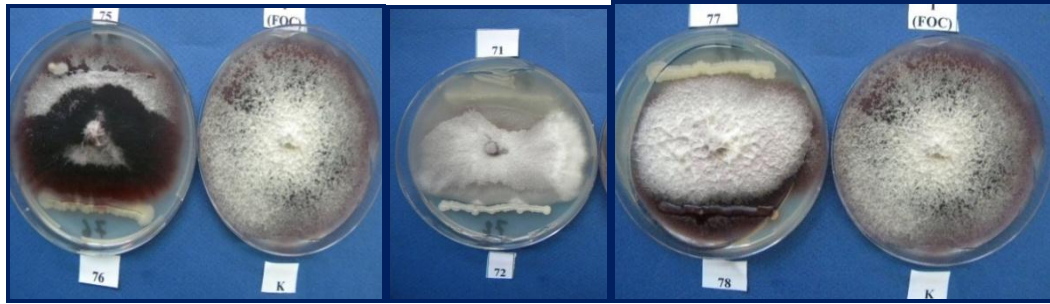
Izolat no (-80’daki no)	FOC’un miselyal gelişiminin engellenmesi (%) ^{1,2}	Izolat no (-80’daki no)	FOC’un miselyal gelişiminin engellenmesi (%) ^{1,2}	Izolat no (-80’daki no)	FOC’un miselyal gelişiminin engellenmesi (%) ^{1,2}
2	38,1	39	0	78	0
3	15,7	40	35,7	79	14
4	44,7	42	4,2	80	43
5	50	43	0	81	25
6	57,8	44	0	82	22,2
7	30,2	45	30	83	15
8	28,9	46	14,2	84	22
9	26,6	47	0	85	63
11	40,7	48	7	86	0
12	34,2	49	64,2	87	31
13	56,7	50	58,5	88	0
14	53,9	51	0	89	32,6
15	27,6	52	8,5	90	33,3
16	18,5	53	18,5	91	11,1
18	31,5	54	0	92	0
19	27,6	55	0	93	42
20	39,4	56	45,7	94	31,5
21	32,8	57	34,2	95	16,4
22	0	58	15,7	96	24,6
23	15,7	59	24,2	97	10,9

Çizelge 4.5 devamı

24	0	60	27,1	98	23,2
25	18,5	61	27,1	99	17,8
26	0	64	35,7	100	9,5
27	0	65	7	101	17,8
28	23,6	66	62,8	102	26
29	14,4	68	17,1	103	19,1
30	27,6	69	0	104	10,9
31	26,3	70	0	105	17,8
32	44,7	71	50	106	17,8
33	0	72	48	107	20,5
34	0	73	44	108	30,5
35	17,1	74	20	109	24,6
36	0	75	0	110	34,2
37	14,4	76	14	111	18,5
38	0	77	43	112	31,5

¹Kontrol petrilerinde FOC koloni yarı çapı 45 mm.dir. Değerler Kontrol (+) petrilerindeki miselyal gelişmeye göre etki (%)'yi göstermektedir

² Değerler 4 tekrür ortalamasıdır.

**Şekil 4.6** Antibiozis yoluyla *in vitro*'da FOC'un miselyal gelişimini engelleyen EB izolatları**Şekil 4.7** Hücre duvarı lizisi yoluyla *in vitro*'da FOC'un miselyal gelişimini engelleyen EB izolatları

4.5. Vigorite İndeksi Testi Ve *in vivo* Testler İçin EB İzolatlarının Seçilmesine Yönelik Tartılı Derecelendirme Sonuçları

Tez çalışmasında izole edilen toplam 104 EB izolatı, yukarıda belirtilen *in vitro* PGPR ve FOC'a karşı biyokontrol testlerindeki performansları doğrultusunda 3.2.5.

bölümünde açıklanan tartılı derecelendirme yöntemi ile aldıkları skorların toplamına göre 32 EB izolatı vigorite testine seçilmiştir (çizelge 4.6).

Çizelge 4.6. Vigorite testine alınmak üzere seçilmiş EB izolatlarına uygulanan tartılı derecelendirme sonuçlarına ilişkin bilgiler

İzolat no	EB İzolatının Adı	Özelliği	Biokontrol + PGPR özellikler için alınan toplam değer	Vigorite testi için seçim
2	CB1/1	Gram (-)	29,6	
4	CB2/1	Gram (-)	33,6	
5	CB2/2	Gram (-)	74,8	Seçildi
6	CB2/3	Gram (-)	70,0	Seçildi
8	CB4	Gram (-)	35,6	Seçildi
11	CB5/2	Gram (-)	44,4	
12	CB7	Gram (-)	39,6	
13	CC7/1	Floresan Pseudomonas	62,0	Seçildi
14	CC7/2	Gram (-)	50,4	Seçildi
15	CB8/1	Gram (-)	35,6	Seçildi
16	CB8/2	Gram (+)	33,6	Seçildi
18	CB9/2	Gram (-)	37,6	
19	CB9/3	Gram (-)	44,8	Seçildi
20	CA10	Gram (+)	34,8	
21	CB10	Gram (-)	60,8	Seçildi
31	CA17/3	Floresan Pseudomonas	40,4	Seçildi
32	CA17/4	Gram (+)	36,8	
35	CA18	Gram (+)	-	
37	CB18/2	Gram (-)	29,6	
40	CB20/3	Gram (-)	32,0	
45	CB24	Gram (+)	29,2	
48	CC25/1	Floresan Pseudomonas	36,0	Seçildi
49	CC25/2	Floresan Pseudomonas	46,0	Seçildi
50	CC26	Gram (-)	46,8	Seçildi
52	CA27/2	Floresan Pseudomonas	39,6	
53	CC27	Floresan Pseudomonas	46,8	Seçildi
56	CA28/1	Gram (-)	58,0	Seçildi
57	CA28/2	Gram (-)	39,2	
58	CA28/3	Floresan Pseudomonas	47,6	Seçildi
60	CA29/1	Floresan Pseudomonas	32,4	
61	CA29/2	Floresan Pseudomonas	33,2	Seçildi
64	CC29/1	Gram (-)	30,0	
66	CC29/3	Gram (+)	46,8	Seçildi
68	CC30	Floresan Pseudomonas	-	Seçildi
71	CA32/2	Gram (+)	36,8	
72	CA33/1	Gram (+)	45,2	Seçildi
73	CA33/2	Floresan Pseudomonas	48,0	Seçildi
76	CC35/1	Floresan Pseudomonas	-	Seçildi
77	CC35/2	Gram (+)	38,0	
78	CC35/3	Gram (-)	30,0	Seçildi
80	CB36/1	Gram (-)	78,8	Seçildi
81	CB36/2	Gram (-)	38,8	Seçildi
83	CC37/2	Gram (-)	42,8	Seçildi
84	CC37/3	Gram (+)	41,2	
85	CA38	Gram (+)	56,4	Seçildi
86	CB38/1	Gram (+)	-	
87	CB38/2	Gram (-)	44,8	Seçildi
88	CA39/1	Gram (-)	30,0	Seçildi

Çizelge 4.6.'nin devamı

89	CA39/2	Gram (+)	37,2	
90	CB39	Gram (+)	30,8	
93	CC39 /3	Gram (+)	42,0	
94	C40	Gram (+)	30,0	
95	CB40 /1	Floresan Pseudomonas	38,4	
96	CB40 /2	Floresan Pseudomonas	51,6	Seçildi
98	CC40 /2	Gram (-)	29,2	
99	CA41 /1	Gram (+)	-	Seçildi
102	CC41 /1	Gram (+)	-	
103	CC41 /2	Gram (-)	32,8	
107	CC42 /1	Gram (-)	36,0	
108	CC42 /2	Gram (-)	-	
109	CC43	Gram (+)	-	
110	CA44 /1	Gram (+)	30,8	
112	CC44	Floresan Pseudomonas	37,6	Seçildi

4.6. Vigorite İndeksi Testi Sonuçları

Vigorite indeksi testi sonuçlarına göre, VI değeri Negatif Kontrol'e (4657) yakın ya da daha yüksek olan **6, 14, 16, 19, 37, 49, 50, 56, 57, 60, 61, 66, 68, 73, 80, 81, 83, 85, 87, 88, 93, 95, 99 ve 112 no.lu** 24 EB izolatu, FOC'a karşı *in vivo* biyokontrol etki ve bitki gelişimini artırıcı etki (PGPR) testlerine alınmıştır. Bazı EB izolatları ise VI sonuçlarından da anlaşılacağı gibi çimlenme ve VI'ni olumsuz etkilemiştir. Şekil 4.8'da görüldüğü gibi, 73 no.lu EB izolatu *in vitro* vigortie testinde Negatif Kontrol'e göre çimlenme ve VI'ni olumsuz etkilemesine rağmen, *in vitro* biyokontrol ve PGPR parametreleri çok uygun olduğu için *in vivo* testlere alınmasına karar verilmiştir (Şekil4.8). Vigorite İndeksi testinin karşılaştırmalı sonuçları Çizelge 4.7'de görülmektedir:

Çizelge 4.7. EB izolatlarının hıyar tohumlarında Vigorite İndeksi (VI)

İZOLAT NO	DENEME SONUÇLARI*	İZOLAT NO	DENEME SONUÇLARI*
Kontrol (-)	4657	60	5237
5	2764	61	5724
6	3173	66	4336
8	3153	68	5403
13	1840	73	2116
14	4233	76	2438
15	3083	78	2990
16	5540	80	4363
19	4996	81	5880
21	3130	83	5537
37	4100	85	5250
48	1977	87	6184
49	6153	88	5297
50	5540	96	5803
53	2027	93	5237
56	4627	99	4986
58	3120	112	5143

*Değerler her petride 10 tohum bulunan 3 tekrerrüt ortalamasıdır



Şekil 4.8 EB izolatlarının hıyar tohumlarında Vigorite İndeksi (VI) sonuçlarının Negatif kontrol (NC) ile karşılaştırılması

4.7. EB İzolatlarının Bitki Büyüme Odasında *In vivo* Koşullarda FOC'a Biyokontrol Etki Testlerinin Sonuçları

Vigorite testi sonuçlarına göre 24 EB izolatı saksı denemesine seçilmiştir. Bitki büyüme odası koşullarında gerçekleştirilen *in vivo* saksı denemesinde EB izolatlarının FOC'a karşı biyokontrol etkisi 0-4 skalasına göre değerlendirildiğinde; EB izolatlarından **16, 83, 68, 99, 112 ve 37 no.lu** bakteriler FOC inokulasyonundan 6 hafta sonra, bitki büyüme odası koşullarında, hastalık şiddetini Pozitif Kontrol uygulamasına göre % 31 -62 oranında engelleyen en başarılı uygulamalar olmuştur (Çizelge 4.8, Şekil 4.9, Şekil 4.10). **16, 83, 68, 99, 112 ve 37 no.lu EB izolatları** bitki büyüme parametreleri açısından da bitki gelişimini artırmada Pozitif Kontrol'den farklı bulunmuştur (Çizelge 4.9, Şekil 4.11).

Çizelge 4.8 EB uygulamasının bitki büyüme odası koşullarında, saksı denemesinde FOC'un neden olduğu Fusarium Solgunluğunun gelişimine etkisi

İzolat no.	Hastalık İndeksi (0-4 skalası)*	Hastalık Şiddeti (%)	Pozitif Kontrol'e göre etki (%)***
Pozitif Kontrol	2.1	52.5 cdef**	--
87	1.67	41.67 abcde	20.62
16	1.37	33.33 abc	36.5
66	2.11	52.78 cdef	-0.5
83	1.20	30.00 ab	42.85
68	1.4	55.00 abc	-4.76
99	0.8	25.00 a	52.38
88	1.67	46.87 abcde	10.72
61	3.00	75.00 g	-42.86
85	1.8	45.00 bcde	14.29

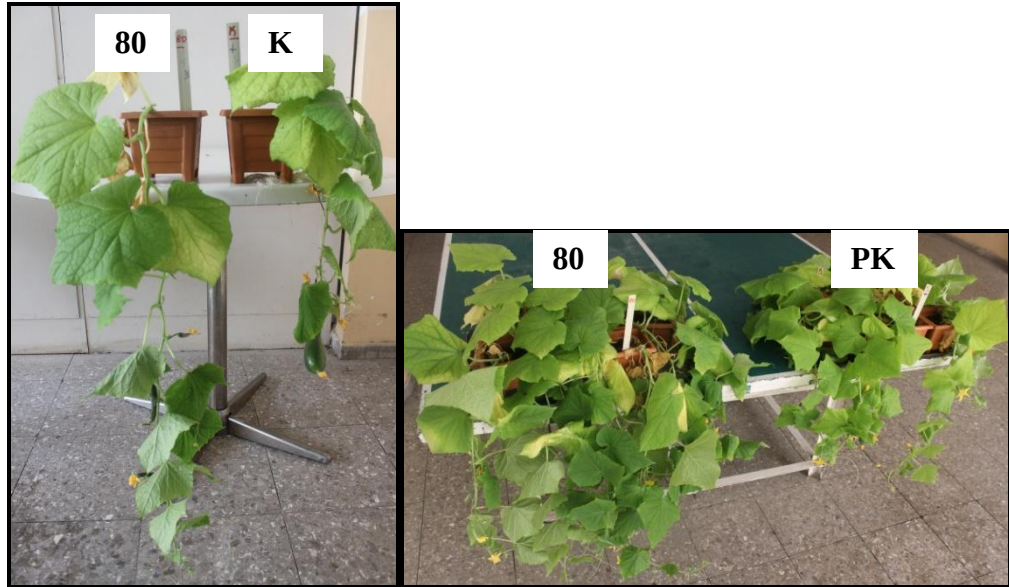
Çizelge 4.8.' in devamı

49	1.67	41.67	abcde	20.62
56	1.90	47.5	bcde	9.5
50	2.44	61.11	efg	-16.4
112	1.4	35.00	abc	33.33
81	3.00	75.00	g	-42.86
80	1.9	47.5	bcde	9.52
14	1.62	40.62	abcd	22.63
19	2.00	50.00	cdef	4.76
73	2.00	50.00	cdef	4.76
6	2.67	66.67	fg	-27.14
93	2.00	50.00	cdef	4.76
37	1.44	31.25	abc	31.43
57	1.80	45.00	abcde	14.29
60	2.30	57.50	defg	-9.5
95	2.11	52.78	cdef	-0.5

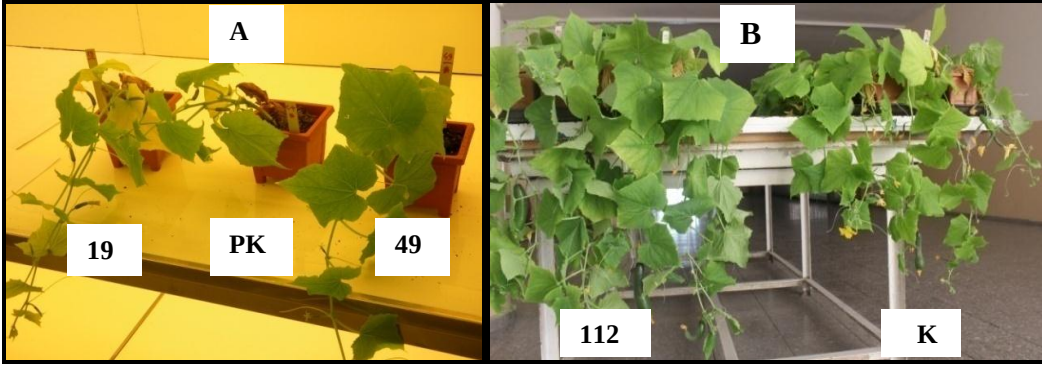
*Değerler 10 tekerrür ortalamasıdır

** Tekerrürlerde saptanan hastalık şiddeti (%) değerlerine uygulanan Duncan testine göre aynı harfi taşıyan işlemler $P=0.05$ olasılıkla birbirinden farklıdır.

***Değerler Abbott formülüne göre uygulamalardaki HŞ% değerlerinin Pozitif Kontrolten farkını göstermektedir



Şekil 4.9. 80 no.lu EB uygulamasının, sadece patojen ile inokule edilmiş PK uygulamasına göre FOC'u engelleyici ve bitki gelişimini artırıcı etkisi



Şekil 4.10. A. FOC’u engellemede başarılı olan (sağda 49) ve etkisiz bulunan (solda 19) EB uygulamalarının, **B.** Başarılı bulunan 112 no.lu EB uygulamasının PK ile karşılaştırılması

EB izolatlarının bitki büyüme odasında *in vivo* koşullarda FOC’a karşı biyokontrol etki testlerinde, her uygulamada yer alan tekerrürlerde bulunan bitkilerin bazı bitki büyüme parametrelerine göre bitki gelişimine etkileri de araştırılmıştır. **Çizelge 4.11’de**, FOC baskısına karşın, EB’lerin hıyar bitkilerinde kök/yeşil aksam yaş ve kuru ağırlıkları, çiçek ve meyve sayısı ve yaprak sayısı gibi bazı bitki büyüme parametrelerine etkisi görülmektedir. Böylece, hastalık baskısına karşın, EB’lerin bitki gelişimine olan etkisi de değerlendirilmeye çalışılmıştır. Toplam bitki biyoması kuru ağırlığı büyüme parametresi olarak daha anlamlı olduğu için, Şekil 4.12’de toplam bitki biyoması (kök + yeşil aksam) kuru ağırlığı toplu halde görülmektedir. Bitki büyüme odası koşullarında FOC’dan kaynaklanan hastalık şiddetini başarıyla engelleyen izolatlar olan **16, 83, 68, 99, 112 ve 37 no.lu** bakteriler bitki büyüme parametreleri açısından da, Pozitif Kontrol ile karşılaştırıldığında, olumlu özellikler göstermiştir (Şekil 4.9, 10).

Çizelge 4.9. EB’lerin FOC ile bulaşık ortamda, bitki büyüme odasında yetiştirilen hıyar bitkilerinde bazı bitki büyüme parametrelerine etkisi

Uygulama no	Yaş ağırlık (g/bitki)*		Kuru ağırlık (g/bitki)*		Yaprak sayısı*	Çiçek-meyve sayısı *
	Yeşil aksam	Kök	Yeşil aksam	Kök		
PC	5,63 ab**	0,81bc**	1,62abc**	0,49ab**	12,1abcdef**	3,4abc**
NC	10,24 j	1,1 d	2,28 j	0,51abc	13,6defgh	2,8abc
6	6,94bcdefg	0,78bc	1,95efgh	0,56bc	11,56abcd	2 a
14	7,62defghi	0,65abc	1,99fghi	0,41 ab	13,75efgh	4,5bcd
16	8,51hi	0,62 ab	2,1 ,hij	0,45abc	13,89efgh	3,22abc
19	6,28abcde	0,75abc	1,64abcd	0,47abc	11,1 ab	3,7abc
37	7,8efghi	0,64abc	1,98efghi	0,43 ab	12,22abcdefg	3,5abc

Çizelge 4.11.' in devamı

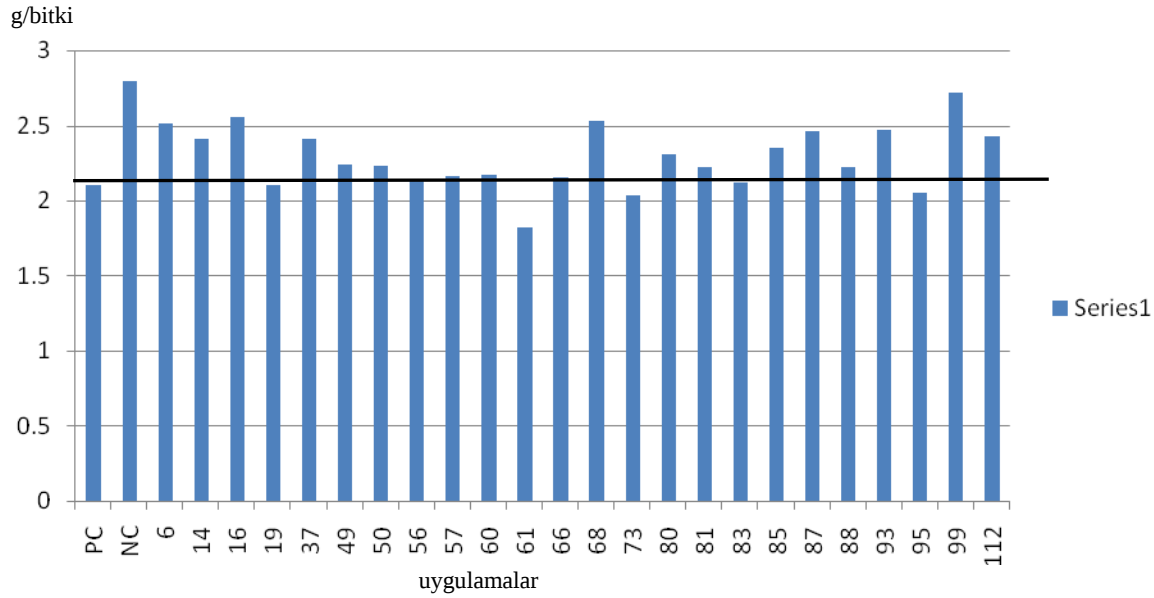
49	6,04abcd	0,77abc	1,68abcd	0,56bc	12,83abcdefg	3,17bc
50	6,24abcde	0,75abc	1,71abcde	0,52abc	11 a	3,44abc
56	6,25abcde	0,6abc	1,58 ab	0,56bc	12,7abcdef	3,4abc
57	5,63 ab	0,93 cd	1,55 ab	0,61c	13,1abcdefg	2,8abc
60	6,45abcdef	0,76abc	1,74bcdef	0,43 ab	11,4abc	2,3ab
61	5,14 a	0,61 ab	1,45 a	0,38 a	11 a	2,5 ab
66	6,07abcd	0,73abc	1,68abcd	0,48abc	11 a	3,11abc
68	7,99fghı	0,78bc	2,06ghı	0,47abc	13,4cdefg	3,7abc
73	6,48abcdef	0,63 ab	1,6ab	0,44 ab	13,1abcdefg	2,1 a
80	7,11bcdefgh	0,48 a	1,88cdfgh	0,43 ab	14,3gh	4,2abcd
81	5,87abc	0,73abc	1,67abcd	0,55bc	12,88abcdefg	3abc
83	6,15abcd	0,8bc	1,64abcd	0,47abc	12,6abcdefg	4,3abcd
85	7,43cdefgh	0,7abc	1,9defgh	0,46abc	13,2cdefg	3,3abc
87	7,81efdghı	0,8bc	2fghı	0,46abc	15,5hj	6 d
88	6,51abcdef	0,79bc	1,82bcdef	0,4 ab	16,67 j	5,11 cd
93	8,2ghı	0,77bc	2,05ghı	0,43 ab	11,8abcde	2,9abc
95	5,66 ab	0,63 ab	1,6abc	0,45 ab	13,22bcdefg	3,56abc
99	9,01ıj	0,74abc	2,23 IJ	0,49abc	14,13fgh	3,63abc
112	7,88fghı	0,61 ab	1,96efgh	0,47abc	14,2fgh	2,8abc

*Değerler 10 tekerrür ortalamasıdır

**Tekerrürlerde saptanan ortalama ağırlık (g/bitki) değerlerine uygulanan Duncan testine göre aynı harfi taşıyan işlemler $P=0.05$ olasılıkla birbirinden farklıdır



Şekil 4.11FOC ile bulaşık ortamda EB izolatlarının hıyar bitkilerinin kök yaş ağırlığına etkis



Şekil 4.12 FOC ile bulaşık ortamda EB zolatlarının hıyar bitkilerinin toplam (yeşilaksam + kök) kuru ağırlığına etkisi

İn vitro ve *in vivo* test sonuçları açısından EB izolatları tekrar değerlendirilerek; serada topraksız tarım sisteminde FOC'a karşı etkililik ve EB'lerin bitki içerisinde kolonizasyon denemeleri için **83 ve 99** no.lu EB izolatlarının seçilmesine karar verilmiştir.

4.8. Serada, Topraksız Tarım Sisteminde EB'lerin FOC'a Biyokontrol Etkisinin Testlenmesi

Tez çalışması kapsamında oluşturulan cam sera koşullarında yapılan topraksız tarım çalışmaları, bölüm 3.2.7.2.'de belirtilen yöntem doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. FOC ile bulaşık torfa şaşırtmadan 10 hafta sonra 0-4 skalasına göre elde edilen hastalık şiddeti değerleri ve EB uygulamalarının FOC'a karşı serada topraksız yetiştiricilik koşullarında etkisine ilişkin veriler Çizelge 4.10'da görülmektedir. Sera koşullarında FOC'a özgü tipik hastalık belirtileri elde edilmiş ve Pozitif Kontrolde FOC inokulasyonundan 10 hafta sonra % 55 düzeyinde bir hastalık şiddeti saptanmıştır. EB izolatlarından 83, 99 ve Acibenzolar s methyl (ASM) uygulamaları FOC inokulasyonundan 10 hafta sonra, sera koşullarında, hastalık şiddetini Pozitif Kontrol uygulamasına göre % 48 -52 oranında engelleyen ve istatistiksel olarak Pozitif Kontrol uygulamasından farklı grupta yer alan uygulamalar olmuştur. FOC'a karşı en başarılı uygulama ise 83 no.lu EB uygulaması olmuş, bu

etki kimyasal olarak sistemik dayanıklılığı uyarıcı olan Acibenzolar s methyl uygulamasından da farklı grupta yer almıştır. Böylece, genel anlamda, EB uygulamaları ve Acibenzolar s methyl uygulaması fidelerin şaşırtılmasından hasat dönemi sonuna kadar FOC'a karşı etkililiklerini korumuştur.

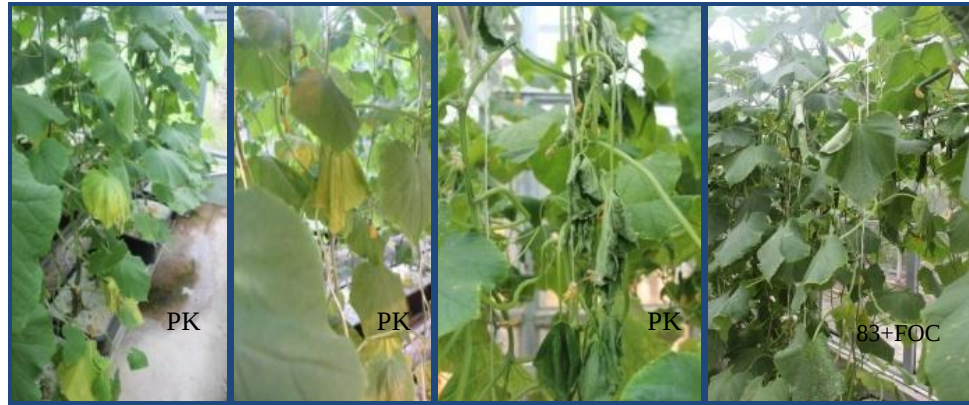
Çizelge 4.10 EB uygulamasının serada topraksız yetiştiricilik koşullarında, perlit ortamında, FOC inokulasyonundan 10 hafta sonra, Fusarium Solgunluğunun gelişimine etkisi

uygulamalar	Tekerrürlerde saptanan skala değerleri (0-4 skalası)*				Ortalama H.şiddeti %	Etki (%) ***
	1	2	3	4		
Pozitif Kontrol	2-2-2-2	1-1-1-2	3-3-2-2	3-3-3-3	55 C**	--
BİON+FOC	0-0-1-2	1-1-1-1	0-1-3-2	2-0-2-0	27 BC	50.9
99+FOC	2-1-1-0	4-2-1-1	1-1-1-0	0-0-1-2	28.1 BC	48.9
83+FOC	1-1-1-1	0-0-0-0	1-2-1-2	2-2-2-2	26.66 B	51.52
Negatif Kontrol	0-0-0-0	0-0-0-0	0-0-0-0	0-0-0-0	0.00 A	100

*Değerler her tekerrürde 4 bitki bulunan 4 tekerrür ortalamasıdır

** Tekerrürlerde saptanan hastalık şiddeti (%) değerlerine uygulanan Duncan testine göre aynı harfi taşıyan işlemler P=0.05 olasılıkla birbirinden farklıdır.

***değerler Abbott formülüne göre uygulamalardaki HŞ% değerlerinin Pozitif Kontrolten farkını göstermektedir

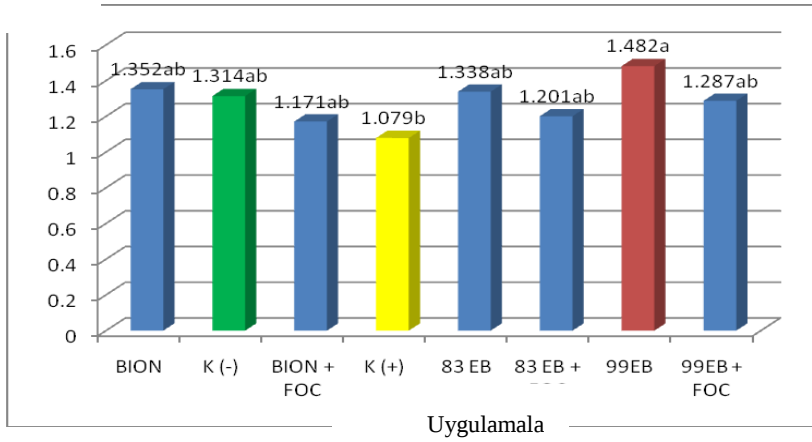


Şekil 4.13 Serada gerçekleştirilen denemede pozitif kontrol (sadece FOC inokule edilmiş bitkiler)'de FOC'un zamana bağlı olarak hıyar bitkilerinde oluşturduğu solgunluk belirtilerinin (solda), 83 no.lu EB uygulaması (sağda) ile karşılaştırılması

EB izolatlarının ve ASM uygulamasının FOC'a karşı biyokontrol etkisi 0-4 skalasına göre değerlendirildikten sonra, FOC baskısının varlığında ve yokluğunda, her uygulamada yer alan tekerrürlerde bulunan bitkilerden elde edilen toplam

pazarlanabilir meyve verimi (g/bitki) de değerlendirilmiştir, elde edilen sonuçlar Şekil 4.14’de yer almaktadır. Şekil 4.14’de görüldüğü gibi; tüm EB uygulamaları ve ASM uygulaması **FOC baskısının olduğu koşullarda**, FOC ile bulaşık torfa şaşırtmadan 10 hafta sonra kümülatif pazarlanabilir meyve verimi açısından Pozitif Kontrol’den farklı grupta yer almıştır. FOC baskısına rağmen, EB uygulamaları ve ASM uygulaması gören bitkilerden elde edilen meyve verimi değerlerine yapılan istatistik analiz sonucunda bu uygulamaların Negatif Kontrol ile aynı grupta yer alarak, hastalığın varlığına rağmen meyve veriminin düşmesine engel oldukları sonucuna varılmıştır.

g/bitki



Şekil 4.14 EB ve ASM uygulamalarının sera koşullarında, FOC varlığında ve yokluğunda toplam pazarlanabilir hıyar meyve verimine etkisi (seraya aktarıldıktan sonra 9 hafta süreyle yapılan üretim sonucunda elde edilen kümülatif meyve verileri)

4.9. EB’lerin ve FOC’un bitki içindeki kolonizasyonunun araştırılmasının sonuçları

83 no.lu EB izolatu için elde edilen kolonizasyon sonuçları Çizelge 4.12 ve Şekil 4.15’de; 99 no.lu EB izolatu için elde edilen kolonizasyon sonuçları ise Çizelge 4.13 ve Şekil 4.16’da verilmiştir:

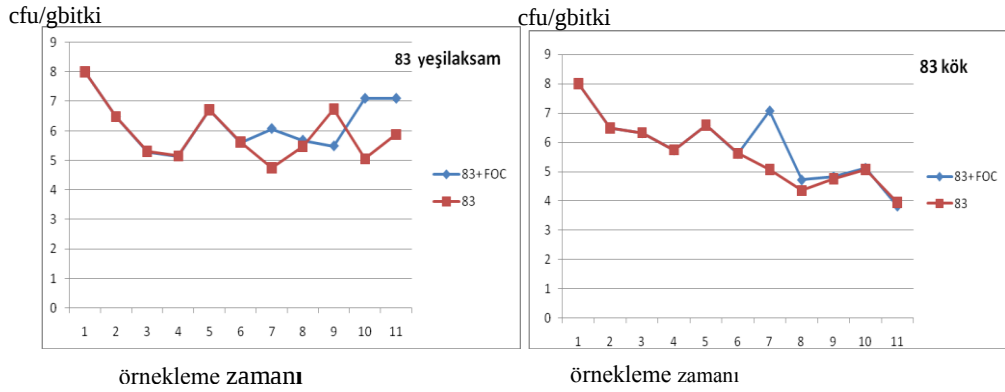
Çizelge 4.11. 83 no.lu EB izolatının FOC ile inokule edilmiş ve edilmemiş hıyar bitkilerinin köklerinde ve yeşil aksamında zamana bağlı olarak kolonizasyonundaki değişim

Örnekleme Zamanı	UYGULAMALAR			
	Yeşil aksam (cfu/ g bitki)*		Kök (cfu/ g kök)*	
	83	83 + FOC	83	83 + FOC
1	1×10^8	1×10^8	1×10^8	1×10^8
2	2×10^6 c	2×10^6 bc	2×10^6 e	2×10^6 cd
3	2×10^5 ab	2×10^5 a	2×10^6 bcd	2×10^6 bc
4	$1,4 \times 10^5$ bc	$1,4 \times 10^5$ ab	$5,4 \times 10^5$ cde	$5,4 \times 10^5$ bc
5	$1,7 \times 10^6$ c	$1,7 \times 10^6$ ab	$3,7 \times 10^6$ de	$3,7 \times 10^6$ cd
6	$4,1 \times 10^5$ c	$4,13 \times 10^5$ ab	$4,1 \times 10^5$ bcde	$4,13 \times 10^5$ bc
7	$5,5 \times 10^4$ bc	$1,1 \times 10^6$ abc	$1,1 \times 10^5$ abcd	$1,1 \times 10^7$ d
8	$1,2 \times 10^4$ ab	$4,8 \times 10^5$ ab	$2,2 \times 10^4$ ab	$5,1 \times 10^4$ ab
9	$5,4 \times 10^6$ abc	3×10^5 abc	$5,6 \times 10^4$ aabc	$6,6 \times 10^4$ ab
10	$1,1 \times 10^5$ bc	$1,2 \times 10^7$ c	$1,1 \times 10^5$ bcd	$1,3 \times 10^5$ bc
11	$7,5 \times 10^5$ a	$1,2 \times 10^7$ c	$8,7 \times 10^3$ a	$6,6 \times 10^3$ a

*Çizelge 3.11’de belirtilen örnekleme zamanı numaralarıdır

**Değerler 3 tekrerrün ortalamasıdır.

83 no.lu izolatın tohumlara uygulanmasından 24 h sonra hıyar tohumlarına yüzey dezenfeksiyonu işlemi uygulanmış ve 2×10^6 cfu/g tohum düzeyinde bir bakteri popülasyonu ile endofitik bakterilerin tohum içine girdiği saptanmıştır. Kotiledon döneminde de bitki içsel dokularında $1,4 - 2 \times 10^5$ cfu/ g bitki düzeyinde bir bakteri popülasyonunun saptanması, EB izolatının tohumdan yeni gelişen bitkiye doğru kolonize olduğunu göstermiştir (Şekil 4.15, Çizelge 4.12). Patojen fungus (FOC) uygulamasından 14 gün sonra da 83 no.lu EB’nin hıyar bitkisinin yeşil aksamında popülasyonud azalma göstermemiş yeşil aksamda 3×10^5 cfu/ g, kökte ise $6,6 \times 10^4$ cfu/g bitki düzeyini korumuştur. Denemenin sona erdirildiği, FOC inokulasyonundan 45 gün sonra elde edilen kolonizasyon sonuçlarına bakıldığında, 83 no.lu EB izolatının hıyar bitkisinin yeşil aksamındaki kolonizasyonu $1,2 \times 10^7$ cfu/g bitki, kökte ise $6,6 \times 10^3$ cfu/g bitki düzeyini korumuştur (Şekil 4.15, Çizelge 4.12). Bu sonuçlar, 83 no.lu EB izolatının patojen baskısı altındaki bitkilerin yeşil aksamında kök dokularından daha iyi kolonize olduğunu göstermiştir. 83 nolu EB izolatının sağlıklı bitki kökünde saptanan popülasyon yoğunluğu kotiledon döneminde 2×10^5 cfu/g kök olurken; denemenin sona erdirildiği dönemde köklerde $8,7 \times 10^3$ cfu/g kök, yeşil aksamda ise $7,5 \times 10^5$ cfu/g bitki düzeyinde saptanmıştır (Çizelge 4.12). Bu sonuçlar, söz konusu bakterinin hıyar köklerinden çok yeşil aksamında daha iyi kolonize olduğunu ve taşınabildiğini göstermiştir.



Şekil 4.15. 83 no.lu EB izolatının FOC ile inokule edilmiş ve edilmemiş hıyar bitkilerinin köklerinde ve yeşil aksamında zamana bağlı olarak kolonizasyonundaki değişim

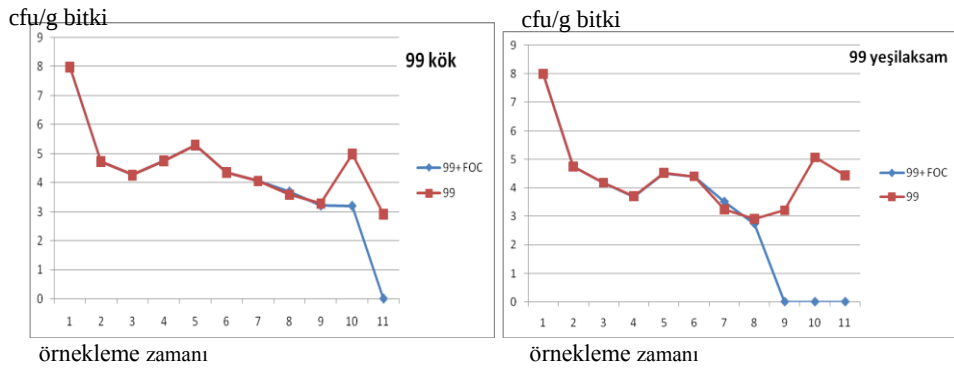
Benzer şekilde, 99 nolu EB izolatının tohumlara uygulanmasından 24 h sonra hıyar tohumlarına yüzey dezenfeksiyonu işlemi uygulanmış ve 5.5×10^4 cfu/g tohum düzeyinde bir bakteri popülasyonu ile endofitik bakterilerin tohum içine girdiği saptanmıştır. Kotiledon döneminde de bitki içsel dokularında $1.5-5,7 \times 10^4$ cfu/g bitki düzeyinde bir bakteri popülasyonunun saptanması EB izolatının tohumdan yeni gelişen bitkiye doğru kolonize olduğunu göstermiştir (Şekil 4.16, Çizelge 4.13). Patojen fungus uygulamasından 14 gün sonra 99 no.lu EB'nin hıyar bitkisinin yeşil aksamında popülasyonu tamamen yok olmuş, köklerde ise $1,6 \times 10^3$ cfu/g kök düzeyine düşmüştür (Şekil 4.16). 99 nolu izolatın, aynı örnekleme döneminde, sağlıklı bitki kökünde saptanan endofitik bakteri popülasyonu yoğunluğu $1,9 \times 10^3$ cfu/g kök olarak saptanırken, yeşil aksamda $1,6 \times 10^3$ cfu/g bitki düzeyine düşmüştür (Çizelge 4.13). FOC inokulasyonundan 45 gün sonraki dönemde, FOC inokule edilmemiş bitkilerin yeşil aksamında 99 no.lu EB popülasyonu $2,7 \times 10^4$ cfu/g bitki olarak saptanırken FOC inokule edilmiş aynı yaştaki bitkilerde 99 no.lu EB izole edilememiştir. Benzer şekilde FOC inokulasyonundan 45 gün sonraki dönemde sağlıklı bitki köklerinde $8,3 \times 10^2$ cfu/g kök olan 99 no.lu EB popülasyonu, FOC inokule edilmiş bitkilerde hiç saptanamamıştır. Bu sonuçlar, söz konusu bakterinin hıyar köklerinde ve yeşil aksamında FOC inokulasyonundan olumsuz yönde etkilendiğini, ancak, sağlıklı bitkilerde de kolonizasyonunun ve popülasyon yoğunluğunun düşerek devam ettiğini göstermiştir (Şekil 4.16, Çizelge 4.13).

Çizelge 4.12. 99 no.lu EB izolatının FOC ile inokule edilmiş ve edilmemiş hıyar bitkilerinin köklerinde ve yeşil aksamında zamana bağlı olarak kolonizasyonundaki değişim

Örnekleme Zamanı*	UYGULAMALAR			
	Yeşil aksam (cfu/ g bitki)**		Kök (cfu/ g kök)**	
	99	99 + FOC	99	99 + FOC
1	1×10^8	1×10^8	1×10^8	1×10^8
2	5.5×10^4 b	5.5×10^4 c	5.5×10^4 ab	5.5×10^4 d
3	1.5×10^4 ab	1.5×10^4 ab	1.5×10^4 ab	1.5×10^4 bcd
4	5×10^3 ab	5×10^3 bc	5.7×10^4 ab	5.7×10^4 cd
5	3.3×10^4 ab	3.3×10^4 bc	2×10^5 b	2×10^5 d
6	2.5×10^4 ab	2.5×10^4 c	2.3×10^4 ab	2.3×10^4 cd
7	1.7×10^3 ab	3.2×10^3 bc	1.1×10^4 ab	1.1×10^4 bcd
8	8×10^2 a	5.4×10^2 ab	3.9×10^3 ab	5×10^3 bc
9	1.6×10^3 a	0a	1.9×10^3 a	1.6×10^3 b
10	1.1×10^5 ab	0a	1×10^5 ab	1.6×10^3 a
11	2.7×10^4 ab	0a	8.3×10^2 ab	0a

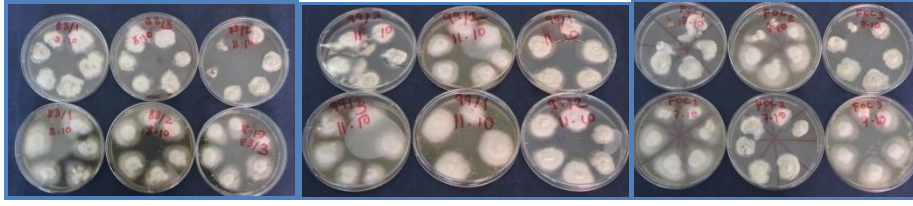
*Çizelge 3.11’de belirtilen örnekleme zamanı numaralarıdır

**Değerler 3 tekrerrün ortalamasıdır



Şekil 4.16. 83 no.lu EB izolatının FOC ile inokule edilmiş ve edilmemiş hıyar bitkilerinin köklerinde ve yeşil aksamında zamana bağlı olarak kolonizasyonundaki değişim

EB uygulaması yapılan ve sadece FOC ile inokule edilen hıyar bitkilerinin farklı kesitlerinde FOC’un kolonizasyonu da parça ekim yoluyla araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.14’de verilmiştir. Sonuç olarak; EB’lerin patojenin bitkiye girişini ve bitki içerisinde fiziksel anlamda ilerlemesini engelleyemedikleri ortaya konmuştur (Çizelge 4.14, Şekil 4.17). Buna rağmen, uygulandıkları bitkilerde hem hastalık şiddetini azaltmaları hem de verimde artış sağlamaları mümkün olmuştur.



Şekil 4.17 Patojen fungus FOC'un endofitik bakteri uygulanmış ve uygulanmamış kontrol bitkilerinde, kök boğazından alınan kesitlerde(9. örnekleme dönemi) izlenmesi (soldan sağa: EB 83+FOC, EB 99+FOC ve sadece FOC)

Çizelge 4.13. Patojen fungus FOC'un endofitik bakteri uygulanmış ve uygulanmamış kontrol bitkilerinde izlenmesi

Örnekleme Zamanı*	Örnek Alma Biçimi	Yüzey dezenfeksiyonu **	Patojenin varlığı***		
			FOC	83+FOC	99+FOC
7	Kılcal kökler	Yok	+	+	+
			+	+	+
8	Ana kök ucu	Yok	+	+	+
			+	+	+
		Var	+	+	+
			+	+	+
9	Sapın altı ve kök boğazı	Var	+	+	+
			+	+	+
10	4. ve 5. Boğum arası	Var	+	+	+
			+	+	+
11	7. ve 8. Boğum arası	Var	+	+	+
			+	+	+
	10. ve 11. Boğum arası	Var	+	+	+
			+	+	+

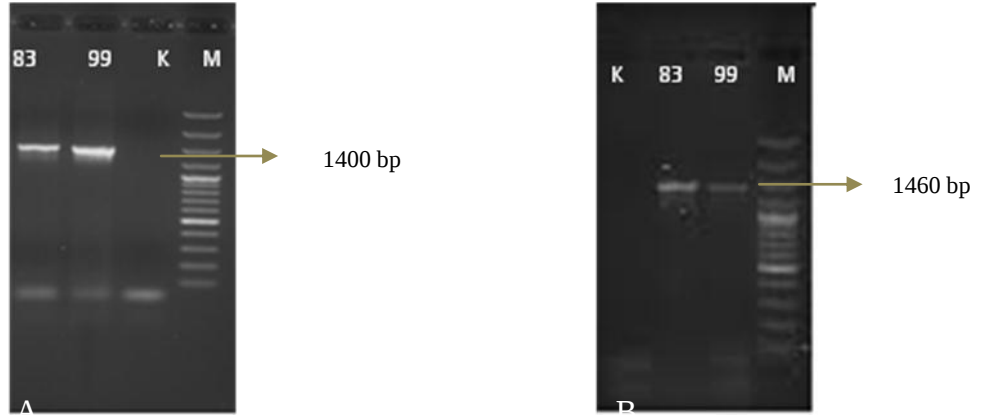
*Çizelge 3.11'de belirtilen örnekleme zamanı numaralarıdır

**İzolasyonda KOM ve MGA ortamları kullanılmıştır

***Sonuçlar 3 tekrardan elde edilmiştir.

4.10. Seçilen EB İzolatlarının Konvensiyonel Ve Moleküler Tanılama Çalışmaları Sonuçları

16s rRNA primerleri kullanılarak yapılan PCR çalışması sonucunda Fd1/Rp2 için 1400 bp ve 27F/1492R için 1460 bp elde edilmiştir (Şekil 4.18). PCR ürünleri sekansa gönderilmek üzere tekrar çoğaltılmıştır.



Şekil 4.18. Çalışmada etkili bulunan EB'lerin 16 s r RNA hedef bölgesine göre dizayn edilmiş olan fD1/rp2 (A) ve 27f/1492r (B) primerleriyle elde edilen PCR ürünlerinin Agarose jelde 1400 ve 1460 bp'de oluşturduğu bantların görüntüsü (M:1kb Ladder DNA, K: Negatif kontrol)

Her iki 16 s rRNA primerinden elde edilen sekans sonuçları NCBI veri tabandaki bilgiler ile karşılaştırılarak 83 no.lu EB izolatının *Pantoea agglomerans* (*Pantoea agglomerans* strain NBRC 102470, % 99) ve 99no.lu EB izolatının ise *Bacillus thuringiensis* (*Bacillus thuringiensis* Bt407, % 99) olduğu saptanmıştır.

5.TARTIŞMA

Hıyar bir çok ülkede ekonomik öneme sahip bir üründür. *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum*'un neden olduğu solgunluk, dünyanın hıyar yetiştirilen bölgelerinin tümünde tespit edilmiştir (Martyn, 1996; Fitiller et al., 1978) ve hıyar üreticileri için önemli bir ekonomik tehdit olarak belgelenmiştir (Jenkins and Wehner, 1983; Martinez et al., 2003; Martyn, 1996; Neshev 2008).

Fusarium solgunluğu hastalığının vektörle taşınması, konukçu dizisi ve virulensliğindeki bilinmeyenler hastalık döngüsünün yeterince anlaşılmasına ve dolayısıyla mücadelesinin sınırlı olmasına yol açmaktadır. Çünkü, *F. oxysporum*'ların patojenik ve non patojenik strainleri birçok bitkide asimptomatik olarak konukçu dizisinde yer almaktadır (Abdullah and İsmail, 1976; Katan, 1971), ve *F. oxysporum*'un patojenik olmayan izolatları biyolojik kontrol etmeni olarak patojenik formae Spéciallere karşı kullanılmaktadır (Alabouvette, 1990; Haridon et al., 2011; Paulitz et al., 1987; Postma and Rattink, 1992).

Fusarium solgunluk hastalıklarını kontrol etmek oldukça zordur (Borrero et al., 2006; Elmer, 2006). *Fusarium* solgunluğuna karşı mücadele yöntemleri arasında kimyasal, kültürel ,biyolojik kontrol metotları ve hastalığa dayanaklı çeşitlerin kullanımı yer almaktadır. Bu yöntemlerden, dayanıklı çeşit kullanımı hastalıkların azaltılmasında, kimyasal ve kültürel mücadele yöntemlerine kıyasla, daha başarılı bulunmaktadır. Son yıllarda, biyolojik kontrol ajanlarının kullanımı *Fusarium* solgunluğu kontrolünde çevre dostu bir yaklaşım olarak değerlendirilmektedir. Kloepper et al. (1999) ve Gray and Smith (2005), çalışmalarıyla bazı PGPR'ların kök içine girebileceğini ve endofitik popülasyon oluşturabileceğini vurgulamışlardır. İçsel kök dokularını kolonize eden endofitik bakterilerin bitki gelişimini ve bitki sağlığını artırabileceği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Sturz et al., 1997).

Endofitik bakterilerin biyolojik savaş elemanı olarak kullanılmak üzere mükemmel adaylar olabileceği literatürlerden anlaşılmaktadır. Bu tez kapsamında; açık ve örtü altında yetiştirilen hıyar bitkilerinden endofitik bakteriler izole edilmiştir ve FOC'a karşı biyokontrol aktiviteleri açısından *in vitro* ve *in vivo* koşullarda testlenmiş ve bu testlerin sonucuna göre hastalık etmenine karşı etkili olan bakteriyel

endofitler saptanmıştır. Bu çalışmada EB'ler açısından dikkati çeken bir diğer olgu, hıyar bitkilerinin içsel dokularının EB popülasyonu açısından varlığı olmuştur.

Endofitik bakteriler için uygulanan izolasyon prosedürü, endofit araştırmalar için anahtar rol oynamaktadır. Teorik olarak, gerçek endofitler bitkilerin içsel dokularında aranmalıdır. Bu nedenle etkili ve güçlü bir yüzey seterilizasyonu çok önem taşımaktadır. Çeşitli teknikler endofitik bakterilerin izolasyonu için kullanılmıştır, her birinin avantajları ve dezavantajları bulunmaktadır. Endofitik bakterilerin izolasyonu için en yaygın yöntemlerden birisi tritürasyon yöntemidir. Bu süreç sodyum hipoklorit de dahil olmak üzere farklı dezenfektanlar kullanarak yapılmaktadır (Fisher et al., 1992; Gardner et al., 1982, Hinton and Bacon 1995; Quadt-Hallmann et al., 1997a, 1997b). Odunsu dokuların çok sert olması nedeniyle, tritürasyon yöntemi için uygun değildir ve imprinting yöntemi bu sorunu çözmek için kullanılan başarılı bir yöntemdir.

Endofitik bakteriler kök, gövde, yaprak, tohum, meyve, yumru, ovüller ve ayrıca baklagil nodülleri içinde ve hemen hemen bitkilerin her yerinde bulunmalarına rağmen (Hallmann et al., 1997; Sturz et al., 1997; Benhizia et al., 2004), bitkilerin toprak altındaki parçalar toprak üstü dokulara oranla endofitler açısından daha zengindir (Rosenblueth and Martinez-Romero, 2004). Bu tez çalışmasında elde edilen izolatlardan % 28.42'si yapraktan ve tritürasyon yöntemi ile, % 71.6'sı ise kök ve gövdeden imprinting yöntemi ile elde edilmiştir. Bu açıdan bakıldığında, tez çalışmasında elde edilen veriler literatür ile uyumludur ve bitkilerin kök/gövde dokuları endofitik mikrororganizmalar açısından daha varsıdır.

Endofitik bakterilerin birçok bitkinin çiçek, yaprak, meyve, gövde, kök ve tohumlarından izole edilebildiğini belirten yayınlar ağırlıktadır (Lilley et al., 1996). Bu tez çalışmasından elde edilen sonuçlar, önceki çalışmalar ile uyum göstermiştir. Mundt and Hinkle (1976), 27 bitki türünün tohumlarında ve ovüllerinde bulunan 19 genus ve 46 bakteri türünü kapsayan 395 endofitik bakteriyi tanılamışlardır. Hıyar

bitkisinden izole edilen endofitik bakterilerin *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Chryseobacterium*, *Clavibacter*, *Curtobacterium*, *Enterobacter*, *Micrococcus*, *Paenibacillus*, *Phyllobacterium*, *Pseudomonas*, *Serratia* ve *Stenotrophomonas* vb. gibi bakteriyel genuslar içerisinde yer aldığı yapılan çalışmalar ile bildirilmiştir (Mahaffee and Kloepper, 1997a, 1997b; Mc Inroy and Kloepper, 1995). Bu tez çalışması kapsamında, sağlıklı hıyar bitkilerinin kök, gövde ve yapraklarının içsel dokularından izole edilen toplam 104 EB izolatının % 39'unun Gram (-), % 44'ünün Gram (+) ve % 17'sinin floresan *Pseudomonas* grubundan endofitik bakteriler olması EB çeşitliliği konusundaki literatür verilerini desteklemektedir.

Endofitler birçok yollarla bitki büyümesini teşvik edebilmektedirler. Bu yollar arasında fosfat parçalama aktivitesi (Verma et al., 2001; Wakelin et al., 2004), indol asetik asit üretim (Lee et al., 2004) ve siderofor üretimi bulunmaktadır. Ayrıca endofitik bakterilerin bitkiler için gerekli vitamin sağlamak (Pirttilä et al., 2004), ozmotik ayarlama yanında stomaların düzenlenmesi, kök morfolojisi değiştirilmesi, minerallerin artırılmış alımı ile birlikte azot birikimi değişmesi (Compant et al., 2005a, 2005b) sayılabilmektedir.

Pseudomonas, *Enterobacter*, *Staphylococcus*, *Azotobacter* ve *Azospirillum* 'un bazı strinleri tarafından üretilen etilen, oksinler veya sitokininler gibi bitki büyüme düzenleyicileri, bitki büyümesini ve geliştirmesini nedensel ajantalar olduğu düşünülmektedir (Arshad and Frankenberger, 1991; Bashanlarin and Holguin, 1997; Leifert et al., 1994). Indol-3 asetik asit (IAA), hücre uzaması gibi hem hızlı yanıt ve hem , hücre bölünmesi ve farklılaşma gibi uzun vadeli yanıtları uyarabilen bir oksindir (Taghavi et al., 2009). Örneğin, bazı *Azospirillum* strinleri Bazı Gramineae köklerini endofit olarak kolonize elemektedir. *Azospirillum*'un bitki köklerine aşılamaadan sonra gözlemlenen bitki büyüme teşviği, bakteriyel oksin üretimi ve salgılanmasının bir sonucu olduğu düşünülmektedir (Barbieri and Galli, 1993).

Patel et al. (2012), domatesten elde edilen 18 endofitik arasından 8'inin fosfat çözülebilme aktivitesini göstermiştir. Sonuçlar PGPR strainlerinin çoğunluğunda fosfat çözücü etkinliğinin var olduğunu saptanmıştır.

Bu tez çalışması kapsamında yapılan *in vitro* testlerde toplam 104 izolattan yaklaşık %96'si IAA üretimi %50'si sidrofor üretimi ve %33'u soafat çözme yeteneğine sahip olduğu saptanmıştır, ve bu sonuçlar endofit bakterilerin bitki büyümesini teşvik etmesinde yüksek potansiyele sahip olduğunu göstermektedir.

Azospirillum, *Azotobacter*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* EB'lerinin bazı strainleri oksin, etilen, sitokinin ve giberellin gibi bitki hormonları üreterek bitki gelişiminde artış sağlamaktadır. Bu büyüme düzenleyiciler düşük konsantrasyonlarında bitki büyümesini sağlarlar ve büyüme hormonlarında küçük miktarlarda artışı bitki morfolojisi üzerinde olumsuz etkileri olabilir. Örneğin, IAA (indol asetik asit) hormonunun üretimi o bakterilerin bulunduğu bitki üzerinde yıkıcı etkilere neden olabilir. Bitkilerin büyümesini sağlayan yararlı strainlere göre zararlı strainlerde bu hormon yedi kat daha fazladır bu yüzden hormon üretiminde artış, bitkilerin büyümesi ve morfolojisi üzerinde olumsuz etkiler yapabilir. Bu durum, tez çalışması kapsamında yapılan vigorite testinden elde edilen bazı olumsuz sonuçların açıklanmasına katkı sağlayabilir. Tez çalışmasından elde edilen VI testi sonuçlarına göre; teslenen toplam 33 izolattan %50'si VI üzerinde kontrole göre olumsuz etki göstermiştir. Endofit bakterilerin yüksek miktarda IAA, abscissik asit (ABA) (Cohen ve ark.,2008) gibi inhibitör hormonlar üretmesi ya da diğer kimyasal maddeler bu olumsuz etkinin nedeni olabilir.

Endofitik mikroorganizmaların etkisi ile bitki hastalıklarının baskılanması birçok patosistemde gösterilmiştir (Narisawa et al., 1998). Endofitik bakterilerin, fungal gelişimi baskılama yeteneğine sahip olduğunu gösteren birçok çalışma bulunmaktadır. Çeltik tohumlarından izole edilen bazı endofitik bakterilerin, *Rhizoctonia solani*, *Pythium myriotylum*, *Gaeumannomyces graminis* ve *Heterobasidium annosum*'a karşı güçlü bir antifungal etkiye sahip olduğu gözlemlenmiştir (Mukhopadhyay et al.,1996).

Endofit biyokontrol ajanlarının biyokontrol mekanizmaları arasında; antifungal ya da antibakteriyel maddelerin üretimi (Lambert et al., 1987; Leyns et al., 1990; Maurhofer et al., 1992),sidrofor üretimi (Kloepper et al., 1980; Schroth and Hancock, 1981; Duijff et al., 1993),besin rekabeti (Lockwood, 1990; Kloepper et al., 1980), yer rekabeti (Cook and Baker, 1983) ve dolaylı olarak sistemik kazanılmış

ayanıklılık veya bağışıklık teşviki (Chen et al., 1995; Ku'c, 1990; Liu et al., 1995a, 1995 b; Tuzun and Kloepper, 1994; Van Peer et al., 1990; Wei et al., 1991) sayılabilir. Bu mekanizmalar bir çok literature göre kök bakterilerinin etkileri ile de ilgilidir.

Pleban et al., (1995) farklı tohum ve bitki dokularından izole ettikleri *Pseudomonas fluorescens* ve *Bacillus* spp. gibi endofitik bakterileri bir ya da birden fazla bitki patojenine karşı testlediklerinde; *Rhizoctonia solani*, *Pythium ultimum* ve *Sclerotium rolfsii*'yi etkili şekilde engellediğini bildirmişlerdir. *Pseudomonas* ve *Bacillus* sp gibi endofitlerin pamuk, kolza, domates, hıyar ve fasulye bitkilerinde kullanılması fungal patojenlere karşı biyolojik kontrolün yanı sıra bitki gelişmesinin de artmasına neden olmuştur (Alström, 2000; Chen et al., 1995; Liu et al., 1995; Safiyazov et al., 1995; Sturz et al., 1999; Tuzun and Kloppe 1994, Wei et al., 1991).

Sturz et al. (1999), bazı endofitik bakteri topluluklarının patojenlere karşı gösterdiği savunma mekanizmalarının, bakterilerin konukçu bitkilerde bulundukları yerler ve yerleştikleri spesifik doku tipleri ile yakından ilişkili olduğunu ileri sürmüştür.

Fusarium oxysporum'u kontrol etmek için biyolojik yaklaşım, birçok kültür bitkilerinde popüler hale gelmektedir. Çok sayıda endofitik mikroorganizmanın *Fusarium*'a karşı biyolojik kontrol etmeni olarak potansiyel rolü araştırılmıştır Karabiber köklerinden *F. oxysporum*'u kontrol etme potansiyelini sergileyen beş endofitik bakteri izole edilmiştir (Lixiang et al., 2004; Edkona et al., 2013)

Ma et al., (2013), *Panax notoginseng*'in kök, gövde, yaprak sapı, yaprak ve tohum gibi beş farklı bölgesinden endofitik bakterileri izole etmiş ve bunların *P. notoginseng*'de kök çürüklüğü kompleks hastalığı ile ilişkili üç ana patojen olan *F. oxysporum*, *Ralstonia* sp. ve *Meloidogyne hapla*'ya karşı antagonistik aktivitesini değerlendirmiştir. 104 antagonistden, 51'i tek bir patojene karşı antagonistik faaliyet gösterirken; sırasıyla, 43 ve 10'u ise, iki ve üç patojene karşı faaliyet göstermiştir. Tüm dokularında en baskın tür *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* ve *Bacillus methylotrophicus* olmuştur ve *P. notoginseng* kök çürüklüğü kompleks

hastalığından sorumlu olan her üç patojene karşı etkili antagonistler olarak kabul edilmiştir.

Endofitik bakteriyel biyolojik ajanları iki gruba ayrılabilir:(i) yoğun bir şekilde bitki iç dokuların kolonize eden ve yer için yarışan, antibiosis veya her iki şekilde patojenleri bastıran strainler, ve (ii) öncelikle kök korteksini kolonize eden, ve bitkinin savunma/ dayanaklılık mekanizmalarını uyaran strainler. Bitkilerin daha geniş ve sürekli kolonizasyonu birinci tip endofitler için gerekli olabilir, çünkü patojen propagülü ile karşılaşma rastlantısal antagonizm için gerekli olacaktır.

Endofitik bakterilerin büyük çoğunluğu, *in vitro* 'da fungal patojenlere karşı antibiosis etkisi gösterebilmesine rağmen, çok azı kök dokuları içerisinde fungal patojenleri antibiosis mekanizması yoluyla kontrol edebilme yeteneği gösterebilmiştir (Krechel et al., 2002; Sturz et al., 1999).

Hücre duvarının parçalanması, endofitik bakterilerin fungal patojenleri kontrol etmede kullandıkları bir mekanizmadır. Patates köklerinden izole edilen endofitik bakteriler, kitinaz, glukanaz, sellulaz gibi hidrolitik enzimleri yüksek seviyelerde ürettiği bildirilmiştir (Krechel et al., 2002).

Chen et al., (1995), pamuk bitkisinin içsel dokularından izole ettiği 170 bakteri straininin 40'ının pamuk bitkisinde *Rhizoctonia solani*'ye karşı aktif biyokontrol sağladığını, 25'inin ise hıyar bitkisinde *Colletotrichum orbiculare*'ye karşı sistemik dayanıklılığı uyardığını yaptıkları çalışmalar ile göstermiştir.

Büyük olasılıkla, endofitik bakteriler aracılığıyla çeşitli biyolojik savaş mekanizmaları kombinasyon şeklinde iş görmektedir. Bu düşünce bazı antimikrobiyal bileşiklerin hem antibiosis ve hem ISR'nin tetiklenmesiyle ilgili olması gerçeği ile desteklenmektedir (Ongena et al., 2007).

Bitkiler bazı durumlarda, fitopatojen saldırılarında hastalığı baskılayıcı tepkilerin bir parçası olarak bakteriler ile ortak ilişki içerisine girebilir. Endofitik bakteriler, böyle korunma tepkilerinin uyarılmasında görev almaktadır. Son çalışmalar, endofitik bakterileri de içeren bazı rhizobakterilerin, etilen ve jasmonik

asitden bağımsız, salisilik asite bağımlı olan sistemik korunmanın oluşumunu tetiklediğini göstermiştir. ISR oluşmasını sağlayan kök bakterileri rhizosferde zaten var olan yoğun bakteri mikroflorasında bulunabilmektedirler. Fakat bitkide ISR'yi uyaran kök bakterileri arasında spesifik bir tanıma şarttır (Pieterse et al., 1998). Ayrıca bu bakterilerin belirli bir populasyon yoğunluğuna ulaşması gerektiği ve bu eşiğin turpta yapılan bir çalışmada gram kökte 10^5 cfu/ml olduğu belirlenmiştir (Raaijmakers et al., 1995). Genel kanı olarak bu eşiğin diğer pato-sistemlere de uyarlanabileceği düşünülmektedir.

Bu tez kapsamında biyokontrol özellikleri ve bitki içinde kolonizasyonları açısından daha detaylı çalışılan 83 ve 99 no.lu EB izolatları biyokontrol ve bitki gelişimini artırma konusunda başarılı olan iki izolattır. Üstelik, bitki içindeki kolonizasyon ve populasyon yoğunluklarına bakıldığında; Raaijmakers et al., (1995) tarafından öne sürülen eşik değer olan 10^5 cfu/g bitki değerine genel olarak ulaştıkları dikkati çekmektedir. Bu eşik değer özellikle ISR açısından önem taşımaktadır. Bu tez çalışması sırasında, örtü altı topraksız tarım sisteminde yaklaşık 2 ay süreyle yapılan üretimde, 83 ve 99 no.lu EB uygulamalarının sistemik dayanıklılığı kimyasal olarak uyaran ASM ile istatistiksel olarak aynı grupta yer alarak FOC baskısına rağmen Pozitif Kontrol uygulamasına göre başarılı bulunmalarını klasik biyolojik savaş mekanizmalarıyla açıklamak pek mümkün değildir.

Amerika Birleşik Devletlerinde yapılan bir çalışmada *F.oxysporum* f. sp. *cucumerinum*'a karşı *Pseudomonas putida* kullanılmıştır. Yapılan deneyler sonucunda *P. putida* ile uygulama görmüş hıyar bitkileri kontrolle karşılaştırıldığında kontrole göre hastalık çıkışında % 40 oranında bir azalış olmuştur. Yapılan deneyler sonucu buradaki etkinin siderofor etkiden kaynaklandığı anlaşılmıştır (Scher and Baker, 1982). Bu tez çalışmasında kullanılan 83 no.lu EB izolatı, 99 no.lu EB izolatına oranla biyolojik savaş potansiyeli açısından dikkati çekmiştir. Özellikle 83 no.lu EB izolatının *in vitro*'da güçlü siderofor salgılama yeteneği göstermesi, Fe^{+3} için yarışmanın yanı sıra ISR'nin de determinanı olarak kabul edilmektedir.

Endofitik bakterilerin, ISR'yi tetiklediğine dair ilk kanıt 1991 yılına aittir. Daha sonraları 89B-61 olarak dizayn edilen, *Pseudomonas fluorescens* strain G8-4'ün tohumlara uygulanmasının ardından bitkilerin içsel dokularında kolonize olduğu ve hıyar antraknozuna karşı sistemik korumayı tetiklediği saptanmıştır (Wei et al., 1991).

ISR-uyarıcı *P. fluorescens* WCS417r ile işlem gören *A. thaliana* bitkisinde ISR-uyarıcı genler microarray analizleri ile taranmıştır. Araştırmacılar, kök içerisinde regule edilmiş 97 gen ile karşılaşırken, gövdede farklı bir gen regulasyonu ile karşılaşmamışlardır. Ancak, araştırmacılar bitki patojeni, *P. syringae* pv. *tomato* ile bitkinin inokule edilmesinin ardından, *P. fluorescens* WCS417r ile ön işlem görmüş bitkilerin gövdelerinde regule olan 81 gen bulmuşlardır. Dolayısıyla bitkilerin, ISR yoluyla patojen saldırısına karşı dayanıklılıklarının tetiklendiği yapılanbu çalışma ile gösterilmiştir (Verhagen et al., 2004).

Serratia marcescens strain 90-166'nın, bitkinin içsel kök dokularını kolonize ettiği ve çeşitli hıyar hastalıklarına karşı, ISR'yi tetiklediği araştırmalar ile belirlenmiştir (Press et al., 2001). Liu et al., (1995a), *Fusarium* solgunluğuna karşı ISR'nin tetiklenmesini, bölünmüş-kök sistemi (Split-root system) yöntemini kullanarak göstermiştir. Fidelerin kök sistemleri, mekanik olarak iki kısma ayrılmış ve daha sonra her kısım ayrı bir saksı içerisine yerleştirilmiştir. Bir saksıya strain 90-166 uygulanırken, diğer saksıya patojen uygulanmış. 6 aylık deneme süresi sonunda, strain 90-166'nın ölen bitkilerin sayısını ve hastalık şiddetini önemli ölçüde azalttığını gözlemlemiştir.

Liu et al. (1995b), başka bir çalışmada *Serratia marcescens* strain 90-166'nın, köşeli yaprak lekesine (*Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*) karşı ISR'yi tetiklediğini göstermiştir.

Jetiyanon and Kloepper (2002), Tayland'da, bazı kültür bitkilerinde ISR'yi tetikleyen, endofitik *Bacillus* spp. ile yaptıkları sera denemeleriyle, tropikal tarımda endofitik bakteriler ile ISR'nin tetiklenmesi sürecini araştırmışlardır. Çalışmalarında, domatesde *Ralstonia solanacearum*; biberde *Colletotrichum gloeosporioides*, lahanagillerde *Rhizoctonia solani* ve hıyarda CMV (*Cucumber mosaic virus*-) içeren

4 farklı konukçu-patojen sistemini kullanmışlardır. Çalışmanın hedefi, dört konukçu-patojen sisteminin tümünde, ISR'yi tetikleyen endofitik spor oluşturan bakterilerin karışımını bulmaktır. Bu amaçla 7 bireysel strain ve 2 strainin 11 farklı kombinasyonu test edilmiştir. *B. amyloliquefaciens* IN937a straini ve 4 strainin karışımı (IN937a+B. subtilisIN937b; IN937b + *B. pumilus* SE34; IN937b + *B. pumilus*SE49; ve IN937b + *B. pumilus* INR7) bu dört hastalığın tümünün oranını ve şiddetini önemli ölçüde azaltmıştır. Elde edilen sonuçlar 2 önemli nedene dikkat çekmektedir. Birincisi, spesifik endofitik bakteri strainlerinin tetiklediği ISR'nin, tropikal koşullar altında hastalıklara karşı konukçu bitkileri koruyabileceğini gösterirken, ikincisi ise, iki bakteriyel strainin karışımının, farklı patojenlere karşı farklı konukçuların korunmasını bireysel strainlere göre daha önemli oranda gerçekleştirebildiği yapılan bu çalışmayla gösterilmiştir.

Son zamanlarda bakteriyel endofitlerin patojenlerin biyolojik kontrolünün yanı sıra aynı zamanda büyümeyi de artırma gibi konukçu bitkiler üzerinde olumlu etkilere sahip olabileceği gösterilmiştir (Downing and Thomson, 2000; Ryu et al., 2005; Sturz et al., 1999). Bazı çalışmalar endofitik mikroorganizmaların bitkilerin büyümesini destekleyici potansiyelinin rizosfer mikroorganizmalarından (Reiter et al., 2002; van et al., 1993) daha yüksek olduğunu göstermiştir, ancak bitki büyümesinde bakteriyel endofitlerin rolleri henüz tam olarak anlaşılamamıştır.

Birçok endofitik bakterinin bitki büyümesini teşvik ettiğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Zachow et al., 2010; Malfanova et al., 2013). Endofitlerin aracılık ettiği doğrudan bitki büyümesinin teşvik edilmesi çoğunlukla bitkiler için hormonlarının üretim ve / veya düzenlenmesine ve gerekli besinlerin sağlanmasına dayanmaktadır. Çeşitli bitki dokularından çok sayıda endofitik mikroorganizma bildirilmiştir ve bu endofitler farklı yararlı özelliklere sahiptirler. Endofit bakterizasyonu bitki büyümesini teşvik eder, baklagillerde daha fazla azot fiksasyonuna yardımcı olur. Bu özellikleri, endofitlerin tarımsal ekosistemlerde başarı olmasının önemli yönüdür.

Kırmızı yoncada bakteriyel endofitler çoğu zaman *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* ile kombinasyon halinde uygulandığında, tek başına uygulanmasına oranla bitki büyümesini teşvik etmektedir (Turz et al., 1997). Ancak, *Bacillus*

megaterium, *Bordetella avium* ve *Curtobacterium luteum* tutarlı olarak tek başına veya *R. leguminosarum* biovar *trifolii* ile birlikte bitki büyümesini teşvik etmektedir. *R. leguminosarum* biovar *trifolii*'nin nodulasyonu *Bacillus insolitus*, *B. brevis* veya *Agrobacterium rhizogenes*'ile birlikte inokule edildiği zaman teşvik edilmiştir. .

Paenibacillus macerans'ın iki straini, sera koşulları altında bir orkide türü olan *Cymbidium eburneum*'da bitki gelişimini teşvik etmiştir (Faria et al., 2013). Bakterilerin inokule edildiği uygulamaların hiçbirinde bitkilerin büyümesi üzerinde zararlı bir etki saptanmamıştır. Bu sonuçlar, bu bakteriyel endofitlerin orkide fidelerinin iklime alıştırılması sırasında bitki büyümesini teşvik ederek potansiyel bir yarar sağladığını düşündürmektedir. Endofitik bakterilerde bulunan birden fazla özelliğin varlığına bağlı olarak, test edilen tüm kültürlerde bitkisel verimlilikte artış gözlemlenmiştir.

Kang et al. (2006), tarafından yapılan bir çalışmada *Pseudomonas rhodesiae* ve *Pantoea ananatis*'tan iki indofit strin Biber fidelerinin içirme şeklinde uygulaması , biber'de önemli bir büyümeyi teşvik etmiştir ve sırasıyla %73,9 ve %41,5 kök taze ağırlığı artmıştır. Ayrıca İki strin *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*' ya karşı bitkilerin uyarılan sistemik dayanaklığı ortaya çıkarmış.

Endofitik bakterilerin çeltik, mısır, patates ve yonca gibi bitkilerde büyümeyi artırdıkları bildirilmiştir. Sturz et al. (1998), yonca ve patatesten izole edilen bakteriyel endofitlerin , patates bitkilerinin büyümesindeki rolünü test etmişlerdir. Bu çalışmada izolatların % 21'i bitki büyümesinin artmasına neden olmuştur. Bu izolatlar yeşil aksamın ağırlığında % 66, bitki boyunda % 63 ve kök ağırlığında % 55 oranında artışa neden olmuştur. İzolatların% 24'ü ise bitkilerde büyümeyi azaltmış ve izolatların% 56'sının da bitki büyümesi üzerinde herhangi bir etkisi olmamıştır. Bu tez çalışması kapsamında yapılan *in vivo* saksı denemesinde EB'lerin FOC ile bulaşık ortamda bazı bitki büyüme parametrelerinin ölçülmesinden elde edilen sonuçlara baktığımızda; denenen toplam 24 izolattan %88'i pozitif kontrole göre bitkinin yaş yeşil aksamında % 7-60 oranında artışa neden olmuştur. İzolatların %3'ü bitkilerde büyümeyi azaltmış, % 9 'u ise bitki büyümesi üzerinde herhangi bir etki göstermemiştir.

Bakterilerin vasküler dokuların kolonizasyonu ile ilgili olarak, en önemli tartışma konusu endofitik bakterilerin vasküler sistemi bitki içerisinde taşınmaları ve çoğalmaları için kullanmalarına rağmen, bitkilerde patojen olan ve iletim sistemiyle taşıyıp orada çoğalan bakteriler gibi solgunluk ve hastalığa neden olmamalarıdır. Bunun ana nedeninin, endofitik bakterilerin, bitki patojeni bakteriler gibi ksilem kanallarını tıkayacak yüksek bir popülasyona asla ulaşmamaları olabilir. İletim sistemi içinde endofitik bakterilerin nüfusu nispeten düşüktür, bu nedenle yararlı endofitler vasküler dokuları daha az kolonize etmekte ve daha az yer kaplamaktadır.

In vivo koşullar altında, inokulum yoğunluğu, sıcaklık, nem, konukçu genotipi gibi faktörlerin endofitik bakterilerin kolonizasyonunu etkilediği bildirilmiştir (Pillay and Nowak, 1997) . Örnekleme zamanı ve konukçunun gelişme aşamasında, gelişme sezonu boyunca oluşan dalgalanmalara bağlı olarak da popülasyon yoğunluğunun değişebileceği bildirilmiştir (McInroy and Kloepper, 1994, 1995a).

Fisher et al, (1992) tarlada mısır bitkilerinde endofitik bakterilerin dağılımını incelemişler ve bitkilerin toprağa yakın olan bölümlerinde üst kısımlarına göre daha yoğun kolonize olduğunu bildirmişlerdir. Genel olarak, kökboğazı ve kök dokuları, endofit bakterilerin sayı ve biyoçeşitlilik açısından zengin olduğu alanlardır. Farklı bitki dokularında endofit bakterilerin popülasyonlarının 10^3 - 10^6 cfu/g ve ender olarak 10^7 cfu/g ile sınırlı olduğu bildirilmiştir (Chanway, 1998). Endofit bakteriler arasındaki yüksek biyoçeşitliliği Mundt ve Hinkle (1976) ile Mc Inory ve Kloppe (1995) belirtmiştir. Farklı bitkilerin değişik kısımlarından en sık izole edilen endofit bakteriler Hallmann et al., (1997) ve Kobayashi ve Palumbo (2000) tarafından özetlenmiştir. Bu incelemelerin bazılarında endofit bakteriler hem bitki gelişimini artırma hem biyolojik kontrol özelliği göstermiştir.

Başlangıçtaki inokulum miktarından bağımsız olarak, endofitik popülasyonlar bitki dokularına bağlı olarak optimal büyüklüğe ulaşma eğilimlidir. Endofitik *Pseudomonas sp.* ile inokule edilmiş olan patateslerde, kök popülasyonunun final popülasyon yoğunluğu 1×10^6 cfu/cm olup başlangıç popülasyonuna göre artış gösterirken, gövde final popülasyon yoğunluğu, 3.3×10^5 cfu/cm başlangıç popülasyonundan, 1.9×10^3 cfu/cm popülasyon yoğunluğuna doğru düşüş göstermiştir (Frommel et al., 1991).

Pamuk bitkilerine gövde enjeksiyonu yolu ile endofitik bakterilerin uygulanması, *Rhizoctonia solani*'nin neden olduğu kök çürüklüğü ve *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*'un neden olduğu vasküler solgunluk hastalığının oluşumunu azaltmıştır (Chen et al., 1995). Bu durumda olduğu gibi, endofitik bakteriler uygulandıkları noktalardan aşağı ve yukarı doğru taşınabilir, içsel dokularda kolonize olabilir ve vasküler silindir içerisine herhangi bir patojenin girişini engelleyebilir. 83 no.lu EB izolatu bitkinin yeşil aksamından izole edilmiştir ve oraya ulaşmak için iletim demetlerinden ve ksilemden geçmek zorundadırlar. Diğer taraftan FOC da genelde bitkinin ksileminde gelişmekte ve yayılmaktadır. Bu yüzden EB'ler ve FOC'un yan yana gelmesi ve aralarında etkileşim olması mühtemeldir. Tez çalışmasında EB'lerin kolonizasyonu konusunda dikkati çeken bir bulgu da, 83 no.lu EB'nin yeşil aksamdan izole edilmiş olması ve bu bakterinin yeşil aksamdaki kolonizasyonunun kök aksamına göre daha başarılı olmasıdır. 99 no.lu EB izolatu ise kök aksamından izole edilmiştir ve bunun da kökteki kolonizasyonu daha başarılı bulunmuştur. Kesin bir genelleme yapılamasa da; endofitik bakterilerin izole edildikleri niche'ye daha kolay uyum sağlamalarının da mümkün olabileceği düşünülebilir.

83 ve 99 nolu izolatların kolonizasyon ve popülasyon dinamiğine bakıldığında; farklı aşamalarda dalgalanmalar gözükse de, özellikle 5. Dönemde yani EB süspansiyonlarının hıyar fidelerine içirme biçiminde ikinci kez uygulandığı dönemde popülasyonlarında bir artış gözükmemektedir ve bu fark daha sonra devam etmeyerek. yine içirmeden önceki seviyelere düşmektedir. (3 no.lu EB izolatu bitki içinde ortalama 10^6 cfu/g bitki popülasyonuna ulaşmakta, 99 no.lu EB izolatu ise yaklaşık 10^4 cfu/g bitki popülasyon düzeyinde seyretmektedir. Bu sonuçlar, aynı bitki dokusu içinde farklı bakterilerin farklı popülasyon düzeylerine ulaşabileceği izlenimini vermektedir. Ayrıca bu sonuçlar; başarılı bir tohum bakterizasyonunun başarılı bir biyokontrol ve kolonizasyon için yeterli olacağını da bize göstermiştir.

83 nolu izolatın sağlıklı bitkilerde popülasyon yoğunluğu 8.73×10^3 - 5.4×10^6 cfu/g arasında saptanırken, FOC ile inokule edilmiş bitkilerde 6.6×10^3 - 1.1×10^7 cfu/g arasında değişmiştir. Bu sonuçlara bakıldığında istatistik açıdan sağlıklı ve FOC ile bileşik bitkilerde popülasyon yoğunluğunda önemli bir fark olmadığı ve 83 nolu EB izolatının patojenin varlığından etkilenmediği anlamı çıkartılabilir. 99 nolu

EB izolatu ise; sağlıklı bitkilerde $8 \times 10^2 - 2 \times 10^5$ cfu/g bitki ve FOCile bileşik bitkilerde 2×10^5 cfu/g bitki'den hızla düşüş göstererek daha sonraki dönemlerde kolonizasyonu tamamen yok olmuştur. Bu sonuçtan; söz konusu EB izolatının FOC'un fiziksel varlığından, besin ve yer açısından ya da FOC tarafından salgılanan metabolitlerden (özellikle toksin vb) etkilendiğı anlamı çıkartılabilir.

Kolonizasyon çalışması sonuçlarında dikkati çeken bir diğ er bulgu ise; EB FOC'un bitki içerisindeki kolonizasyonunun EB uygulamalarından etkilenmemesi olmuştur. Ancak, bir başka yoruma açık konu ise, FOC'un bitki içinde fiziksel varlığının EB uygulamalarından etkilenmemekle birlikte, *in vivo* testlerde hastalık şiddetindeki belirgin azalmadır. ISR konusunda yapılan bazı çalışmalarda, patojenin çoğ alması ve kolonizasyonunda bir azalma olmaksızın belirti gelişiminde bir azalma olduğ una dikkati çekmektedir. Bitkinin patojene olan bu toleransı fizyolojik düzeydedir. Örneğ in, ACC deaminase aktivitesine sahip rhizobakter izolatları tarafından uygulama gö ren bitkilerde patateste *Erwinia carotovora* pv. *carotovora*'nın neden olduğ u bakteriyel yumuşak çürüklük ve hıyarda *Pythium ultimum* 'un neden olduğ u çöketen şiddetinde azalma saptanmıştır. Patojen saldırısı sonrası artan Etilen stresi, ACC deaminaz aktivitesine sahip bakterilerce ön uygulama gö ren bitkilerde oldukça azalarak, patojenin popülasyon yoğunluğ unu azaltmaksızın simptom gör ünümünü engellemeyi başarmaktadır (Wang et al. 2000). Bu çalışma sonuçları, bizim bulgularımızda EB uygulanmış hıyar bitkilerinde FOC'un bitki içerisindeki kolonizasyonunda bir azalma olmamasına karş ın, simptom gelişimi ve hastalık şiddetindeki belirgin azalmayı açıklamamıza yardımcı olmaktadır.

Laboratuvar koş ulları altında dikotiledonlu bitkilerde gösterildiğı gibi, bazı endofitik bakteriler tarafından kolonizasyonun kontrolünde sinyal molekülleri olarak salisilik asit ve etilen'in kullanıldığı bilinmektedir. Diğ er taraftan, çeltik gibi monokotiledonlu bitkilerde ayrıca jasmonik asid (JA)'in, diazotrof *Azoarcus* sp.'inin kolonizasyonu ile ilişkili olduğ u gösterilmiştir. Jasmonik asit sinyal yolu ile ilişkili bitki savunma tepkilerinin kök sistemi içerisindeki endofitik bakteri kolonizasyonunu kontrol edebildiğı ileri sürülmüştür (Miché et al., 2006). Bitki ile uyumlu endofitik bakteri ilişkilerinde, JA ile bağlantılı bitki tepkilerinin daha az belirgin olduğ u ve endofitik kolonizasyonu sınırlamadığı bildirilmiştir (Miché et al., 2006). Bu tez

kapsamında çalışılan endofitik bakterilerle ilgili olarak dayanıklılığın tetiklenmesinden sorumlu gen ekspresyonları ya da pathwayları konusunda bir çalışma yapılamadığı için kesin bir yorum yapılamasa da, endofit kolonizasyonunun SA sinyal moleküllerinin varlığından olumsuz etkilendiği sonucu ilgi çekicidir.

Chun et al., (2009) tarafından yapılan bir çalışmada *Verticillium dahliae* ve *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum*'a karşı antagonistik etkisi testlenen endofitik bakterilerin (AEB) popülasyonları fide aşamasına göre çiçeklenme ve olgunlaşma aşamasında daha yüksek bulunmuştur. Çok değişkenli varyans analizi sonuçları AEB'in popülasyonlarının; çeşitler, bitki büyüme aşamaları ve onların etkileşimlerine göre önemli ölçüde değişkenlik gösterdiğini ortaya koymuştur.

Sturz ve Matheson (1996), *in vitro* koşullarda *Erwinia. carotovora* var. *atroseptica*'ya karşı yüksek bir engelleme gücü olan endofitik bakterilerin, *in vivo* koşullarda dayanıklılığı uyarma yoluyla etkili olduğunu, ancak, endofitlerin patates yumruları içinde popülasyon yoğunluğu ile biyokontrolün başarısı arasında negatif bir korelasyon saptandığını belirtmiştir. Populasyon yoğunluklarındaki dalgalanmaya rağmen; 83 ve 99 no.lu EB izolatları FOC'un serada gelişimini engellemede istatistiksel açıdan aynı grupta yer alarak ortalama bir biyokontrol başarısı göstermiştir. Hatta, kimyasal uyarıcı olan ASM ile de aynı grupta yer almaları biyolojik savaş açısından başarılı olduklarını düşündürmüştür. Bu durumda, bakterilerin bitki içerisindeki popülasyon yoğunluğundaki artıştan çok konukçu bitkideki bazı dayanıklılık mekanizmalarını tetiklemesinin daha etkili olduğu düşünülmüştür. Ayrıca, ASM'in de sistemik dayanıklılığı uyarıcı olarak bilinen bir kimyasal olması ve EB'ler ile FOC'a karşı etkililik açısından aynı istatistik grupta yer almaları, bu EB izolatlarının etki mekanizmasının da bitki içindeki dayanıklılık sistemlerini tetiklediğini düşündürmüştür.

Endofitlerin popülasyon yoğunluğu, bitki dokuları içinde çoğalması ve belli bir alanda belli bir seviyeye gelmesi daha önceki çalışmalarda kanıtlanmıştır. Chen et al., (1995)'ın yaptıkları çalışmanın sonuçlarına göre; bitkilerdeki endofit popülasyonundaki dalgalanmalar bitkinin yaşına ve çevresel faktörlere bağlıdır ve bitki dokusundaki popülasyon yoğunluğu yaşlanmayla birlikte azalma göstermektedir . Bizim çalışmamızın bitki büyüme odasında homojen çevresel

faktörlerde yürütüldüğü dikkate alınır, endofit popülasyonundaki dalgalanmada bitki fizyolojisi ve yaşı da ilişkili olduğu söylenebilir.

EB izolatu arasından seçilerek daha ileri testlere alınan 83 ve 99 no.lu EB izolatlarının 16s rRNA primerleriyle yapılan sekans analizi sonucunda bu bakterilerden 83'ün *Pantoea agglomerans*, 99 no.lu bakterinin ise *Bacillus thuringiensis* türlerine dahil olduğu saptanmıştır. Bu izolatların tanı sonuçlarını endofitik bakterilerle ilgili literatürlerle karşılaştırdığımızda örneğin, *Pseudomonas* sp.'nin çeşitli suşları, *Curtobacterium luteum* ve *Pantoea agglomerans*'da dahil olmak üzere çok sayıda endofitik bakterinin biyolojik savaş açısından önemli olduğu anlaşılmaktadır (Sturz et al., 1999). Özellikle, *Enterobacteriaceae* familyası üyeleri olan *Enterobacter* spp. (Boddey et al., 1991; Mirza et al. 2001), *Klebsiella* spp (Mirza et al., 2001), *Enterobacter cloacae* ve *Pantoea agglomerans* (formerly *Erwinia herbicola*) gibi türler bitki içsel dokularından sıklıkla izole edilmekte ve biyokontrol ve bitki büyümesini teşvik etme yetenekleri konusunda en önemli endofitler olarak çok sayıda çalışmaya rastlanmaktadır (Rossignol et al., 2001; Torres et al. 2008) Özellikle *Pantoea* spp'ların sistemik dayanıklılığı uyardığı (Jeun et al., 2004; Liu et al., 1995; Ongena M, et al. 2000) ve fosforu çözerek ve/veya fitohormon üretimini artırarak bitki gelişimini teşvik ettikleri bilinmektedir (Malboobi et al., 2009a, 2009b; Sulbaran et al., 2009; Tsavkelova et al., 2007; Zimmer et al., 1994). 83 no.lu *Pantoea agglomerans* bakterisinin *in vitro* bitki gelişimini artırma aktivitesine bakıldığında 45µg/ml IAA üretimi, 6mm fosfat çözme aktivitesi ve 7 mm sidrofor aktivitesi ile biokontrol açısından elde edilen başarı önceki çalışmalarla uyum sağlamaktadır.

Bu Doktora çalışmasında etkili bulunan bir diğer endofitik bakteri olan 99 no.lu izolatın 2 farklı 16s rRNA primeriyle yapılan sekans analizi sonucunda türünün *Bacillus thuringiensis* olarak saptanması ilginçtir. Bu tür özellikle, entomopatojen özelliği ağır basan bir gerçek endofittir. Ancak; son yıllarda endofitlerle ilgili çalışmalara bakıldığında, bakterinin güçlü kitinaz aktivitesi nedeniyle, bitkilerde dayanıklılığın uyarılmasında ve biyolojik savaşta etkili olduğu yönündedir (Bai et al., 2002) 99 nolu bakterinin *in vitro* bitki gelişimini artırma aktivitesine bakıldığında; 6µg/ml IAA üretimi, ve zayıf sidrofor salgılama aktivitesi saptanmıştır. Aynı bakteri izolatu *in vitro* ikili kültür testinde FOC'un miseliyal gelişimini

yaklaşık %18 düzeyinde engellemeyi başarmıştır. Bu bakterinin sözkonusu *in vitro* biyokontrol özelliğinin, kitinaz aktivitesinden kaynaklanabileceği düşünülebilir. 99 no.lu *B. thuringiensis* izolatu zayıf *in vitro* büyüme parametrelerine sahip olmasına karşın; *in vivo* testlerde güçlü biokontrol aktivitesinin yanında bitki gelişimini artırma açısından da istikrarlı şekilde en başarılı izolat olmuştur. Bu zayıf *in vitro* özelliklerine rağmen *in vivo*'da böyle bir başarıya ulaşmasını nedenlerinden birisi bu izolatın sistemik dayanıklılığı uyarma yoluyla FOC'un engellemesi ve indirekt olarak bitki gelişimini artırmaktan kaynaklandığı söylenebilir. Ancak; 99 no.lu *B. thuringiensis* izolatının patojen fungus baskısı olmadığına, hıyar bitkilerinde, serada verimi negatif kontrole oranla %30 oranında artırması sonucunu bu tez çalışmasında elde ettiğimiz *in vitro* bulgularla açıklamak olanaksızdır. Bu sonuçtan IAA dışında başka fitohormon ya da salgıların sorumlu olması muhtemeldir. *Pueraria thunbergiana* bitkisinin yüzey sterilizasyonu yapılmış nodüllerinden izole edilen *B. thuringiensis* KR-1 izolatının, önemli düzeyde IAA ve HCN üreterek hem bitki gelişimini uyardığı hem de patojenlere karşı dayanıklılığı uyardığı belirtilmiştir (Selvakumar et al. 2008). Bu çalışmadaki sonuçlar, bizim çalışmamızdaki sonuçların yorumuna katkı sağlayacak nitelitedir.

Bacillus thuringiensis subsp. *colmeri* strain 15A3'in ise; uygulandığı bitkilerde *Rhizoctonia solani*, *Physalospora piricola*, *Penicillium chrysogenum* ve *Botrytis cinerea*'ya karşı güçlü antifungal aktivitesinin yanı sıra *Spodoptera exigua* ve *Helicoverpa armigera* gibi böcek larvalarına karşı da güçlü bir entomopatojen olduğu belirtilmiştir (Liu et al. 2010).

B. thuringiensis'in bitki hastalıklarıyla biyolojik savaşta kullanılan strainlerinin güçlü lipopeptid üretimleri olduğu; bunlardan da özellikle fengycin üretiminin *B. thuringiensis*'de baskın olduğu yönünde çalışmalar bulunmaktadır (Kim et al., 2004). Bir lipopeptid olan fengycin'in, özellikle fungal patojenlere karşı antifungal aktivite göstermesinin yanı sıra, aynı zamanda, bitkide patojen saldırısına karşı dayanıklılık mekanizmalarını harekete geçiren bir sinyal molekülü olarak da önemli bir işlevi bulunmaktadır (Kim et al., 2004; Ongena and Jacques, 2007).

6.SONUÇ VE ÖNERİLER

1- Bu tez çalışmasında hıyar bitkilerin hemen hemen tüm içsel dokularında kök,sap,yaprak) endofitik bakterilerin varlığı ve çeşitliliği onaylanmıştır

2- Bu tez çalışmasında endofitik bakterilerin izolasyonunda doku tipine göre modifiye ederek kullandığımız tritürasyon ve imprinting yöntemlerinin bizi başarılı bir şekilde amacımıza oluşturduğu söylenebilir. Bu yöntem, benzer bitkiler için de önerilebilecek bir protokol olabilir.

3- Elde edilen endofitik bakterilerin *in vitro*'da yapılacak eleme çalışmaları ve incelenen antagonist özelliklerinin hedeflenen çalışmaya göre önceden belirlenen önem dereceleri üzerinden puanlama yapılarak bir tartılı derecelendirme yönteminin geliştirilmesi de *in vivo* testlere seçim konusunda anahtar bir rol oynayabilir.

4- Bu tez çalışmasında, endofit bakteriyle inoküle edilmiş bitkilerde patojenin (FOC) varlığında ve test edilen tüm zamanlarda saptanmasına rağmen hastalık şiddetindeki azalmanın yorumu bitkide dayanıklılığın uyarılmasından kaynaklanabilir ve endofitik bakterilerin bitki gelişiminde artışa yol açmaları patojenin zararına karşı bitkileri daha avantajlı duruma getirebilir. Bu konuda daha net yorum yapılabilmesi ve pratikteki olumlu/olumsuz yansımalarının belirlenebilmesi için daha geniş çaplı moleküler araştırmalara ve kanıtlara ihtiyaç vardır.

5. Bu tez çalışmasında testlenen EB'ler serada yapılan üretim denemesinde FOC baskısına rağmen hastalık şiddetini kimyasal sistamik dayanıklılığı uyarıcı olarak bilinen ASM ile aynı düzeyde engellemeyi başarmıştır. Üstelik, ASM uygulanan bitkilerde verimde düşüş görülmesi bilinen bir fitotoksiste problemidir. Bu açıdan değerlendirdiğimizde EB izolatları, hastalığa karşı biyokontrol etkilerinin yanı sıra verimi de artırmayı başarmalarıyla ASM'den daha etkili bulunmuştur.

6- Bu tez çalışmasında kullanılan 99 no.lu *B. thuringiensis* izolatının PGPR etkinliğinin hastalık baskısı olmadan verimi %30'lere varan düzeyde arttırması dikkat çekicidir. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar kök bakterilerinin serada topraksız ortamda hıyar yetiştiriciliğinde olumlu katkılarının olabileceğini

göstermektedir. Uygun kullanımı ile hastalıklarla mücadelede etkisinin yanında verime olan bu olumlu katkısı, üreticilerin biyolojik preparatları hem bir mücadele sistemi hem de bitki gelişimini arttırıcı ürün olarak kabullenip tercih etmeleri konusunda da teşvik edici olabilir.

7- Bu tez çalışmasında kullanılan 99 no.lu *B. thuringiensis* izolatının entomopatojenik özelliklerinin varlığı da araştırılması gereken bir başka konudur. Entomopatojen özelliğinin saptanması, bazı hastalık ve zararlılara karşı birlikte kullanılma olanağı sağlayabilir.

8- Farklı endofit bakteriler populasyon açısından bitki içinde ve patojenle karşılaştığında farklı davranışlar göstermektedir. Bu davranışların nedenini incelemek bizim gelecekte Eb'lerden daha iyi yararlanmamıza yardımcı olacaktır.

9- Hıyar *Fusarium solgunluk* hastalığı etmeni için toplanan hastalıklı bitkilerden çoğunlukla *Fusarium oxysporum f.sp. radisis cucumerinum* izole edilmiştir. Bu sonuç da bizim seralarımızda giderek bu etmenin de önemli olduğunu ve üzerinde çalışılması gerektiğini göstermektedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Agarwal, VK.and Sinclair, JB.,**1996, Principles of seed pathology. Lewis Publication, BocaRaton, Florida.
- Akköprü,A.,** 2012. Hıyar bakterial köşeli yaprak leke hastalığının(*Pseudomonas syringae pv.lachrymans*)bazı kök bakterileriyle biyolojik savaşımı üzerinde araştırmalar.İzmir;Ege Üniv.Fen.Bil.Enst.Doktora tezi.136 s.
- Alabouvette, C. and Couteaudier, Y.,**1992,Biological control of fusarium wilts with non-pathogenic Fusaria. In: Biological control of Plant Diseases, Tjamos, E.C.,Cook, R.J. and Papavizas, G.C. (eds). Plenum, New York. Pp. 415- 426.
- Alabouvette, C. and Lemanceau, P.,** 2000, Joint action of microbials for disease control. In: Methods in Biotechnology, Volume 5. Biopesticides: Use and delivery. Humana Press Inc., Hall, F.R. and Menn, J.J. (eds). Totowa, N.J. Pp. 117-135.
- Almonacit C., Quintero N., Martinez M., Vela M.,**2000. Determination of Quality Parameters of Bacterium Inocula Based On Liquid Formulation Elaborated With Strains Producing Indole Acetic Acid (IAA). Proc.5th Int. Conf. Plant Growth Promoting Rhizobacteria, Brasil.
- Altın, N.and Bora, T.,** 2004, Serada hıyar Fusarium solgunluğuna (*Fusarium oxysporum f.sp. cucumerinum*)’ na karşı biyolojik savaş odaklı önlemler üzerinde araştırmalar. Bitki Koruma Bölümü Anabilim Dalı Doktora Tezi.S:111.
- Amann, R.I. Binder, B.J. Olson, R.J. Chisholm, S.W. Devereux, R.and Stahl D.A.,**1990, Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. Appl. Environ. Microbiol. 56: 1919-1925.
- Arau’jo, W. L., Saridakis,H. O. , Barroso, P. A. V., Aguilar-Vildoso, C. I. and Azevedo,J. L.,**2001, Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. Can. J. Microbiol.47:229–236.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Araujo, W.L., Marcon, J., Maccheroni, W. Jr., J.D. van Elsas., J.W.L. van Vuurde, and Azevedo, J.L.,** 2002, Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. Applied and Environmental Microbiology. 68(10):4906-4914.
- Aravind, R. Kumar, A. Eapen, S. and Ramana, K.,** 2009, Endophytic bacterial flora in root and stem tissues of black pepper (*Piper nigrum* L.) genotype: isolation, identification and evaluation against *Phytophthora capsici*. Letters in Applied Microbiology 48: 58-64
- Armstrong, G.M. and Armstrong, J.K.,**1981, Formae speciales and races of *Fusarium oxysporum* causing wilt diseases. In: *Fusarium: Diseases, Biology and Taxonomy*, Nelson, P.E., Toussoun, T.A. and Cook, R.J. (eds). University Park, PA, USA: State University Press. Pp. 391-399.
- Bacon, C. W.,** 1993, Abiotic stress tolerances (moisture, nutrients) and photosynthesis in endophyte- tall fescue. Agricultural Ecosystemic Environment 44: 123-144.
- Bacon, C. W., and White, J. F.,** 2000, *Microbial endophytes*. New York: Marcel Dekker Inc.
- Bai, Y., D'Aoust, F., Donald L. Driscoll, S., and Driscoll, B.** 2002 Isolation of plant-growth-promoting *Bacillus* strains from soybean root nodules. Can. J. Microbiol. 48: 230–238.
- Bakker, P.A.H. M., Ran, L.X., Pieteres, C.M.J., Van Loon, L.C.,** 2003, Understanding the involvement of rhizobacteria-mediated induction of systemic resistance in biocontrol of plant diseases. Can. J. Plant. Pathol. 25:5-9p.
- Balsanelli, E., Serrato, R.V., de Baura, V., Sasaki, G., Yates, M.G., Rigo, L.U., Pedrosa, F.O., de Souza, E.M., and Monteiro, R.A.,**2010, *Herbaspirillum seropedicae* rfbB and rfbC genes are required for maize colonization. Environ. Microbiol. 12: 2233-2244.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Barka, E. A., Gognies, S., Nowak, J., Audran, J. C. and Belarbi, A., 2002,** Inhibitory effect of endophyte bacteria on *Botrytis cinerea* and its influence to promote the grapevine growth. *Biological Control*, 24, 135-142.
- Bric, M.J., Bostock, R.M., Silverstone S.E., 1991,** Rapid in situ assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. *Applied and Environmental Microbiology*: 555-538.
- Bastián, F., Cohen, A., Piccoli, P. and Luna, V., 1998,** Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A 1 and A 3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. *Plant growth* 24: 7-11.
- Beckman, C.H., 1987,** The Nature of Wilt Diseases of Plants. APS Press. St Paul. Minnesota. USA. Pp. 175.
- Beckman, C.H., 1990,** Host responses to the pathogen. In: *Fusarium wilt of banana*, Ploetz, R. C. (ed). APS Press. St Paul. Minnesota. USA. Pp. 93-105.
- Beckman, O. C., 1997,** Fertilizers and biological nitrogen fixation as sources of plant nutrients: perspectives for future agriculture. *Plant Soil*. **194**:11–14.
- Benhamou, N., Gagné, S., Quéré, D.L. and Dehbi, L., 2000,** Bacterial-mediated induced resistance in cucumber: beneficial effect of the endophytic bacterium *Serratia plymuthica* on the protection against infection by *Pythium ultimum*. *Biochem. Cell Biol.* 90: 45-56.
- Benhamou, N., Kloepper, J.W. and Tuzun, S., 1998,** Induction of resistance against *Fusarium* wilt of tomato by combination of chitosan with an endophytic bacterial strain: ultrastructure and cytochemistry of the host response. *Planta* 204: 153-168.
- Benhamou, N. and Theriault, G., 1992,** Treatment with chitosan enhances resistance of tomato plants to the crown and root rot pathogen *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*. *Physiological Molecular Plant Pathology* 41: 33-52.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Berg, G.**,2009, Plant-microbe interactions promoting plant growth and health:perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. Appl. Microbiol.Biotech. 84: 11-18.
- Berg, G., Krechel, A., Ditz, M., Sikora, RA., Ulrich, A.and Hallmann, J .**,2005, Endophytic and ectophytic potatoassociated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi. Fems Microbiology Ecology 51: 215-229
- Berg, G., Hallmann, J.**, 2006, Control of plant pathogenic fungi with bacterial endophytes.In: Microbial root endophytes. Schulz B, Boyle C, Sieber TN, eds. Springer, Berlin. Pp.53–67.
- Bertalan, M., Albano, R., de Pádua, V., Rouws L., Rojas, C., Hemerly, A.and Teixeira, K.**, 2009, Complete genome sequence of the sugarcane nitrogen-fixing endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5. BMC Genomics 10: 450.
- Bishop, C.D. and Cooper, R.M.**, 1983, An ultrastructural study of root invasion of three vascular wilt diseases. Physiological Molecular Plant Pathology 22: 15-27.
- Blasingame, D. and Patel, M.V.**, 2005, Cotton disease loss estimate committee report. In: Proceedings of Beltwide Cotton Conference of the National Cotton Council of America. Memphis, TN. Pp. 259-262.
- Bloemberg, G. V. and Lugtenberg, B. J.**, 2001, Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Current Opinion in Plant Biology*, Issue 4, pp. 343-350.
- Boddey RM, Urquiaga S, Reis V, Döbereiner J.** 1991. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane. Plant Soil 137:111–117.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Borrero, C., Ordovás, J., Trillas, M.I. and Avilés, M.,** 2006, Tomato Fusarium wilt suppressiveness. The relationship between the organic plant growth media and their microbial communities as characterised by Biolog ®. *Soil biology and Biochemistry* 30: 1631-1637.
- Brandi, M., Clark, EM. and Lindow, SE.,**1996, Characterization of the indole-3-acetic acid (IAA) biosynthetic pathway in an epiphytic strain of *Erwinia herbicola* and IAA production *in vitro*. *Can. J. Microbiol.* 42: 586-592.
- Brooks, D. S., Gonzalez, C. F., Appel, D. N., & Filer, T. H.** 1994. Evaluation of endophytic bacteria as potential biological control agents for oak wilt. *Biological Control*, 4, 373-381.
- Buonaurio, R. et al.,** 2002. Induction of systemic acquired resistance in pepper plants by acibenzolar-S-methyl against bacterial spot disease. *European Journal of Plant Pathology*, Issue 108, pp. 41-49.
- Cao, L., Qiu, Z., You, J., Tan, H. and Zhou, S.** 2005. Isolation and characterization of endophytic streptomycete antagonists of fusarium wilt pathogen from surface-sterilized banana roots. *FEMS Microbiology Letters* 247: 147-152.
- Castillo, U.F., Strobel, G.A., Ford, E.J., Hess, W.M., Porter, H., Jensen, J.B., Albert, H., Robison, R., Condrón, M.A.M., Teplow, D.B., Steevens, D. and Yaver, D.** 2002. Munumbicins, wide-spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* NRRL 30562, endophytic on *Kennedia nigricans*. *Microbiology* 148: 2675-2685.
- Cebolla, V., Busto, J., Ferrer, A., Miguel, A. and Maroto, J.V.** 2000. Methyl bromide alternatives on horticultural crops. *Acta Horticulture* 532: 237-242.
- Chen, C., Bauske, E.M., Musson, G., Rodríguez-Kábana, R. and Kloepper, J.W.** 1995. Biological control of Fusarium wilt on cotton by use of endophytic bacteria. *Biological control* 5: 83-91.
- Chuang, T.Y.** 1991. Soil suppressiveness of banana Fusarium wilt in Taiwan. *Plant Protection Bulletin (Taiwan Roc)* 33: 133-141.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Cohen AC, Bottini R, Piccoli P.** 2008. *Azospirillum brasilense* Sp 245 produces ABA in chemically-defined culture medium and increases ABA content in arabidopsis plants. *Plant Growth Regul.* 54: 97–103.
- Compant S, Clément C, Sessitsch A.** 2010. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biol. Biochem.* 42: 669-678.
- Compant S, Mitter B, Colli-Mull JG, Gangl H, Sessitsch A.** 2011. Endophytes of grapevine flowers, berries, and seeds: identification of cultivable bacteria, comparison with other plant parts, and visualization of niches of colonization. *Microb. Ecol.* 62:188-197.
- Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clément, C. and Barka, E.A.** 2005. Use of plant growth-promoting bacteria for the control of plant diseases: Principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 4951-4959.
- Compant S, Reiter B, Sessitsch A, Nowak J, Clément C, Ait Barka E.** 2005. Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by plant growth-promoting bacterium *Burkholderia* sp. strain PsJN. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 1685-1693.
- Cook, R.J.** 1993. Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 31: 53-80.
- Coombs JT, Franco CMM.** 2003. Visualization of an endophytic *Streptomyces* species in wheat seed. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 4260-4262.
- Correll, J.C.** 1991. The relationship between formae speciales, races, and vegetative compatibility groups in *F. oxysporum*. *Phytopathology* 81: 1061-1064.
- Correll, J.C., Puhalla, J.E., Schneider, R.W. and Kraft, J.M.** 1985. Differentiating races of *Fusarium oxysporum* f.sp. pisi based on vegetative compatibility. (Abstr.) *Phytopathology* 75: 1347.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Deng Y, Zhu Y, Wang P, Zhu L, Zheng J, Li R, Ruan L, Peng D, Sun M.** 2011. Complete genome sequence of *Bacillus subtilis* BSn5, an endophytic bacterium of *Amorphophallus konjac* with antimicrobial activity for the plant pathogen *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. J. Bacteriol. 193: 2070-2071.
- Di Pietro, A., Madrid, M.P., Caracuel, Z., Delgado-Jarana, J. and Roncero, M.I.G.** 2003. Pathogen profile. Fusarium oxysporum: exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus. Molecular Plant Pathology 4: 315-325.
- Djerbi, M., Aouad, L., Filali, H., Saaidi, M., Chtioui, A., Sedra, M.H., Allaoui, M., Hamdaoui, T. and Oubrich, M.** 1986. Preliminary results of selection of high-quality bayoudh-resistant clones among natural date palm population in Morocco. In: Proceedings of the Second Symposium on the Date Palm. Saudi Arabia. Pp. 383-399.
- Domínguez, J., Negrín, M.A., and Rodríguez, C.M.** 2001. Aggregate water-stability, particle size and soil solution properties in conducive and suppressive soils to Fusarium wilt of banana from Canary Islands. Soil Biology and Biochemistry 33: 449-455.
- Duijff, B. J., V. Gianinazzi-Pearsonand, and P. Lemanceau.** 1997. Involvement of the outer membrane lipopolysaccharides in the endophytic colonization of tomato roots by biocontrol *Pseudomonas fluorescens* strain WCS417r. New Phytol. 135:325–334.
- Durrant, W. and Dong, X.,** 2004. Systemic Acquired Resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.*, Issue 42, pp. 185-209.
- Egener T, Hurek T, Hurek BR.** 1999. Endophytic expression of *nif* genes of *Azoarcus* sp.strain BH 72 in *Oryza sativa* roots. Mol. Plant-Microbe Interact. 12: 813–819.
- Elbeltagy A, Nishioka K, Sato T, Suzuki H, Ye B, Hamada T, Isawa T, Mitsui H, Minamisawa K.** 2001. Endophytic colonization and in planta nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp. isolated from wild rice species. Appl. Environ. Microbiol. 67: 5285–5293.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Emmert.E.A.B.,Handelsman,J.O.,**1999.Biocontrol of plant disease :a (Gram+) positive perspective,*FEMS Microbiology Letters*,vol.171,n.1,pp.1-9.
- FAO,** 2012.Food And Agriculture Organization Of The United Nation <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>
- Ferreira, A., Quecine, M. C., Lacava, P. T., Oda, S., Azevedo, J. L., and Araujo, W. L. (2008). Diversity of endophytic bacteria from *Eucalyptus* species seeds and colonization of seedlings by *Pantoea agglomerans*. *FEMS Microbiol. Lett.* 287, 8–14.
- Fishal EM, Meon S, Yun WM.** 2010. Induction of tolerance to fusarium wilt and defense-related mechanisms in the plantlets of susceptible Berangan Banana preinoculated with *Pseudomonas* sp. (UPMP3) and *Burkholderia* sp. (UPMB3). *Agricul. Sci. China* 9: 1140-1149.
- Fouts DE, Tyler HL, DeBoy RT, Daugherty S, Ren Q, Badger JH, Durkin AS, Huot H,Shrivastava S, Kothari S et al.** 2008. Complete genome sequence of the N2-fixing broad host range endophyte *Klebsiella pneumoniae* 342 and virulence predictions verified in mice. *PLoS Biol.* 4: e1000141.
- Fravel, D., Olivain, C. and Alabouvette, C.** 2003. *Fusarium oxysporum* and its biocontrol. *New Phytologist* 157: 493-502.
- Fuchs, J.G., M oënné-Loccoz, Y. and Défago, G.** 1997. Non-pathogenic *Fusarium oxysporum* strain Fo47 induces resistance to *Fusarium* wilt in tomato. *Plant Disease* 81: 492-496.
- Fuentes-Ramirez LE, Jimenez-Salgado T, Abarca-Ocampo IR, Caballero-Mellado J.** 1993. *Acetobacter diazotrophicus*, an indoleacetic acid producing bacterium isolated from sugarcane cultivars of Mexico. *Plant and Soil* 154: 145-150.
- Fürnkranz M, Lukesch B, Müller H, Huss H, Grube M, Berg G.** 2011. Microbial diversity inside pumpkins: microhabitat-specific communities display a high antagonistic potential against phytopathogens. *Microb. Ecol.* DOI: 10.1007/s00248-011-9942-4.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Gasser I, Cardinale M, Müller H, Heller S, Eberl L, Lindenkamp N, Kaddor C, Steinbüchel A, Berg G.** 2011. Analysis of the endophytic lifestyle and plant growth promotion of *Burkholderia terricola* ZR2-12. *Plant and Soil* 347: 125-136.
- Gerlach, W. and Nirenberg, H.** 1982. The Genus *Fusarium* – A Pictorial Atlas. Paul Parey. Berlin. Germany. 406pp.
- Getha, K. and Vikineswary, S.** 2002. Antagonistic effects of *Streptomyces violaceusniger* strain G10 on *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4: Indirect evidence for the role of antibiosis in the antagonistic process. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 28: 303-310.
- Gilreath, J.P. and Santos, B.M.** 2004. Methyl bromide alternatives for weed and soilborne disease management in tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Crop Protection* 23: 1193-1198.
- Glick BR.** 2005. Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. *FEMS Microbiol. Lett.* 251: 1–7.
- Glick B.R.,** 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can. Journal Microbiol.* 41, 109-117.
- Gordon, T.R. and Martyn, R.D.** 1997. The evolutionary biology of *Fusarium oxysporum*. *Annual Review of Phytopathology* 35: 111-128.
- Gordon, T.R. and Okamoto, D.** 1992 .Population structure and the relationship between pathogenic and non-pathogenic strains of *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology* 82: 73-77.
- Govindarajan, M., Kwon, S. W., & Weon, H. Y.** 2007. Isolation, molecular characterization and growth-promoting activities of endophytic sugarcane diazotroph *Klebsiella* sp. GR9. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23, 997-1006.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Govindarajan M, Balandreau J, Kwon S-W, Weon H-Y, and Lakshminarasimhan C.** 2008. Effects of the inoculation of *Burkholderia vietnamensis* and related endophytic diazotrophic bacteria on grain yield of rice. *Microb. Ecol.* 55: 21-37.
- Graner G, Persson P, Meijer J, Alstrom S.** 2003. A study on microbial diversity in different cultivars of *Brassica napus* in relation to its wilt pathogen, *Verticillium longisporum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 29: 269–276.
- Gullino, M.L., Minuto, A., Gilardi, G. and Garibaldi, A.** 2002. Efficacy of azoxystrobin and other strobilurins against *Fusarium* wilts of carnation, cyclamen and Paris daisy. *Crop Protection* 21: 57-61.
- Gül, A.** 2005. Bahçe Bitkileri Tarımında Çevre Dostu Üretim Teknikleri. Meta Basım Matbaacılık Hizmetleri, İzmir. 140s.
- Gül, A., Tüzel, İ.H., Okur, B., Tuncay, Ö., Aykut, N., Engindeniz, S.,** 2000, Serada Topraksız tarım tekniği ile Hıyar Yetiştiriciliği. Tübitak, TAPAR yayınları. İzmir. 51p.
- Haas, D., and Défago, G.,** 2005, Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature Reviews Microbiology* 3: 307-319.
- Hallmann, J., A., Quadts-Hallman, W.F., Mahafee, and, J.W., Kloepper, 1997,** Bacterial endophytes in agricultural crop. *Can. J. Microbiol.* 43: 37-42
- Hallmann, J, Quadts, HA, Rodriguez, R, Kloepper, JW.,** 1998, Interactions between *Meloidogyne incognita* and endophytic bacteria in cotton and cucumber. *Soil Biol Biochem* 30: 925–937
- Hallmann J, Berg G.** 2006. Spectrum and population dynamics of bacterial root endophytes. In: *Microbial root endophytes*. Schulz B, Boyle C, Sieber T, eds. Springer, Heidelberg. Pp. 15–31.
- Handreck, K.A and Black, N.D.** 2002. Growing media for ornamental plants and turf. New South Wales University Press, Kensington, Australia. 550pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Hardoim PR, van Overbeek LS, van Elsas JD.** 2008. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends Microbiol.* 16: 463-471.
- Harman, G.E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I. and Lorito, M.** 2004. Trichoderma species: opportunistic, avirulent plant symASMTs. *Nature reviews Microbiology* 2: 43-56.
- Harish, S, Kavino, M, Kumar, N, Saravanakumar, D, Soorianathasundaram, K, Samiyappan, R.,** 2008, Biohardening with plant growth promoting rhizosphere and endophytic bacteria induces systemic resistance against banana bunchy top virus. *Appl. Soil Ecol.* 39(2):187-200.
- Hennig, K., and Villforth, F.,** 1940, Experimentelle Untersuchungen zur Frage der Backterien- symbiose in höheren Pflanzen und ihrer Beeinflussung durch Leitelemente. *Biochem. Z.* **305**:299–309.
- Holland, M., A., and Polacco, J. C.,** 1994, PPFMs and other covert contaminants: is there more to plant physiology than just plant? *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **45**:197–209.
- Höfte, M.** 1993. Classes of microbial siderophores. In: Iron chelation in plants and soil microorganisms, Barton, L.L. and Hemming, B.C. (eds). Academic Press, San Diego, California. Pp. 3-26.
- Huang, B, Lv C., Zhuang P, Zhang, H, Fan L.,** 2011, Endophytic colonisation of *Bacillus subtilis* in the roots of *Robinia pseudoacacia* L. *Plant Biol.* 13: 925-931.
- Huang, J.** 1986, Ultrastructure of bacterial penetration in plants. *Annual Reviews in Phytopathology*, 24, 141-157.
- Hurek, T, Handley, L, Reinhold-Hurek, B, Piche, Y,** 2002, Azoarcus grass endophytes contribute fixed nitrogen to the plant in an unculturable state. *Mol Plant–Microbe Interact*, 15:233-242.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Iniguez, AL, et al.**, 2005, Regulation of enteric endophytic bacterial colonization by plant defenses. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 18, 169-178
- Ishikawa, R., Shirouzu, K., Nakashita, H., Lee, H.Y., Motoyama, T., Yamaguchi, I., Teraoka, Y. and Arie, T.** 2005. Foliar spray of validamycin A or validoxylamine A controls tomato fusarium wilt. *Phytopathology.* 95: 1209-1216.
- Ito, S.I., Nagata, A., Kai, T., Takahara, H. and Tanaka, S.** 2005, Symptomless infection of tomato plants by tomatinase producing *Fusarium oxysporum* formae speciales non-pathogenic on tomato plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology.* 66: 183-191.
- Ivanchenko, MG., Muday, GK., Dubrovsky, JG.,** 2008, Ethylene-auxin interactions regulate lateral root initiation and emergence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 55:335-347.
- Iwai H, Usui M, Hoshino H, Kamada H, Matsunaga T, Kakegawa K, Ishii T, Satoh S.**2003. Analysis of sugars in squash xylem sap. *Plant Cell Physiol.* 44: 582-587.
- Jha, P.N., Kumar, A.,** 2007, Endophytic colonization of *Typha australis* by a plant growth-promoting bacterium *Klebsiella oxytoca* strain.J. *Appl. Microbiol.* 103:1311-20.
- James, EK., Gyaneshwar, P., Mathan, N., Barraquio, WL., Reddy, PM., Iannetta, PPM.,Olivares, FL., Ladha, JK.,** 2002, Infection and colonization of rice seedlings by the plant growth-promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 15: 894-906.
- James, EK., Olivares, FL., de Oliveira, ALM, dos Reis, Jr., FB, da., Silva, LG., Reis, VM.,** 2001, Further observations on the interaction between sugar cane and *Gluconobacter diazotrophicus* under laboratory and greenhouse conditions. *J. Exp. Botany* 52:747e760.
- James EK.** 2000. Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. *Field Crops Res.* 65: 197–209.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- James, E.K., Reis, V.M., Olivares, F.L., Baldani JI., Döbereiner, J.,** 1994, Infection of sugar cane by the nitrogen-fixing bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. J. Exp. Botany 45: 757-766.
- Jha, P., Kumar, A.,** 2009, Characterization of novel plant growth promoting endophytic bacterium *Achromobacter xylosoxidans* from wheat plant. Microb. Ecol. 58: 179-188.
- Ji, X., Lu, G., Gai, Y., Gao, H, Lu B, Kong, L, Mu, Z.,** 2010, Colonization of *Morus alba* L. by the plant-growth-promoting and antagonistic bacterium *Burkholderia cepacia* strain Lu10-1. BMC Microbiol. 10: 243.
- Ji, X., Lu, G., Gai, Y., Zheng, C, Mu, Z.,** 2008, Biological control against bacterial wilt and colonization of mulberry by an endophytic *Bacillus subtilis* strain. FEMS Microb. Ecol. 65: 565-573.
- Jones, J.P., Engelhard, A.W., and Woltz, S.S.,** 1989, Management of fusarium wilt of vegetables and ornamentals by macro- and microelement nutrition. In: Soilborne Plant Pathogens: Management of Diseases with Macro- and Microelements, A.W. Engelhard (ed). American Phytopathological Society. Pp. 18-32.
- Katan, J. and DeVay, J.E.** 1991. Soil solarization. CRC Press, Boca Raton.
- Katan, T. and Di Primo, P.** 1999. Current status of vegetative compatibility groups in *Fusarium oxysporum*: Phytoparasitica 27: 1-5.
- Kessmann, H., Staub, T., Hofmann, C., Maetzke, T., Herzog, J., Ward, E., Uknes, S. and Ryals, J.** 1994. Induction of systemic acquired disease resistance in plants by chemicals. Annual Review of Phytopathology 32: 439-459.
- Kim, P.I., et al.,** 2004, Purification and characterization of a lipopeptide produced by *Bacillus thuringiensis* CMB26. J. Appl. Microbiol. 97, 942-949
- Kistler, H.C.,** 1997, Genetic diversity in the plant-pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*. Phytopathology 87: 474-479.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kistler, H.C. and Miao, V. 1992.** New modes of genetic change in filamentous fungi. *Annual Review of Phytopathology* 30: 131-152.
- Knief, C., Delmotte, N., Chaffron, S., Stark, M., Innerebner, G., Wassmann, R., von Mering, C., Vorholt, JA., 2011,** Metaproteogenomic analysis of microbial communities in the phyllosphere and rhizosphere of rice. *ISME J.*: doi:10.1038/ismej.2011.192
- Kobayashi, D. Y., & Palumbo, J. D. 2000,** Bacterial endophytes and their effects on plants and uses in agriculture. In C. W. Bacon, & J. F. White (Eds.), *Microbial endophytes* (pp. 199-233). New York: Marcel Dekker, Inc.
- Krause, A., Bischoff, B., Miché, L., Battistoni, F., Reinhold-Hurek, B. 2011,** Exploring the function of alcohol dehydrogenases during the endophytic life of *Azoarcus* sp. Strain BH72. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 24: 1325-1332.
- Krause A, Ramakumar A, Bartels D, Battistoni F, Bekel T, Boch J, Böhm M, et al. 2006.** Complete genome of the mutualistic, N₂-fixing grass endophyte *Azoarcus* sp. Strain BH72. *Nature Biotech.* 24: 1385-1391.
- Kuninaga, S. and Yokosawa, R. 1992,** Genetic diversity of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* in restriction fragment length polymorphisms of mitochondrial DNA. *Transactions of the Mycological Society of Japan* 33: 449-459.
- Kurze, S., Dahl, R., Bahl, H., Berg, G., 2001.** Biological control of fungal strawberry diseases by *Serratia* HRO-C48. *Plant Dis* 85:529–534
- Landa, B.B., Hervás, A., Bettiol, W. and Jiménez-Díaz, R.M. 1997.** Antagonistic activity of bacteria from the chickpea rhizosphere against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. *Phytoparasitica* 25: 305-318.
- Lee, S., Flores-Encarnación, M., Contreras-Zentella, M., Garcia-Flores, L., Escamilla, J. E., & Kennedy, C. 2004.** Indole-3-acetic acid biosynthesis is deficient in *Gluconacetobacter diazotrophicus* strains with mutations in cytochrome c biogenesis genes. *Journal of Bacteriology*, 186, 5384-5391.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Lodewyckx, C., J. Vangronsveld, F., poTeous, E. R. B., Moors, S., Taghavi, M. Mezgeay, and D., van der Lelie., 2002,** Endophytic bacteria and their potential applications.*Crit.Rev.Plant Sci.*21:583-606.
- Lilley, AK, Fry JC, Bailey, MJ, Day, MJ., 1996,**Comparison of aerobic heterotropic taxa isolated from four root domains of mature sugar beet (*Beta vulgaris*). *FEMS Microbiol Ecol* 21:231–242;
- Lima, G., A., Ippolito, F., Nigro, and M., Salerno, 1994,** Attempts in the biological control of citrus mal secco (*Phoma tracheiphila*) using endophytic bacteria. *Dif. Piante* 17:43–49.
- Liu D, Cai, J, Xie C, Liu C, Chen Y., 2010,** Purification and partial characterization of a 36-kDa chitinase from *Bacillus thuringiensis* subsp. *colmeri*, and its biocontrol potential.*Enzyme Microb Technol.* 46(3–4): 252–6.
- Liu, B, Qiao, H, Huang, L, Buchenauer, H, Han, Q, Kang, Z, Gong, Y., 2009,** Biological control of take-all in wheat by endophytic *Bacillus subtilis* E1R-j and potential mode of action.*Biol. Control*, 49: 277-285.
- Liu, L., Kloepper, J. W., and Tuzun, S. 1995a.** Induction of systemic resistance in cucumber against bacterial angular leaf spot by plant growth-promoting rhizobacteria.*Phytopathology* 85: 843–847.
- Liu, L., Kloepper, J. W., and Tuzun, S. 1995b.** Induction of systemic resistance in cucumber against *Fusarium* wilt by plant growth-promoting rhizobacteria. *Phytopathology* 85:695–698.
- Liu, X, Jia J, Popat, R, Ortori C a, Li J, Diggle SP, Gao K, Cámara M. 2011,** Characterization of two quorum sensing systems in the endophytic *Serratia plymuthica* strain G3: differential control of motility and biofilm formation according to life-style.*BMC Microbiol.* 11: 26.
- Livens, B., Claes, L.,Vakalonunakis, D. J., Vanachter, A. C. R. C., and Thomma, B. P. H. J., 2007,** A robust identification and detection assay to discriminate the cucumber pathogens *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cucumerinum* and f. sp. *Radicis-cucumerinum*.*Environmental Microbiology* 9(9): 2145-2161

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Long, HH, Schmidt, D.D., Baldwin, IT., 2008,** Native bacterial endophytes promote host growth in a species-specific manner; phytohormone manipulations do not result in common growth responses. *PloS One* 3: e2702.
- Lorito, M., Harman, G.E., Hayes, C.K., Broadway, R.M., Tronsmo, A., Woo, S.L.and Di Pietro, A. 1993.** Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*: antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase. *Phytopathology* 83: 302-307.
- Loy, A, Maixner F, Wagner M, Horn M. 2007.** probeBase-an online resource for rRNA targeted oligonucleotide probes: new features 2007. *Nucleic Acids Res.* 35: D800- D804.
- Lucangeli, C. Bottini, R. 1997.** Effects of *Azospirillum* spp. on endogenous gibberellins content and growth of maize (*Zea mays* L.) treated with uniconazole. *Symbiosis* 23: 63–72.
- Lugtenberg, B., and Kamilova, F. 2009.** Plant-growth-promoting-rhizobacteria. *Annu. Rev.Microbiol.* 63: 541–556.
- Lugtenberg, B.J.J. and Dekkers, L.C., 1999.** What make *Pseudomonas* bacteria rhizosphere competent? *Environmental Microbiology* 1: 9-13.
- MacHardy, W.E., and Beckman, C.H., 1981.** Vascular Wilt Fusaria: Infection and Pathogenesis. In: *Fusarium: Disease, Biology and Taxonomy*, P.E. Nelson, T.A. Toussoun, and R.J. Cook, (eds). Pennsylvania State University Press, University Park, USA.
- Madore, M, Webb, JA., 1981.** Leaf free space analysis and vein loading in *Cucurbita pepo*. *Can. J. Botany* 59: 2550-2557.
- Mai, W.F., and Abawi, G.S., 1987.** Interactions among root-knot nematodes and *Fusarium* wilt on host plants. *Annual Review of Phytopathology* 25: 317-338.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Malfanova, N., Kamilova F. Validov, S. Shcherbakov, A. Chebotar, V. Tikhonovich, I. and Lugtenberg, B., 2011.** Characterization of *Bacillus subtilis* HC8, a novel plant-beneficial endophytic strain from giant hogweed. Microb. Biotech. 4: 523-532.
- Malfanova N, Kamilova F, Validov S, Chebotar V, and Lugtenberg B. 2013.** Is Larabinose important for the endophytic lifestyle of *Pseudomonas* spp.? Arch Microbiol.195: 9-17.
- Malinowski, D. and Belesky, D. 1999.** Neotyphodium cornophialum-infection affects the availability of tall fescue to use sparingly available phosphorous. Journal of Plant Nutrition 22: 835-853.
- Mandeel, Q. and Baker, R. 1991.** Mechanisms involved in biological control of Fusarium wilt of cucumber with strains of non-pathogenic Fusarium oxysporum. Disease Control and Pest Management. Phytopathology 81: 462-469
- Manter, DK., Delgado, J. Holm, DG., Stong, R., 2010.** Pyrosequencing reveals a highly diverse and cultivar-specific bacterial endophyte community in potato roots. Microb. Ecol. 60: 157-166.
- Martyn, R.D., 1996.** Fusarium wilt of cucumber,15-16 Compendium of cucumrbt disease, Zitter, T. A., Hopkins, D. L., and Thomas,C. E. (Eds), APS press, Minnesota, 87s.
- McInroy, J.A. 1993.** Endophytic bacteria of sweet corn and cotton. Masters Thesis, Auburn University, Auburn, AL, USA.
- McInroy, J.A. Kloepper, J.W. 1995.** Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. Plant Soil 173:337–342.
- Melnick R, Zidack N, Bailey B, Maximova S, Guiltinan M, Backman P. 2008.** Bacterial endophytes: *Bacillus* spp. from annual crops as potential biological control agents of black pod rot of cacao. Biol. Control 46: 46-56.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Meneses CHSG, Rouws LFM, Simoes-Araujo JL, Vidal MS, Baldani JJ.** 2011. Exopolysaccharide production is required for biofilm formation and plant colonization by the nitrogen-fixing endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 24: 1448-58.
- Mengoni A, Pini F, Huang L-N, Shu W-S, Bazzicalupo M.** 2009. Plant-by-plant variations of bacterial communities associated with leaves of the nickel hyperaccumulator *Alyssum bertolonii* Desv. *Microb. Ecol.* 58: 660-667.
- Métraux, J.P., Ahl-Goy, P., Staub, T. Speich, J. Steinemann, A. Ryals, J. and Ward, E., 1991.** Induced systemic resistance in cucumber in response to 2,6-dichloro-isonicotinic acid and pathogens. In: *Advances in molecular genetics of plant-microbe interactions*, Hennecke, H., and Verma, D.P.S. (eds). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 432-439.
- Meredith, C.H. 1943.** The antagonism of soil organisms to *Fusarium oxysporum cubense*. *Phytopathology* 34: 426-429.
- Miche, L, and Balandreau J,** 2001, Effects of rice seed surface sterilization with hypochlorite on inoculated *Burkholderia vietnamiensis*. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 3046-3052.
- Milner, J.L., Raffel, S.J., Lethbridge, B.J. and Handelsman, J. 1995.** Culture conditions that influence accumulation of zwittermicin A by *Bacillus cereus* UW85. *Applied Microbiology Biotechnology.* 43: 685-691.
- Mirza SM, et al.** 2001. Isolation, partial characterization, and the effect of plant growth-promoting bacteria (PGPB) on micro-propagated sugarcane *in vitro*. *Plant Soil* 237:47–54.
- Mitchell, R., and Alexander, M., 1962.** microbiological processes associated with the use of chitin for biological control. *Soil Science Society of America Proceedings* 26: 556-558.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Moore FP, Barac T, Borremans B, Oeyen L, Vangronsveld J, Lelie D, Campbell CD, Moore ERB , 2006.** Endophytic bacterial diversity in poplar trees growing on a BTEX-contaminated site: the characterisation of isolates with potential to enhance phytoremediation. *Syst Appl Microbiol* 29:539–556
- Moore, N.Y., Pegg, K.G., Smith, L.J., Langdon, P.W., Bentley, S. and Smith, M.K. 1999.** Fusarium wilt of banana in Australia. In: *Banana Fusarium wilt management: Towards sustainable cultivation. Proceedings of the International Workshop on banana Fusarium wilt disease*, Molina, A.B., Masdek, N.H.N. and Liew, K.W. (eds). Genting Highlands Resort, Malaysia. Pp. 64-75.
- M’Piga, P., Bélanger, R.R. Paulitz, T.C. and Benhamou, N., 1997.** Increased resistance to *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* in tomato plants treated with the endophytic bacterium *Pseudomonas fluorescens* strain 63-28. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 50: 301-320.
- Mundt, JO., and Hinkle, NF., 1976.** Bacteria within ovules and seeds. *Appl. Environ. Microbiol.*32: 694–698.
- Nash, S.M., Christou, T. and Snyder, W.C., 1961.** Existence of *Fusarium solani* f.sp. *curcubitae* and *F. solani* f.sp. *phaseali* in soil. *Phytopathology* 55: 963-966.
- Neilands, J.B., 1973.** Microbial iron transport compounds (siderochromes). In: *Inorganic Biochemistry. Volume I*, Eichhorn, G.L. (ed). Amsterdam. Pp. 167-202.
- Nejad, P., and Johnson, P.A., 2000.** Endophytic bacteria induce growth promotion and wilt disease suppression in oilseed rape and tomato. *Biological Control* 18: 208-215
- Nel, B., Steinberg, C., Labuschagne, N. and Viljoen, A. 2006.** The potential of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* and other biological control organisms for suppressing fusarium wilt of banana. *Plant Pathology* 55: 217-223.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Nel, B., Steinberg, C. Labuschagne, N. and Viljoen, A. 2007.** Evaluation of fungicides and sterilants for potential application in the management of Fusarium wilt of banana. *Crop Protection* 26: 697-705.
- Nelson, P.E., Toussoun, T.A. and Marasas, W.O., 1983.** *Fusarium species. An Illustrated Guide for Identification.* Pennsylvania State University Press. University Park. USA. 193 pp.
- Niemann, G.J., Baayen, R.P. and Boon, J.J. 1990.** Localization of phytoalexin accumulation and determination of changes in lignin and carbohydrate composition in carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) xylem as a consequence of infection with *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* by pyrolysis-mass spectrometry. *European Journal of Plant Pathology* 96: 133-153.
- Norman-Setterblad, C. Vidal, S, and Palva, ET., 2000.** Interacting signal pathways control defense gene expression in *Arabidopsis* in response to cell wall-degrading enzymes from *Erwinia carotovora*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 13: 430-438.
- Okunishi S, Sako K, Mano H, Imamura A, Morisaki H. 2005.** Bacterial flora of endophytes in the maturing seed of cultivated rice (*Oryza sativa*). *Microbes Environ.* 20: 168–177.
- Olivain, C. and Alabouvette, C. 1997.** Colonization of tomato root by a non-pathogenic strain of *Fusarium oxysporum*. *New Phytologist* 137: 481-494.
- Olivain, C. and Alabouvette, C. 1999.** Process of tomato root colonization by a pathogenic strain of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* discussed in comparison to a non-pathogenic strain. *New Phytologist* 141: 497-510.
- Olivain, C., Steinberg, C. and Alabouvette, C. 1995.** Evidence of induced resistance in tomato inoculated by non-pathogenic strains of *Fusarium oxysporum*. In: *Environmental Biotic Factors in Integrated Plant Disease Control*, Manka, M. (ed). The Polish Phytopathological Society, Poznan, Poland. Pp. 427-430.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ongena M, Jourdan E, Adam A, Paquot M, Brans A, Joris B, Arpigny J-L, Thonart P.**2007. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. Environ. Microbiol. 9: 1084-1090.
- Ongena, M. and Jacques, Ph.** 2007. Bacillus lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. Trends in Microbiology. 16: 115-125
- Owen,J.H.**1956.Cucumber wilt,caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *cucumerinum*, Phytopathology, 46:153-157
- Patriquin, D.G. and Döbereiner, J.** 1978. Light microscopy observations of tetrazolium-reducing bacteria in the endorhizosphere of maize and other grasses in Brazil. Canadian Journal of Microbiology 24: 734-742.
- Patten CL, Glick BR.** 2002. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. Appl. Environ. Microbiol. 68: 3795.
- Pedrosa FO, Monteiro RA, Wassem R, Cruz LM, Ayub RA, Colauto NB, Fernandez MA,et al.** 2011. Genome of *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1, a specialized diazotrophic endophyte of tropical grasses. PLoS genetics 7: e1002064.
- Peng, H.X., Sivasithamparam, K. and Turner, D.W.** 1999. Chlamydospore germination and Fusarium wilt of banana plantlets in suppressive and conducive soils are affected by physical and chemical factors. Soil Biology and Biochemistry 31: 1363-1374.
- Pereira, P., Ibanez, F., Rosenblueth, M., Etcheverry, M.,Martínez-Romero, E.,** 2011. Analysis of the Bacterial Diversity Associated with the Roots of Maize (Zeamays L.) through Culture-Dependent and Culture. International Scholarly Research Network.
- Perotti, R,** 1926, On the limits of biological inquiry on soil science. Proc. Int. Soc. Soil Sci. 2, 146-161

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Pieterse, C.M.J., Van Wees, S.C.M., Hoffland, E., Van Pelt, J.A. and Van Loon, L.C.1996.** Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression. *Plant Cell* 8: 1225-1237.
- Pillay, V. J., and J. Nowak.** 1997. Inoculum density, temperature and genotype effects on in vitro growth promotion and epiphytic and endophytic colonization of tomato (*Lycopersicum esculentum* L.) seedlings inoculated with a pseudomonad bacterium. *Can. J. Microbiol.* 43:354–361.
- Pirttilä A, Joensuu P, Pospiech H, Jalonen J and Hohtola ,** 2004. A. Bud endophytes of Scots pine produce adenine derivatives and other compounds that affect morphology and mitigate browning of callus cultures. *Physiol Plant.*, 121,305–312.
- Plantwise organization led by CAB,**<http://www.plantwise.org/knowledgebank>
- Ploetz, R.C. 2005.** Panama disease, an old nemesis rears its ugly head. Part 1: The beginnings of the banana export trades. Online. *Plant Health Progress*. doi:10.1094/PHP-2005-1221-01-RV.
- Ploetz, R.C., Herbert, J., Sebasigari, K., Hernandez, J.H., Pegg, K.G., Ventura, J.A. and Mayato, L.S. 1990.** Importance of *Fusarium* wilt in different banana-growing regions. In: *Fusarium wilt of bananas*, Ploetz, R.C. (ed). St Paul, MN, USA: ASP Press. Pp. 9-26.
- Ploetz, R.C. and Pegg, K.G. 2000.** Fungal diseases of the root, corm and Pseudostem. In: *Disease of banana, abaca and enset*, Jones, D. (ed). CABI Publications, London. Ploetz, R.C., Thomas, J.E. and Slabaugh, W.R. 2003. Diseases of banana and plantain. In: *Diseases of Tropical Fruit Crops*, Ploetz, R.C. (ed). CABI Publishing. Wallingford. Oxon. UK. 544 pp.
- Posada, F. , Vega F. E .,** 2005. Establishment of the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) as an endophyte in cocoa seedlings (*Theobromacacao*). *Mycologia.*, 97, 1195–1200.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ramakers, P. and O'Neill, T., 1999.** Cucurbits. pp. 435-452. *Integrated Pest and Disease Management in Geenhouse Crops.*(Eds) R. Albajes, M. Gullino, J. Van Lenteren and Y. Elad,:Kluwer Academic Publishers, 507. s.
- Rasche F, Lueders T, Schloter M, Schaefer S, Buegger F, Gatteringer A, Hood-Nowotny RC, Sessitsch A.** 2009. DNA-based stable isotope probing enables the identification of active bacterial endophytes in potatoes. *New Phytologist* 181: 802-807.
- Reinhold-Hurek B, Hurek T.** 1998. Life in grasses: diazotrophic endophytes. *Trends Microbiol.* 6: 139-144.
- Reinhold-Hurek B, Maes T, Gemmer S, Van Montagu M, Hurek T.** 2006. An endoglucanase is involved in infection of rice roots by the not-cellulose-metabolizing endophyte *Azoarcus* sp. strain BH72. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 19: 181-188.
- Roncato-Maccari LDB, Ramos HJO, Pedrosa FO, Alquini Y, Chubatsu LS, Yates MG,Rigo LU, Steffens MBR, Souza EM.** 2003. Endophytic *Herbaspirillum seropedicae* expresses *nif* genes in gramineous plants. *FEMS Microbiol. Ecol.* 45: 39-47.
- Rosenblueth, M., & Martínez-Romero, E.**2006, Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19, 827-837.
- Rosenblueth, M., & Martínez-Romero, E.** 2004, Rhizobium etli maize populations and their competitiveness for root colonization. *Archives of Microbiology*, 181, 337-344.
- Rothballer M, Eckert B, Schmid M, Fekete A, Schloter M, Lehner A, Pollmann S,Hartmann A.** 2008. Endophytic root colonization of gramineous plants by *Herbaspirillum frisingense*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 66: 85-95.
- Rovira, A.D.** 1965. Interactions between plant roots and soil microorganisms. *Annual Review of Microbiology* 19: 241-266.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ryan RP, Germaine K, Franks A, Ryan DJ, Dowling DN.** 2008. Bacterial endophytes: recent developments and applications. *FEMS Microbiol. Lett.* 278: 1-9.
- Ryu C M, Farag M A, Hu C H, Reddy M S, Wei H X, Pare P W and Kloepper J W.** 2003. Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci, U.S.A.*, 100, 4927-4932.
- Samish Z, Etinger-Tulczynska R.** 1963. Distribution of bacteria within the tissue of healthy tomatoes. *Appl. Environ. Microbiol.* 11: 7-10.
- Sattelmacher B.** 2001. The apoplast and its significance for plant mineral nutrition. *New Phytologist* 22: 167-192.
- Scher, F.M. and Baker, K.F.** 1982. Effect of *Pseudomonas putida* and a synthetic iron chelator on induction of soil suppressiveness to *Fusarium* wilt pathogens. *Phytopathology* 72: 1567-1573.
- Scherwinski K, Grosch R, Berg G.** 2008. Effect of bacterial antagonists on lettuce: active biocontrol of *Rhizoctonia solani* and negligible, short-term effects on non-target microorganisms. *FEMS Microbiol. Ecol.* 64: 106-16.
- Schulz B, Boyle C.** 2006. What are endophytes? In: *Microbial root endophytes*. Schulz B, Boyle C and Sieber T, eds. Springer-Verlag, Berlin. Pp. 1-13.
- Sessitsch A, Hardoim P, Döring J, Weilharter A, Krause A, Woyke T, Mitter B, et al.** 2012. Functional characteristics of an endophyte community colonizing rice roots as revealed by metagenomic analysis. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 25: 28-36.
- Sessitsch, A, Reiter B, Berg, G,** 2004, Endophytic bacterial communities of field-grown potato plants and their plant-growth-promoting and antagonistic abilities. *Canadian Journal of Microbiology* 50: 239-249
- Sevgican, A.,** 1999. *Örtüaltı Sebzeçiliği*. İzmir: E.Ü. Ziraat Fakültesi Yayınları.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Sevilla M, Burris RH, Gunapala N, Kennedy C.** 2001. Comparison of benefit to sugarcane plant growth and $^{15}\text{N}_2$ incorporation following inoculation of sterile plants with *Acetobacter diazotrophicus* wild-type and *nif* mutant strains. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 14: 358–366.
- Sgro V, Cassán F, Masciarelli O, Del Papa MF, Lagares A, Luna V.** 2009. Isolation and characterization of endophytic plant growth-promoting (PGPB) or stress homeostasis-regulating (PSHB) bacteria associated to the halophyte *Prosopis strombulifera*. *Appl. Microbiol. Biotech.* 85: 371-381.
- Simons, G., Groenendijk, J., Wijbrandi, J., Reijans, M., Groenen, J., Diergaarde, P., Van der Lee, T., Bleeker, M., Onstenk, J., de Both, M., Haring, M., Mes, J., Cornelissen, B., Zabeau, M. and Vos, P.** 1998. Dissection of the *Fusarium* I2 gene cluster in tomato reveals six homologs and one active gene copy. *Plant Cell* 10: 1055-1068.
- Simons, M., Permentier, H.P., de Weger, L.A., Wijffelman, C.A. and Lugtenberg, B.J.J.** 1997. Amino acid synthesis is necessary for tomato root colonization by *Pseudomonas fluorescens* strain WCS365. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 10: 102-106.
- Singh, P.P., Shin, Y.C., Park, C.S. and Chung, Y.R.** 1999. Biological control of *Fusarium* wilt of cucumber by chitinolytic bacteria. *Phytopathology* 89: 92-99.
- Shishido M, Breuil C, Chanway CP.** 1999. Endophytic colonization of spruce by plant growth-promoting rhizobacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* 29: 191-196.
- Srivastava R, Khalid A, Singh US, Sharma AK** 2010. Evaluation of arbuscular mycorrhizal fungus, fluorescent *Pseudomonas* and *Trichoderma harzianum* formulation against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* for the management of tomato wilt. *Biol. Control.* 53:24-31.
- Sivan, A. and Chet, I.** 1986. Biological control of *Fusarium* spp. in cotton, wheat and muskmelon by *Trichoderma harzianum*. *Journal of Phytopathology* 116: 39-47.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Sivan, A. and Chet, I. 1989.** The possible role of competition between *Trichoderma harzianum* and *Fusarium oxysporum* on rhizosphere colonization. *Phytopathology* 79: 198-203.
- Sivan, A. and Chet, I. 1993.** Integrated control of fusarium crown and root rot of tomato with *Trichoderma harzianum* in combination with methyl bromide. *Crop Protection* 12: 380-386.
- Snyder, W.C. and Smith, S.N. 1981.** Current status. In: *Fungal Wilt Diseases of Plants*, Mace, M.E., Bell, A.A. and Beckman, C.H. (eds.). Academic Press. New York.
- Song, W., Zhou, L., Yang, C., Cao, X., Zhang, L. and Liu, Z. 2004.** Tomato *Fusarium* wilt and its chemical control strategies in a hydroponic system. *Crop protection* 23: 243-247.
- Spaepen S, Dobbelaere S, Croonenborghs A, Vanderleyden J. 2008.** Effects of *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid production on inoculated wheat plants. *Plant and Soil* 312: 15-23.
- Sticher, L., Mauch-Mani, B. and Métraux, J.P. 1997.** Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology* 35: 235-270.
- Stover, R.H., 1972,** Banana plantain and abaca diseases. Commonwealth Mycological Institute: Kew, G.B.
- Stover, R.H., 1962,** Fusarial wilt (Panama Disease) of bananas and other Musa. Commonwealth Mycological Institute, Kew, UK. Sturz, A.V., Christie, B.R., Matheson, B.C., Arsenault, W.J. and Buchanan, N.A. 1999. Endophytic bacterial communities in the periderm of potato tubers and their potential to improve resistance to soilborne plant pathogens. *Plant Pathology* 48: 360-369.
- Sturz, A.V. and Nowak, J., 2000,** Endophytic communities of rhizobacteria and the strategies required to create yield enhancing associations with crops. *Applied Soil Ecology* 15: 183-190.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Sturz, A. V., Christie, B.R., Matheson, B.G., and Nowaki J. 1997.** Biodiversity of endophytic bacteria which colonize red clover nodules, roots, stems and foliage and their influence on host growth. *Biol. Fertil. Soils* 25:13-19.
- Sun, L., Qiu, F., Zhang, X., Dai, X., 2008,** Endophytic bacterial diversity in rice (*Oryza sativa* L.) roots estimated by 16S rDNA sequence analysis. *Microb. Ecol.* 55: 415-424.
- Sun, Y., Cheng, Z., Glick, BR., 2009,** The presence of a 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase deletion mutation alters the physiology of the endophytic plant growth-promoting bacterium *Burkholderia phytofirmans* PsJN. *FEMS Microbiol. Lett.* 296: 131-136.
- Suzuki, T., Shimizu, M., Meguro, A., Hasegawa, S., Nishimura, T., Kunoh, H. 2005,** Visualization of infection of an endophytic Actinomycete *Streptomyces galbus* in leaves of tissue-cultured *Rhododendron*. *Actinomycetologica* 19: 7–12.
- Taechowisan, T., Lu, C., Shen, Y. and Lumyong, S. 2005.** Secondary metabolites from endophytic *Streptomyces aureofaciens* C M UAc130 and their antifungal activity. *Microbiology* 151: 1691-1695.
- Tamietti, G. and Valentino, D. 2006.** Soil solarization as an ecological method for the control of *Fusarium* wilt of melon in Italy. *Crop Protection* 25: 389-397.
- Taghavi S, Garafola C, Monchy S, Newman L, Hoffman A, Weyens N, Barac T, Vangronsveld J, van der Lelie D. 2009.** Genome survey and characterization of endophytic bacteria exhibiting a beneficial effect on growth and development of poplar trees. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 748-757.
- Taghavi S, van der Lelie D, Hoffman A, Zhang Y-B, Walla MD, Vangronsveld J, Newman L, Monchy S. 2010.** Genome sequence of the plant growth promoting endophytic bacterium *Enterobacter* sp. 638. *PLoS genetics* 6: e1000943.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Timmusk S, Grantcharova N, Wagner EGH.** 2005. *Paenibacillus polymyxa* invades plant roots and forms biofilms. Appl. Environ. Microbiol. 71: 7292-7300.
- TÜİK.** 2011. http://www.tuik.gov.tr/VeriBilgi.do?alt_id=45
- Tüzel , Y., Gül, A., Daşgan, H.Y., Özgür, M., Özçelik, N., Boyacı, H.F., Ersoy, A.** 2005. Örtüaltı yetiştiriciliğinde gelişmeler. ZMO teknik kongesi.
- Tjamos, E.C. Tsitsigiannis ,D. I., , Tjamos , S.E., Antoniou, P.P., and Katinakis, P.,** 2004. Selection and screening of endorhizosphere bacteria from solarized soils as biocontrol agents against *Verticillium dahliae* of solanaceous hosts. European Journal of Plant Pathology 110: 35–44
- Uesugi, Y.** 1998. Fungicide classes: Chemistry, uses and mode of action. In: Fungicide activity, chemical and biological approaches to plant protection, Hutson, D. and Miyamoto, J. (eds.). Wiley, Chichester, Engleand. Pp. 23-56.
- University of Florida IFAS Extension,** <http://edis.ifas.ufl.edu>
- Vakalounakis, D. J., and Fragkiadakis, G.A.,** 1999. Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* isolates from cucumber: differentiation by photogenicity, vegetative compatibility, and RAPD Fingerprinting, Ecology and Population Biology, 89:2, 161-168..
- Vallad, G.E. and Goodman, R.M.** 2004. Systemic acquired resistance and induced systemic resistance in conventional agriculture. Crop Science 44: 1920-1934.
- Van Loon, L.C.** 1997. Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related protein. European Journal of Plant Pathology 103: 753-765.
- Van Loon, L.C., Bakker, P.A.H. M.** 2003. Signalling in Rhizobacteria- Plant Interactions. In; Koron, H.de., Visser, E.J.W.(Eds.) Root Ecology. Siproinger-Verlag Berlin Heidelberg Vol:168 s: 297-330.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Van Loon, L. C., Bakker, P. A. H. M. and Pieterse, C. M. J., 1998.** Systemic Resistance Induced By Rhizosphere Bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol*, Issue 36, pp. 453-483.
- Van Loon, L.C., Bakker, P.A.H.M. and Pieterse, C.M.J. 1998.** Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 36: 453-483.
- van Peer, R., Punte, H. L. M., de Weger, L. A., and Schippers,B. 1990.** Characterization of root surface and endorhizosphere pseudomonads in relation to their colonization of roots. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:2462– 2470.
- Verma, S.C., A. Singh, S.P: Chowdhury, and A.K. Tripathi. 2004.** Endophytic colonization ability of two de p water rice endophytes, *Pantoea sp.* and *Ochrobactrum sp.* Using green fluorescent protein reporter. *Biotechnol. Lett.* **26**:425-429
- Verma, S. C., Ladha, J. K., & Tripathi, A. K. (2001).** Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. *Journal of Biotechnology*, *91*, 127-141.
- Vetrivelkalai, P., Sivakumar, M. and Jonathan, E. I. 2010.** Biocontrol potential of endophytic bacteria on *Meloidogyne incognita* and its effect on plant growth in bhendi. *Journal of Biopesticides*, *3*(2): 452-457.
- Volin, R.B. and Jones, J.P. 1982.** A new race of *Fusarium* wilt of tomato in Florida and sources of resistance. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* *95*: 268-270.
- Wakelin, S. A., Warren, R. A., Harvey, P. R., & Ryder, M. H. (2004).** Phosphate solubilization by *Penicillium* sp. closely associated with wheat roots. *Biology and Fertility of Soils*, *40*, 36-43.
- Walker, J.C. 1971.** *Fusarium* wilt of tomato. American Phytopathological Society Monograph 6, St. Paul, MN. 56 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Welbaum, G., Sturz, A.V., Dong, Z. and Nowak, J. 2004.** Fertilizing soil microorganisms to improve productivity of agro-ecosystems. *Critical Review of Plant Science* 23: 175-193.
- Weller,D.M., 1988.**Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria.*Ann.Rev.Phytopathol.*26,379-407.
- Weilharter A, Mitter B, Shin MV, Chain PSG, Nowak J, Sessitsch A. 2011.** Complete genome sequence of the plant growth-promoting endophyte *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN. *J. Bacteriol.* 193: 3383-3384.
- Weststeijn, G. 1973.** Soil sterilization and glasshouse disinfection to control *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* in tomatoes in the Netherlands. *European Journal of Plant Pathology* 79: 36-40.
- Williams, P.H., and Palmer, M.J.,** “NC State and USDA Cucumber Disease andbook”,<http://cuke.hort.ncsu.edu/cucurbit/cuke/dshndbk/fw.html> (Erişim tarihi: 3 Nisan 2012)
- Wilson, M. and Lindow, S. E. 1993.** Release of recombinant microorganisms. *Annu. Rev. Microbiol.* 47:913–944.
- Woltz, S.S. and Jones, J.P. 1981.** Nutritional requirements of *Fusarium oxysporum*: basis for a disease control system. In: *Fusarium: diseases, biology and taxonomy*, Nelson, P.E., Toussoun, T.A. and Cook, R.J. (eds.). University Park, PA, USA: State University Press. Pp. 340-349.
- Yingwu Shi, Kai Lou , Chun Li, 2009.**Isolation, quantity distribution and characterization of endophytic microorganisms within sugar beet: *African Journal of Biotechnology*. Vol. 8 (5), pp. 835-840
- Yıldız, M., Delen, N., 1977.** Studies on the Occurrence of *Fusarium Wilt* of Cucumber in Ege Region of Turkey, *journal of Turkish Phytopathology*, 6, 11-117.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Zachow C, Fatehi J, Cardinale M, Tilcher R, and Berg G.** 2010. Strain-specific colonization pattern of *Rhizoctonia* antagonists in the root system of sugar beet. FEMS Microbiol. Ecol. 74: 124-35.
- Zinniel, D. K. ,Lambrecht, P., Harris, B. N.,** 2002.Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants .Appl Environ Microbiol.68, 2198–2208.
- Zitter, T. A., Hopkins, D. L. and Thomas, C. E.,** 2010. *Compendium of Cucurbit Diseases*. Second Prnting ed. Minesota : APS Press. 87 p.

ÖZGEÇMİŞ

1973 yılında Tebriz’de doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Tebriz’de tamamladı. 1992 yılında Tebriz Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümünde lisans eğitimine başladı. 1996 yılında aynı bölümden Ziraat Mühendisi olarak mezun oldu. 1999 yılında Tarım bakanlığına bağlı olan tarım Eğitimi merkezinde göreve başladı. 2001 yılında İslami Azad Üniversitesi Bilim ve Araştırma biriminde Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü, Fitopatoloji ana bilim dalında yüksek lisansa başladı. 2004 yılında yüksek lisansını tamamladı. Şu anda Tebriz tarım Eğitimi merkezinde Öğretim Üyesi olarak çalışmaktadır.