

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**KARPUZ BAKTERİYEL MEYVE LEKESİ
HASTALIĞI ETMENİ *Acidovorax citrulli*'nin
MOLEKÜLER TANISI VE ENDOFİTİK
BAKTERİLERLE ÖNLENME OLANAKLARININ
ARAŞTIRILMASI**

Büşra CEYHAN

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Hatice ÖZAKTAN

Bitki Koruma Anabilim Dalı

Sunuş Tarihi: 22.07.2016

Bornova-İZMİR

2016

Büşra CEYHAN tarafından Yüksek Lisans tezi olarak sunulan “**Karpuz Bakteriyel Meyve Lekesi Hastalığı Etmeni *Acidovorax citrulli*’nin Moleküler Tanısı Ve Endofitik Bakterilerle Önlenme Olanaklarının Araştırılması**” başlıklı bu çalışma EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’ nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 22.07.2016 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

Jüri Başkanı : Prof. Dr. Hatice ÖZAKTAN

Raportör Üye : Prof. Dr. Figen YILDIZ

Üye : Prof. Dr. Emin ONAN

İmza



EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Karpuz Bakteriyel Meyve Lekesi Hastalığı Etmeni *Acidovorax citrulli*’nin Moleküler Tanısı Ve Endofitik Bakterilerle Önlenme Olanaklarının 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.

22/07/2016

Büşra CEYHAN

ÖZET

**KARPUZ BAKTERİYEL MEYVE LEKESİ HASTALIĞI ETMENİ
Acidovorax citrulli'nin MOLEKÜLER TANISI VE ENDOFİTİK
BAKTERİLERLE ÖNLENME OLANAKLARININ ARAŞTIRILMASI**

CEYHAN, Büşra

Yüksek Lisans Tezi, Bitki Koruma Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Hatice ÖZAKTAN

Temmuz 2016, 83 sayfa

Bu tez çalışmasının amacı, *Acidovorax citrulli* (Ac)'nin neden olduğu karpuz bakteriyel meyve lekesi hastalığına karşı endofitik bakterilerin (EB) etkisinin araştırılması ve Ac'nin moleküler tanısının gerçekleştirilmesidir. Sağlıklı hıyar bitkilerinden izole edilmiş 20 EB izolatı Ac'ye karşı *in vivo* koşullarda antagonistik aktivite açısından testlenmiştir. Vakum infiltrasyon yöntemiyle Ac ile inokule edilmiş karpuz tohumlarına EB süspansiyonu uygulanmıştır. Bakıroksiklorid ve mancozeb etkili maddeli preparatlar da referans kimyasallar olarak kullanılmıştır. Uygulama görmüş karpuz tohumları büyüme odasında tutulmuş; fide çıkışı ve kotiledon yapraklardaki hastalık belirtilerine göre değerlendirme yapılmıştır. *In vivo* test sonuçlarına göre; EB izolatlarının % 50'den fazlası pozitif kontrolle karşılaştırıldığında % 64-85 oranında karpuz fidelerinin kotiledonlarında hastalık gelişimini engellemiş ve referans kimyasallardan daha etkili bulunmuştur. Ac'ye karşı *in vivo*'da başarılı bulunan EB izolatlarının olası *in vitro* etki mekanizmasının Fe^{+3} için yarışmaya dayalı olduğu saptanmıştır. Ac'ye etkili bulunan EB izolatları, 16s rRNA primerleri ile yapılan sekans analizi sonucunda; *Pseudomonas fluorescens* (31 no.lu izolat), *P. lutea* (53 no.lu izolat), *P. putida* (61 no.lu izolat), *Enterobacter cloacae* (108 no.lu izolat), *Chryseobacterium elymi* (88 no.lu izolat), *Cronobacter sakazakii* (15 no.lu izolat) ve *Serratia ureilytica* (18 no.lu izolat) olarak tanımlanmıştır.

Anahtar sözcükler: Karpuz bakteriyel meyve lekesi, *Acidovorax citrulli*, biyolojik mücadele, endofitik bakteriler, moleküler tanı.

ABSTRACT**INVESTIGATION OF MOLECULAR DIAGNOSIS AND CONTROL OF
Acidovorax citrulli THE CAUSAL AGENT OF BACTERIAL FRUIT
BLOTCH OF WATERMELON BY ENDOPHYTIC BACTERIA**

CEYHAN, Büşra

MSc in Department of Plant Protection

Supervisor: Prof.Dr. Hatice ÖZAKTAN

July 2016, 83 pages

The aim of this thesis was to evaluate the effect of endophytic bacterial (EB) strains on bacterial fruit blotch of watermelon caused by *Acidovorax citrulli* (Ac), and to realize molecular identification of Ac. Out of 20 EB isolates, which were isolated from internal tissues of healthy cucumber plants, were screened for *in vivo* antagonistic activity against Ac. Watermelon seeds, which were previously inoculated with Ac suspension by vacuum infiltration technique were treated by EB suspensions. Copper oxychloride and mancozeb were used as reference chemicals. Treated watermelon seeds were sown in peat medium and kept in growth chamber room, and then evaluated for seedling emergence and disease symptoms on cotyledone leaves. According to *in vivo* test results, more than 50% of tested EB isolates inhibited the disease development on cotyledons of seedlings at the rate of 64 to 85% compared to pathogen alone treatment, and found more effective than tested chemicals. It was also determined that the possible mode of action of EB strains to Ac was based on competition for Fe³⁺. The most effective EB strains were identified as *Pseudomonas fluorescens* (strain 31), *P. lutea* (strain 53), *P. putida* (strain 61), *Enterobacter cloacae* (strain 108), *Chryseobacterium elymi* (strain 88), *Cronobacter sakazakii* (strain 15) and *Serratia ureilytica* (strain 18) by using 16s rRNA primers and sequence analysis.

Keywords: Bacterial fruit blotch of watermelon, *Acidovorax citrulli*, biological control, endophytic bacteria, molecular diagnosis.



TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans çalışmam süresince bilgisi, sabrı ve yönlendirici fikirleriyle her zaman yol gösteren değerli hocam sayın Prof. Dr. Hatice ÖZAKTAN'a sonsuz teşekkür ederim.

Tez çalışmam sırasında yardımlarını esirgemeyen Arş. Gör. Mustafa AKBABA, Zir. Müh. Gizem ERYİĞİT, Zir. Müh. Hande Evren ARDA'a teşekkür ederim.

Sadece tez süresince değil hayatımın her anında desteklerini esirgemeyen ve daima yanımda olan aileme sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLERSayfa

ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
TEŞEKKÜR	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xvii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xxi
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	7
2.1 Karpuzda Bakteriyel Meyve Lekesi Hastalığı İle İlgili Genel Bilgiler	7
2.2 Hastalık Etmeni İle İlgili Bilgiler	12
2.3 Hastalık Etmeninin Tanılanmasına Yönelik Çalışmalar	14
2.4 Hastalık Etmeninin Mücadelesine Yönelik Çalışmalar	17
2.4.1 Kültürel önlemler	17
2.4.2 Dayanıklı çeşitlerin kullanımı	19
2.4.3 Kimyasal mücadele	19
2.4.4 Biyolojik mücadele	20

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3. MATERYAL VE YÖNTEM	27
3.1 Materyal	27
3.1.1 Çalışmada kullanılan test patojeni bakteri	27
3.1.2 Çalışmada kullanılan endofitik bakteriler	27
3.1.3 Çalışmada kullanılan test bitkisi ve bitki yetiştirme ortamı	28
3.1.4 Çalışmada kullanılan besi yerleri	28
3.1.5 Moleküler çalışmada kullanılan primerler	29
3.1.6 Referans kimyasal	30
3.2 Yöntem	30
3.2.1 Bitkilerin yetiştirilmesi	30
3.2.2 Moleküler testler	31
3.2.3 Endofitik bakterilerle tohum uygulamalarının Ac'ye karşı etkililiğinin testlenmesi	33
3.2.4 Endofitik bakterilerin <i>in vitro</i> etki mekanizmalarının testlenmesi.....	37
3.2.5 Verilerin analizi.....	38

İÇİNDEKİLER (devam)Sayfa

4. BULGULAR.....	39
4.1 <i>Ac</i> 'nin Moleküler Tanılama Testi Sonuçları.....	39
4.2 Endofitik Bakterilerle Tohum Uygulamalarının <i>Ac</i> 'ye Karşı Etkililiği Testlerinin Bulguları.....	39
4.3 <i>In Vivo</i> 'da Başarılı Bulunan Endofitik Bakterilerin <i>In Vitro</i> 'da <i>Ac</i> 'ye Etki Mekanizmalarının Belirlenmesi Testinin Bulguları.....	47
4.4 Etkili Bulunan Endofitik Bakterilerin Moleküler Tanısı	50
5.TARTIŞMA.....	52
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	60
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	62
ÖZGEÇMİŞ	83

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Karpuz bakteriyel meyve lekesi kotiledon yapraklardaki belirtisi.....	10
2.2 Karpuz bakteriyel meyve lekesi hastalığının meyvelerdeki belirtisi	11
2.3 Ac'nin yaşam döngüsü	12
3.1 Karpuz tohumlarının Ac ile inokulasyonu.....	34
3.2 Endofitik bakterilerin tohumlara uygulanması ve <i>in vivo</i> 'da Ac'ye karşı etkililiklerinin araştırılması.	35
3.3 Ac'nin oluşturduğu hastalık şiddetini değerlendirmede kullanılan 0-7 skalasının görünümü	36
3.4 Demir içeren King B (Fe ⁰) ve demir içermeyen King B (Fe ⁺³) besi ortamlarına ekim	37
3.5 <i>In vitro</i> 'da Demir'e bağlı siderofor etkisinin değerlendirilmesinde kullanılan 0-5 skalası.....	38
4.1 WFB1/WFB2 primerleri ile testlenen Ac'nin PCR elektroferaz-jel görüntüsü	39
4.2 Birinci denemede yer alan endofitik bakterilerin tohum bakterizasyonu uygulamalarının Ac'ye karşı <i>in vivo</i> etkililiği sonuçları	41
4.3 Birinci denemedeki pozitif kontroldeki Ac'nin neden olduğu belirtiler	42

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.4 Birinci denemede Ac'ye karşı başarılı bulunan endofitik bakteriler	42
4.5 Birinci denemede Ac'ye karşı başarısız olan endofitik bakteriler	43
4.6 Bakırlı preparatlar (a) Cuoxychloride ve (b) Mancozeb'in Ac'ye <i>in vivo</i> etkisi.....	43
4.7 İkinci denemede yer alan endofitik bakterilerin tohum bakterizasyon uygulamalarının Ac'ye karşı <i>in vivo</i> etkililiği sonuçları.....	45
4.8 İkinci denemedeki pozitif kontrolde Ac'nin oluşturduğu çökerten, kotiledon yapraklarında çürüme benzeri hastalık belirtileri	46
4.9 İkinci denemede başarılı olan endofitik bakteriler	46
4.10 İkinci denemede Ac'yi engellemede başarısız bulunan endofitik bakteriler.....	47
4.11 Endofitik bakterilerin demirli ve demirsiz ortamda Ac'ye karşı siderofor etki testi sonuçları: ve güçlü siderofor etki gösteren bakteriler.....	49
4.12 Endofitik bakterilerin demirli ve demirsiz ortamda Ac'ye karşı siderofor etki testi sonuçları: ve güçlü siderofor etki göstermeyen bakteriler.....	49
4.13 27F/1492R primerleri ile testlenen EB izolatlarının PCR elektroferaz-jel görüntüsü.....	51

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 Dünyada karpuz üretimi yapan ülkeler, üretim miktarları (ton) ve oranları (%).....	2
1.2 Ülkemizde 2014 yılında, meyvesi için yetiştirilen sebzelerin üretim miktarları.....	3
1.3 Bölgelere göre Türkiye’de karpuz üretim miktarı (ton) ve üretim oranı (%)	3
2.1 <i>Acidovorax avenae</i> alttürlerinin ayırımında kullanılan özellikler.....	14
3.1 Çalışmada kullanılan endofitik bakteriler ile ilgili bilgiler.....	27
3.2 Bakteri izolasyonu, pigment oluşumu ve genel besi yeri olarak kullanılan King B ortamı için gerekli kimyasallar ve miktarları	29
3.3 Demire bağlı metabolitlerin belirlenmesi için kullanılan Demir (III) içeren King B besi yeri için gerekli kimyasallar ve miktarları	29
3.4 Tez çalışmasında kullanılan primer çiftlerinin oligo dizinleri.....	30
3.5 <i>Ac</i> ’nin tanılanması için kullanılan PCR master mix ve içeriği	31
3.6 <i>Ac</i> ’nin tanılanması için PCR koşulları.....	31
3.7 27F/1492R 16s rRNA primerleri için kullanılan master mix için gerekli kimyasallar ve miktarları	32
3.8 EB’lerin tanılanması için PCR koşulları.....	33

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
3.9 Hastalık şiddeti değerlendirilmesinde kullanılan 0-7 skalası.....	36
4.1 Birinci denemede yer alan endofitik bakterilerin tohum bakterizasyonu uygulamalarının <i>Ac</i> 'ye karşı <i>in vivo</i> etkililiği sonuçları	40
4.2 İkinci denemede yer alan endofitik bakterilerin tohum bakterizasyon uygulamalarının <i>Ac</i> 'ye karşı <i>in vivo</i> etkililiği sonuçları	44
4.3 <i>In vivo</i> 'da <i>Ac</i> 'ye karşı başarılı bulunan endofitik bakterilerin olası <i>in vitro</i> biyokontrol mekanizmaları.....	48
4.4 16s rRNA sekans analizine göre bakteri türleri ve referans numaraları.....	50

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
cv	Kültüvar
CFU	Koloni oluşturan birim
dk	Dakika
Fe	Demir
FeCl ₃	Demir klorid
g	Gram
ha	Hektar
°C	Santigrat Derece
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
mm	Milimetre
ml	Mililitre
mM	Milimolar
nm	Nanometre
rpm	Revolution per minute

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
K_2HPO_4	Dipotasyum fosfat
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	Magnezyum Sülfat Heptahidrat
UV	Ultraviolet
Si	Silisyum
OD	Optik yoğunluk
<u>Kısaltmalar</u>	
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
Ac	<i>Acidovorax citrulli</i>
DNA	Deoksiribo Nükleik asit
EB	Endofit bakteri
E.Ü.	Ege Üniversitesi
EPPO	Avrupa ve Akdeniz Bitki Sağlığını Koruma Örgütü
FAO	Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü
FAME	Fatty Acid Methyl Ester
GKGM	Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü.
HR	Hipersensitiv Reaksiyon

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
KBML	Karpuz Bakteriyel Meyve Lekesi
NCBI	The National Center for Biotechnology Information
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFGE	Pulse Field Jel Elektroforezi
pv.	Pathovar
rRNA	Ribozomol Ribo Nükleik Asit
Sn	Saniye
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
sp.	Tür
spp.	Türler
TAE	Tris-acetate-EDTA
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu

1. GİRİŞ

Karpuz (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum ve Nakai), kabakgiller (*Cucurbitaceae*) familyası içinde yer alan tropik ve ılıman iklim kuşağında yetiştirilen tek yıllık bir bitkidir. Karpuz; üretim miktarı, ekim alanı ve ekonomik önemi bakımından ülkemiz için önemli bir kültür bitkisidir.

Karpuzun yenilebilir olan meyve eti kısmı, tüm meyve ağırlığının yaklaşık %65'i kadardır ve bunun da %88-95'i sudur (Adewuyi *et al.*, 2013). Karpuz içerdiği protein, nişasta ve yağ değerleri sıfıra yakın bir sebzedir. Karpuz içerdiği şeker miktarı yüksektir. Ayrıca likopen bakımında zengin bir sebzedir. Karpuzda vitamin A, vitamin B ve vitamin C gibi birçok mineral madde de bulunur (Eşiyok, 2012).

Karpuz yetiştiriciliğinin Orta Doğu ve Afrika'da uzun bir geçmişi vardır. Karpuz, 4000 yıldır Mısır'da oldukça önemli bir sebzedir. 10. yy'da Çin ve Rusya'da yetiştirilmeye başlanmış ve yeni dünya ile tanışması 16.yy'da İspanyollar sayesinde olmuştur (Robinson and Decker Walters, 1997).

Karpuz, dünyada ve ülkemizde, üretim alanı, miktarı ve ticari değeri yönünden oldukça önemli bir sebze türüdür. Dünyada 3.47 milyon ha alanda 105.4 milyon ton üretim ile karpuz domatesten sonra en fazla üretilen sebzeler arasında yer alır. Türkiye de 165 bin ha alanda 4 milyon ton karpuz üretimi ile dünyanın ikinci büyük karpuz üreticisidir. Dünya karpuz üretiminde Çin, Türkiye, İran, Brezilya, Mısır ilk beş sırada yer almaktadır. Dünya karpuz üretiminde 70 milyon ton ile Çin %66.8 gibi büyük bir oranla birinci sırada yer alırken, ülkemiz ise bu üretiminin %3.8'lik kısmı karşılanmaktadır. Dünya karpuz üretiminde önemli diğer ülkeler, İran %3.6'lık üretim oranıyla üçüncü, Brezilya %2'lik üretim oranıyla dördüncü, Mısır %1.8'lik üretim oranıyla beşinci sırada yer almaktadır (Çizelge 1.1) (FAO, 2012).

Çizelge 1.1 Dünyada karpuz üretimi yapan ülkeler, üretim miktarları (ton) ve oranları (%) (FAO, 2012)

Sıra	Ülkeler	Üretim Miktarı (Ton)	Üretim Oranları (%)
1	Çin	70.000.000	66.4
2	Türkiye	4.044.184	3.8
3	İran	3.800.000	3.6
4	Brezilya	2.079.547	2.0
5	Mısır	1.874.710	1.8
6	ABD	1.770.630	1.6
7	Cezayir	1.495.081	1.4
8	Rusya	1.453.315	1.3
9	Özbekistan	1.350.000	1.3
10	Kazakistan	1.154.900	1.0
	Diğerleri	16.349.974	15.8
	Dünyada toplam üretim	105.372.341	100

Ülkemizde 2014 yılında, meyvesi için yetiştirilen sebzeleri göz önünde bulundurduğumuzda en çok üretilen sebzelerin domates, karpuz, biber, hıyar ve kavun olduğu görülmektedir. Ülkemizde 804 bin ha alanda yaklaşık 28 milyon 569 bin 781 ton sebze üretimi içinde meyvesi tüketilen sebzeler birinci sırada yer almaktadır. Karpuz bu grup içerisinde 2.sırada olup ülkemizde toplam sebze üretiminin 13.6 ise karpuz oluşturmaktadır (Çizelge 1.2) (TÜİK, 2014).

Çizelge 1.2 Ülkemizde 2014 yılında, meyvesi için yetiştirilen sebzelerin üretim miktarları (TUIK, 2014)

Sebze türü	Üretim miktarı (Ton)
Domates	11.850.000
Karpuz	3.885.617
Biber	2.232.308
Hıyar	1.845.749
Kavun	1.707.302
Patlıcan	827.380
Fasulye (taze)	638.469
Kabak (sakız)	299.858
Bezelye (taze)	105.279
Balkabağı	93.672

Çizelge 1.3 ye göre 2014 yılında TUIK verilerine göre yaklaşık olarak 3.88 milyon ton karpuz üretimi gerçekleştirilmiştir. Ülkemizde karpuz üretimi 1.36 milyon ton üretimle en fazla Akdeniz Bölgesi'nde gerçekleştirilmiştir. Genel üretimin %35'i bu bölgeden karşılanmıştır. Akdeniz Bölgesi'ni yaklaşık %17 üretim oranıyla Ege Bölgesi, %16 ile Güneydoğu Anadolu ve %13 ile Marmara Bölgesi takip etmiştir (TUIK, 2014).

Çizelge 1.3 Bölgelere göre Türkiye'de karpuz üretim miktarı (ton) ve üretim oranı (%) (TUIK, 2014)

Bölgeler	Üretim Miktarı (Ton)	Üretim Oranı (%)
Akdeniz	1.364.599	35.1
Ege	656.457	16.9
Güneydoğu Anadolu	638.479	16.4
Marmara	528.594	13.6
Diğer	856.055	22.0

Ülkemizde üretilen karpuzun büyük bir kısmı iç piyasada tüketilmektedir. Üretimin 40 bin 643 tonu ihraç edilmiş, 28 bin 856 tonu ise ithal edilmiştir. İthalat nisan ve mayıs aylarında karpuzun hasada henüz gelmediği zamanda gerçekleşmiştir (FAO, 2012).

Karpuz sıcak ve ılıman iklim sebzesidir. Bu nedenle karpuz yetiştiriciliği ilkbaharda don tehlikesi ortadan kalktıktan sonra yapılabilir. Karpuz oldukça uzun ve sıcak bir gelişme devresine ihtiyaç duyar. Olgunluk döneminde ise yüksek sıcaklık ve düşük nem ister. Karpuz yetiştiriciliği ilkbahar ile sonbahar devreleri arasında yapılır. Karpuz soğuklardan çok korktuğu gibi yüksek sıcaklıklardan da hoşlanmaz. Karpuz tohumları toprak sıcaklığı 12 °C ve bunun üzerine çıktığında ekilmelidir. Karpuz tohumları en iyi 25 °C sıcaklıkta çimlenir. Karpuz bitkisi en iyi 20-30 °C'ler de gelişir. Kuru havalardan ve sıcaklardan hoşlanmadığı gibi fazla hava neminden de hoşlanmaz. Çok nemli hava koşullarında hastalıklar görülebilmektedir.

Karpuz organik maddece zengin, su tutma kapasitesi yüksek, akarsu kenarlarındaki milli topraklarda çok iyi gelişir. Ağır topraklar karpuz yetiştiriciliği için uygun değildir. Kumlu-tın veya milli-tın topraklar karpuz yetiştiriciliği için ideal topraklardır. Vejetasyon süresi kısa olan yerlerde özellikle erkencilik düşünüldüğünde hafif kumlu topraklarda yetiştiricilik yapılır. Karpuz akarsu kenarlarındaki milli topraklarda susuz olarak yetiştirildiğinde çok iyi sonuç verir. Kökleri narin olduğu için ağır topraklar tercih edilmez. Bu nedenle toprak derinliğinin fazla olması, taban suyunun bir metre civarında ya da aşağı seviyelerde bulunması karpuz için idealdir. Çok ağır olmayan organik maddece zengin killi-tın veya tınlı-kil topraklarda karpuz yetiştiriciliği yapılabilir.

Karpuz üretiminde nötr topraklar tercih edilir. Karpuz toprak pH'ı 6.0-6.5 olan yerlerde çok iyi gelişir. Asitli topraklarda yetiştirme yapılacak ise usulüne uygun olarak kireçleme yapılmalıdır (Eşiyok, 2012).

Dünyada ve ülkemizde geniş bir yetiştiricilik alanına sahip olan karpuz, vejetasyon periyodu boyunca pek çok zararlı ve yabancı ottan etkilenmektedir. Bu durum karpuzun kalite ve kantitesini etkileyerek ekonomik anlamda öneminin

azalmasına, pazar değerinin düşmesine, yetiştiriciliğinin de kısıtlanmasına yol açabilmektedir.

Tarımsal alanda ve insan beslenmesinde önemli bir paya sahip olan karpuzda birçok zararlı ve hastalık etmenleri tespit edilmiştir. Karpuz telli böceği (*Henosephilachna elaterii*), Kavun kızılböceği (*Rhaphidopalpa foveicollis*), Kavun sineği (*Myiopardalis pardalina*), Kırmızı örümcekler (*Tetranychus* spp.), Pamuk yaprak kurdu (*Spodoptera littoralis*), Tütün tripsi (*Thrips tabaci*), Çiçek tripsi (*Frankliniella occidentalis*) karpuz yetiştiriciliğinde sorun olan başlıca zararlılardır (GKGM, 2015).

Karpuz yetiştiriciliğini tehdit eden önemli hastalıklar arasında ise başta viral etmenler hıyar mozayik virüs hastalığı (*Cucumber mosaic virus*), kabak mozayik virüs hastalığı (*Squash mosaic virus*), kabak sarı mozayik virüs hastalığı (*Zucchini yellow mosaic virus*), karpuz mozayik virüs hastalığı (*Watermelon mosaic 1 potyvirus* (WMV-1)) olmak üzere fungal etmenlerden kabakgillerde külleme hastalığı (*Erysiphe cichoracearum*, *Sphaerotheca fuliginea*), kabakgillerde mildiyö hastalığı (*Pseudoperonospora cubensis*), kabakgillerde solgunluk ve kök çürüklüğü (*Fusarium* spp. *Pythium* spp. *Rhizoctonia* spp.), kavun ve karpuzda antraknoz hastalığı (*Colletotrichum lagenarium*), sebzelerde beyaz çürüklük hastalığı (*Sclerotinia sclerotiorum*), sebzelerde kurşuni küf hastalığı (*Botrytis cinerea*), karpuzda alternaria yaprak yanıklığı (*Alternaria cucumerina*) ve bakteriyel etmenlerden son yıllarda önemi gittikçe artan ve karantina etmeni olan karpuz bakteriyel meyve lekesi hastalığı (*Acidovorax citrulli*) yer almaktadır (GKGM, 2015).

A. citrulli (Ac) (Willems *et al.*, 1992) (Schaad *et al.*, 1978)'nin neden olduğu karpuz bakteriyel meyve lekesi (KBML) karpuz ve kavun başta olmak üzere tüm kabakgillerde görülen ve kabakgil yetiştiriciliğini tehdit eden önemli bir sorundur. Ac ile bulaşık tohum en önemli inokulum kaynağıdır (O'Brien and Martin, 1999) ve tohum ve fide üretim sistemlerinde bu patojene karşı tolerans sıfırdır (Hopkins and Thompson, 2002). Ülkemizde de karantina etmeni olup EPPO A1 listesinde yer almaktadır (EPPO, 2016). Hastalık etmeni üretim sezonunda önemli kayıplara neden olur. Fidelerde symptom oluşturmada bulunabilir ve araziye şaşırtılan hastalıklı fide oranına bağlı olarak, hastalığın yoğunluğu tarlada değişiklik

gösterir. İklim koşulları hastalık için uygun olduğunda, birkaç hasta bitkiden tarladaki diğer bitkilerin tümüne hastalık bulaşabilir. Erken dönemde bir enfeksiyon gerçekleşirse ürün kaybı % 100'e kadar ulaşabilir (Mirik and Aysan, 2008). Patojen daha çok tohum kabuğunun altında, bazen de tohum yüzeyinde bulunabilir (Silva Neto *et al.*, 2006). Bu nedenle, bu hastalıkla mücadelede önkoşul sağlıklı tohum kullanmak, tohum fermantasyonu ve peroksiasetik asit, hipoklorik asit veya bakırlı preparatların kullanımı (Hopkins *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2003; Feng *et al.*, 2007) gibi önleyici tedbirler alınması önemlidir. Bu tedbirler hastalığa karşı etkili olmasına rağmen (Fessehaie and Walcott, 2005), tohum fermantasyonu ve kimyasallarla tohum uygulamalarının tohum kalitesi, çimlenme gücü ve fide çıkışı üzerinde olumsuz etkileri olabilmektedir (Hopkins *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2003). Bu nedenle çevre dostu ve ekolojik bir uygulama olan biyolojik mücadele son yıllarda üzerinde durulan bir konudur (Fravel, 2005).

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 (Hallmann *et al.*, 1998). Endofitik bakteriler birçok bitkinin çiçek, yaprak, meyve, gövde, kök ve tohumlarından izole edilebilmiştir (Lilley *et al.*, 1996). Endofitik bakteri popülasyonunu bitki genotipi, biyotik ve abiyotik çevre koşulları etkileyebilmektedir (Mahaffee and Kloepper, 1997).

Bu tez çalışmasının amacı, bakteriyoloji laboratuvarı stoklarında bulunan *Ac* izolatın moleküler tanısını gerçekleştirmek üzere klasik PCR protokolünün optimizasyonunu sağlamak ve endofitik bakterilerin *Ac*'nin biyolojik mücadelesindeki etkililiğini araştırmaktır. Bu amaçla tez çalışması: klasik tanılama çalışmalarında *Ac* olduğu belirlenen izolatın klasik PCR ile tanısını gerçekleştirmek, sağlıklı hıyar bitkilerinin içsel dokularından izole edilen ve daha önce hıyar bitkisindeki fungal ve bakteriyel patojenlere karşı denendiğinde biyolojik mücadele açısından başarılı bulunmuş endofitik bakterilerin (EB) *Ac* ile yapay bulaşık karpuz tohumlarında *in vivo* koşullarda etkililiğini değerlendirmek, bakteriyel endofitlerin *Ac*'ye karşı *in vitro* biyokontrol etki mekanizmasını araştırmak, başarılı bulunan endofitik bakterilerin moleküler tanısını gerçekleştirmek gibi aşamaları kapsamaktadır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1 Karpuzda Bakteriyel Meyve Lekesi Hastalığı İle İlgili Genel Bilgiler

Ac'nin neden olduğu karpuz bakteriyel meyve lekesi (KBML) karpuz ve kavun başta olmak üzere tüm kabakgillerde görülen ve kabakgil yetiştiriciliğini tehdit eden önemli bir sorundur.

Ac'nin neden olduğu bakteriyel meyve lekesi hastalığı ilk defa 1987 yılında Mariana Adaları'nda epidemi yapmıştır (Wall and Santos, 1988). İlk epidemiden bir yıl sonra Amerika Birleşik Devletleri'nin Florida, Güney Karolina ve İndiana eyaletlerinde şiddetli epidemiler yapmıştır (Somodi *et al.*, 1991). EPPO'nun verilerine göre bu hastalığın ABD'nin orta, kuzey ve güneyinde 17 eyalette (Alabama, Arkansas, Kaliforniya, Delaware, Florida, Georgia, Güney Carolina, Iowa, Illinois, Indiana, Kuzey Carolina, Maryland, Mississippi, Missouri, Oklahoma, Oregon, Teksas) varlığı bilinmektedir (Latin and Rane, 1990; Evans and Mulrooney, 1991; Jacobs *et al.*, 1992; Black *et al.*, 1994; Latin and Hopkins, 1995; Hamm and Spink, 1997; Langston *et al.*, 1999; Babadoost and Pataky, 2002; Kumagai *et al.*, 2014). ABD dışında Brezilya (Assis *et al.*, 1999), Japonya (Takashi *et al.*, 2000), Avusturalya (Martin and Horlock, 2002), Kosta Rika (Munoz ve Monterroso, 2002), Nikaragua (Munoz ve Monterroso, 2002), İsrail (Burdman *et al.*, 2004), Tayland (Walcott *et al.*, 2004), Kanada (Walcott *et al.*, 2004), Çin (Ren *et al.*, 2006), Kore (Seo *et al.*, 2006), İran (Harighi, 2007), Tayvan (Tzeng and Hsu, 2007), Macaristan (Palkovics *et al.*, 2008), Nijerya (Amadi *et al.*, 2009), Yunanistan (Holeva *et al.*, 2009), İtalya'da bu hastalığın sınırlı yerde var olduğunu ve bu alanların temizlendiği bildirilmiştir (EPPO, 2015) ve Sırbistan (Popović and Ivanović 2015)'da varlığı rapor edilmiştir.

Ülkemizde ise ilk defa 1996 yılında Edirne ilinin Enez ilçesinde ortaya çıkmış ve üretim alanı yakılarak yok edilmiştir (Demir, 1996). 2005 yılında ise Doğu Akdeniz Bölgesinde karpuz üretim alanlarında tespit edilmiştir (Mirik *et al.*, 2006). Çukurova bölgesinde 2009 ve 2010 yıllarında Adana ve Osmaniye illerinde büyük epidemiler yaşanmış ve bu hastalığa bağlı etmen olduğu belirlenmiş ve bu karpuz üretim alanları karantinaya alınmış ve 4 yıl boyunca

kabakgil üretimi yasaklanmıştır (Aysan ve ark., 2011; Horuz, 2014). Adana, Mersin ve Osmaniye’de 2009-2011 yılları arasında karpuz tarlalarında yapılan surveylerde bu etmeni izole ettiklerini bildirmişlerdir (Horuz ve Aysan, 2012). Ayrıca bu bölgede yetiştirilen yerel bir kavun (*Cucumis melo* cv. Surmeli) çeşidinin de bu hastalık etmeni ile bulaşık olduğu bildirmiş ve ülkemizde Ac’nin yeni bir konukçusu olduğu ilk kez rapor edilmiştir (Horuz ve ark., 2014).

Son 20 yıldır tüm karpuz ve kavun tohumları Çin’de üretilmektedir. Ac’nin en önemli inokulum kaynağı bulaşık tohumdur (O’Brien and Martin 1999). Karpuz alanlarına tohum kaynaklı olan KBML hastalığının nereden ve nasıl yayıldığı halen bilinmemektedir. Bu durumun hastalıkla bulaşık alanlardan patojenin tohumluk üretilen alanlarına ve buradan da tüm dünyaya yayılmasına neden olduğu düşünülmektedir. Dünya tohum sektörü de bu şekilde etkilenmiştir (Feng et al., 2013).

Karpuz bakteriyel meyve lekesi hastalığının tüm kabakgil (kavun, karpuz, kabak, hıyar) bitkileri konukçusudur (Latin, 2000). Etmen hastalıklı patlıcan fidelerinden ve domates tohumlarında izole edilmiş, kabakgil bitkilerinde hastalık belirtisi oluşturmuştur (Nascimento et al., 2004). Ayrıca İran’da karaçalı bitkisi (*Paliurus spina christi*) (Harighi, 2007) ve Tayvan’da karabiber bitkisinde (*Piper betle*) hastalık belirtisi oluşturmuştur (Deng et al., 2010).

Dünyada Ac’nin iki farklı inokulum kaynağının varlığı konusunda bir kaç çalışma yapılmıştır (Walcott et al., 2000; 2004; Burdman et al., 2005). Buna göre, izolat konukçu ilişkisinden bahsedilmiş genotipik açıdan Ac izolatlarının PFGE (Pulse Field Gel Elektrophoresis) analizi ile DNA görüntüleme ve bakteri hücre duvarındaki farklı yağ asitlerine göre ayıran FAME (Fatty Acid Methyl Esters)’ kullanarak 2 gruba ayrıldığını ve kabakgillerden izole edilen Ac izolatları grup I olup karpuz dışındaki bitkileri hastalandırırken, karpuzdan izole edilen Ac izolatları grup II de olduğu genellikle karpuzları hastalandıran izolatlar olduğunu rapor etmişlerdir. Bu çalışmaların aksine, Ac izolatlarının iki gruba ayrıldığı ve her iki grupta kavun ve karpuzdan izole edilmiş izolatların yer aldığı saptanmıştır. (Wen et al., 2008; Feng et al., 2009a; Yan et al., 2013; Melo et al., 2014). Horuz, (2014) Adana ve çevresinde yaptığı bir çalışmada karpuzdan elde edilen izolatlar tek bir grupta toplanmamış, diğer kabakgillerden elde edilenlerle aynı grupta yer

alan izolatların varlığını da ortaya koymuş ve Türkiyedeki izolatların karpuz ve karpuz dışındaki kabakgillerden izole edilenler diye iki grupta ayırmanın uygun olmadığına karar verilmiştir.

Hastalık belirtileri iklim koşullarına bağlı olarak, ilk önce fidelerde, tohumun çimlenmesinden 7-10 gün sonra gözlenir. Fidelerin kotiledon yapraklarının alt yüzeyinde su emmiş lekeler şeklinde ortaya çıkar. Su emmiş lekeler küçük dağınık şekilde olmakta ve ilerleyen zamanda bu lekeler birleşir ve kotiledonun orta damarı boyunca ilerler. Su emmiş lekeler kuruduktan sonra kızılımsı kahverengi ve daha koyu renkte lezyonlar oluşur. Lekeler gerçek yaprakların gövdeleri boyunca ilerleyebilir ve şiddetli durumlarda ise fidelerin çökmesine ve çökerten biçiminde ölümlere neden olabilir (Walcott, 2008). Ayrıca yaprakların ucundan geriye doğru uzanan V şeklinde lekeler de gözlenir. Bu lekeler birleştikçe ayırt edilemez hale gelip, fungal yaprak leke hastalıkları (antraknoz ve *Didymella*) ile karıştırılabilir. Hastalık etmeni gerçek yapraklarda belirti vermeyebilir, patojen yaprakta epifitik olarak kalabilir ve meyve dönemde belirti verebilir. Bu şekilde yaprakta bulunan etmen, meyvelerin güneşten korunmak amacıyla yapraklarla örtülmesi aşamasında meyveye geçiş yapar. Meyveye geçişler daha çok çiçeklenme ve erken dönemlerde gerçekleşir. Bitkide gövde, petiol ve kökler hastalanmaz (Walcott, 2005).

Meyvelerin ilk gelişim dönemlerinde hastalık belirtileri belli belirsizdir. Karpuz meyvelerinin üzerinde küçük su emmiş yağimsı görünümde zeytin yeşili renkte düzensiz lekeler oluşur. Enfeksiyonun erken dönemlerinde, bu lekeler serttir ve meyve etine çok nadir bulaşır. Bu lekeler ya kabuk yüzeyinde kalır ya da uygun koşullar devam ettikçe meyve etine ilerler. Bu belirtiler sıcaklığın da yüksek olduğu hasattan hemen önceki zamanda bir anda ortaya çıkar. Yüzeydeki lekeler genişleyerek 5-8 gün içerisinde meyvelerin üst yüzeyini tamamen kaplar. Meyveler olgunlaştıkça kabuk yüzeyindeki bu lekeler kahverengileşir ve çatlamalar gözlenir. Bu çatlaklardan amber sıvısı renkte veya köpürmeler şeklinde bakteriyel akıntı oluşur. İlerleyen zamanda meyve içinde sulu çürüklük oluşur ve bu şekildeki meyve saprofitlerin saldırısına uğrar. Bu aşamada meyvelerde çürümeden dolayı şiddetli bir ağır koku oluşmaktadır (Walcott, 2008). Bu şekilde meyve kabuğundan meyve etine ulaşan bakteri meyve içerisindeki tohuma da bulaşır (Isakeit *et al.*, 1998).

Patojen karpuz çiçekleri ile tohum enfeksiyonu gerçekleşir ve bulaşık çiçeklerden oluşan meyveler belirti göstermese bile bu tohumların Ac ile bulaşık olduğu belirtilmektedir (Walcott *et al.*, 2002). Enfekteli tohumlar ise %63'e varan hastalık bulaştırma potansiyeline sahiptir (Walcott *et al.*, 2003; Fessehaie and Walcott, 2005).

Hastalık için ana inokulum kaynağı bulaşık tohumlardır. Hastalık etmeni bakteri uygun koşullarında depolandığında tohumda otuz yıl kadar yaşamını devam ettirir (Block and Shepherd, 2008). Bu yüzden hastalıklı tohumlar bulaşmalar açısından önemlidir (Rane and Latin, 1992; Latin and Hopkins, 1995; Hopkins and Thompson, 2002). İklim koşulları hastalık için uygun olduğunda, birkaç hasta bitkiden tarladaki diğer bitkilerin tümüne hastalık bulaşabilir. Erken dönemde bir enfeksiyon gerçekleşirse ürün kaybı %100'e kadar ulaşabilir (Mirik and Aysan, 2008). Hastalık belirtisi olmasa bile, epifitik durumdaki patojen uygun koşullarda şiddetli epidemilere neden olabilmektedir (Latin *et al.*, 1995; Walcott, 2005). Bu nedenle, 30.000 tohum içerisinde bir tohumun bile bulaşık olmasının hastalık epidemisi için yeterli olabileceği bildirilmiştir (Walcott *et al.*, 2003). Kabakgil tohumlarının hastalığa toleransı sıfırdır ve karpuz ve kavun tohumlarının test edilmesi ve Ac'den arı olduğundan emin olunması gerekmektedir.

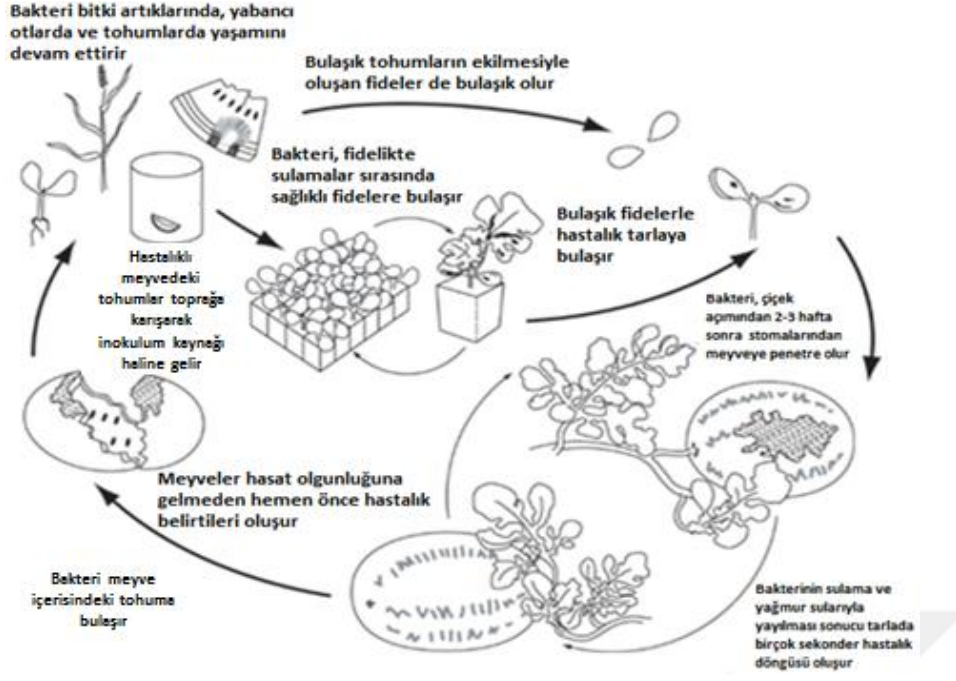


Şekil 2.1 Karpuz bakteriyel meyve lekesi kotiledon yapraklardaki belirtisi (Walcott, 2005)



Şekil 2.2 Karpuz bakteriyel meyve lekesi hastalığının meyvelerdeki belirtisi (Walcott, 2005)

Bakteri tohum kaynaklıdır ve hastalık çemberi fidelik üretiminde kullanılan bulaşık tohumlarla başlar, sıcak ve nemli koşullar ise hastalığın yayılmasını teşvik eder (Latin and Hopkins, 1995). Hastalık etmeni bitkide yapraklarda stomalardan ve yaralardan giriş yapar (Walcott, 2008) ve hastalık sistemik olarak ilerler (Bahar *et al.*, 2009). Gelişmekte olan fideler bakteriye son derece duyarlıdır ve genellikle kotiledon enfeksiyonlarına ve fide yanıklığına uğrarlar. Eğer hafif bir enfeksiyon olursa belirtiler fark edilmeyebilir ve fideler tarlaya şaşırtılır. Olgun bitkiler patojene karşı nispeten daha dayanıklıdır ve göze çarpmayan belirtiler oluşturabilir. Bu sağlıklı görünen bitkiler daha sonraki yüksek ölçüde duyarlı ve hastalığa adını veren meyve enfeksiyonları için patojene kaynaklık edebilir. Hastalık etmeni çiçeklenmeden 2- 3 hafta sonra stomalardan meyve yüzeyine geçer ve meyvede enfeksiyon oluşur. Stomalar bu aşamadan sonra kapanır ve mumla kaplanarak daha sonra oluşacak bulaşmalardan koruma sağlar. Bu nedenle, olgunlaşmış meyvede yara olmadıkça patojenle bulaşma gerçekleşmez (Walcott, 2005). Hastalık için uygun koşullarda bulaşık olan tarlalarda neredeyse ürünün tamamı kaybedilir çünkü belirtilerin olduğu meyveler pazar değerini yitirirler (Latin and Hopkins 1995). Hastalık etmeni toprağa gömülmüş tohumların kabuğunda, bitki artıklarında ve yabani kabakgil bitkilerinde kışı geçirebilmektedir (Isakeit *et al.*, 1998). Hastalığın yaşam döngüsü Şekil 2.3'de (Walcott, 2005) verilmiştir.



Şekil 2.3 Ac'nin yaşam döngüsü (Walcott, 2005)

Ancak iklim koşulları uygun değilse bakteri fidelerde herhangi bir hastalık belirtisi göstermeden epifitik olarak kalabilir. Yüksek sıcaklık ve nem hastalık etmeninin gelişmesi için en uygun koşullardır. Sıcaklığın 26°C olması ve yarım saat süreyle yaprakların ıslak kalması sonucu enfeksiyon gerçekleşir. Ac sulama suyu ve yağmur suyuyla böcekler, hayvanlar, kullanılan alet ve ekipmanlar hastalığın yayılmasında rol oynar. Bir çalışmada arıların hastalıkla bulaşık bitkilerden patojeni diğer bitkilerin çiçeklerine taşıdığını ve arıların tarla içerisinde yayılmasında vektör olabileceğini bildirmişlerdir (Fessehaie and Walcott, 2005).

2.2 Hastalık Etmeni İle İlgili Bilgiler

Karpuzun ekonomik anlamda en önemli hastalığı Ac'nin neden olduğu bakteriyel meyve lekesi hastalığıdır. Ac; Bacteria alemi, Proteobacteria şubesi, Betaproteobacteria sınıfı, Burkholderiales takımı, *Comamonadaceae* familyası, *Acidovorax* cinsi içerisinde yer alır (Schaad et al., 2008).

ABD'nin Florida eyaletinin güneyinde karpuz tarlalarında yaprak lekesine neden olan bir bakteri ilk kez bildirilmiştir (Mullin and Schenck, 1963). ABD'nin

Georgia eyaletinde Türkiye'den ithal edilen introduksiyon materyalinin (174103 ve 174104) fidelerin yapraklarında su emmiş lekeler olduğu ve bu patojenin tohum kökenli olduğunu ilk kez ortaya koymuşlardır (Webb and Goth, 1965). ABD'nin Florida eyaletinde bir araştırma istasyonunda karpuz meyve lekesi belirtileri saptanmıştır (Crall and Schenck, 1969). ABD'nin Georgia eyaletinde elde edilen bakteri tür düzeyinde tanılanmış ve patojen ilk kez Georgia eyaletinde *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli* olarak isimlendirilmiştir (Schaad et al., 1978). Daha sonra etmenin adı *Pseudomonas avenae* subsp. *citrulli* (Schaad et al., 1978; Hu et al., 1991; Somodi et al., 1991) olarak değiştirilmiştir. Nükleik asit hibridizasyonu, tüm hücre proteini analizleri ve karbon kaynaklarının kullanımının ortaya konmasından sonra etmen, *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* olarak Willems et al., (1992) tarafından yeniden isimlendirilmiştir, son taksonomide Schaad et al., (2008) etmenin adını *Acidovorax citrulli* olarak değiştirmiştir.

Ac ortalama 0.5-1.7 µm boyutlarında, Gram negatif, aerobik, düz veya çok hafif kıvrıma sahip çubuk şeklinde, 5.0 µm boyutlarında hareketli, nadiren iki veya üç de olabilen genellikle bir polar kamçıya sahiptir. Hastalık etmeninin optimum gelişme sıcaklığı 27-30°C, minimum 1°C ve maksimum 41°C'dir. Hastalık etmeni, okidaz pozitif, arginin dehidrolaz testi negatif, tütün yapraklarında aşırı duyarlılık reaksiyonu gösteren özellikte bir bitki patojeni bakteridir (Schaad et al., 1978; Lelliot and Stead, 1987; Schaad et al., 2001; Walcott, 2005; Burdman and Walcott, 2012).

Acidovorax alttürlerinin ayırımında kullanılan özellikler Çizelge 2.1'de (Schaad et al., 2001) verilmiştir.

Çizelge 2.1 *Acidovorax avenae* alttürlerinin ayırımında kullanılan özellikler

Özellik	<i>avenae</i>	<i>cattleyae</i>	<i>citrulli</i>
<u>Gelişme:</u>			
D-xylose	+	-	+ ^D
D-fucose	+	+	+ ^D
D-mannitol ya da D-arabitol	+	+	-
Sorbitol	+	+	-
Sucrose	-	+	-
L-threonine ya da L-histidine	+	+	-
Nitrat indirgenmesi	+	+	-
Lactalysate ya da beef extract ppt.	+	-	-
Nişasta hidrolizi	+ ^D	+ ^D	-
<u>Patojenisite:</u>			
Karpuz	-	ND	+
Kantalop	-	ND	+
Kabak	-	ND	+
Bal kabağı	-	ND	+
Mısır	+	ND	-
Çeltik	+	ND	-
<i>Phalaenopsis</i> spp.	-	+	-
<i>Cattleya</i> spp.	-	+	-
<i>Amorphophallus koniac</i>	-	-	-

+, % 80 ya da daha fazla izolat pozitif; +^D, % 80 ya da daha fazla izolat pozitif fakat geç sonuç verir; -, % 80 ya da daha fazla izolat negatif; ND, belirlenmemiş.

Hastalık etmenin tanılanmasında PCR, serolojik yöntemler, otomatik ticari teknikler (karbon kaynağı kullanımı ve yağ asidi profilleri) kullanılmaktadır (Walcott, 2005).

2.3 Hastalık Etmeninin Tanılanmasına Yönelik Çalışmalar

Ac üretim sezonunda büyük kayıplara neden olur. Fidelerde belirti oluşturmada bulunabilir ve araziye şaşırtılan hastalıklı fide oranına bağlı olarak,

hastalığın yoğunluğu tarlada değişiklik gösterir (Walcott, 2008). Bu nedenle, hastalık etmeni bakterinin modern tanı teknikleri ile saptanması ekonomik ve epidemiyolojik açıdan büyük önem taşımaktadır.

Walcott ve ark., (2000) ABD'nin Georgia eyaletinde 1999 yılının Nisan-Temmuz ayları arasında kantaloop kavununda yapraklarda nekroz ve meyvelerde çürüklük şikayetlerinin olduğunu bildirmişlerdir. Yaprak orta damarı boyunca gelişen nekrotik lekeler, meyve yüzeyinde yuvarlak, nekrotik, içe çökük lekeler ve çatlaklar şeklinde belirtiler olduğu gözlenmiştir. Meyve kabuğundan meyve etine doğru ilerleyen bir çürüklük olduğu ve meyvelerin %5'inin bu şekilde hastalandığını saptamışlardır. İzolasyonlarda floresan olmayan özellikte, krem renkte koloniyi saflaştırmışlardır. Patojenisite testinde karpuz fidelerine püskürtme yapılmış ve su emmiş koyu yeşil renkte lekeler oluşturmuştur. WFB 1/ WFB 2 primerleri kullanılarak yapılan spesifik PCR ile tüm izolatlar Ac olarak tanımlanmıştır.

Horuz ve Aysan (2011) çalışmada altı farklı tarladan alınan karpuz tohumlarında, Ac'nin tohumla taşınma oranını araştırmışlardır. Tohumlardan gelişen fidelerde hastalık belirtileri tespit etmişlerdir. Her tarladan alınan tohumlardan gelişen fidelerdeki bulaşıklık oranını %22-39 olarak saptamışlardır. Lekeli kısımlardan yaptıkları izolasyonlardan elde ettikleri bakterileri ELISA ve WFB 1/ WFB 2 primerleri kullanılarak yapılan spesifik PCR testi ile Ac olarak tanımlamışlardır. Bu çalışma ile tohumda yüksek oranda saptanan bakteri inokulumunun önemini vurgulamışlardır.

Tian ve ark., (2013) Çin' de kabak anacı üzerine aşılı karpuz fidelerinde yanıklık belirtisi gösteren bitkilerden BX-L1/BX-S-R2 primerlerini kullanarak türe spesifik PCR ile Ac'nin fidelerde varlığını ortaya koymuşlardır. Esas inokulum kaynağını bulmak amacıyla çiftçiden karpuz ve kabak tohumları alınmış ve türe spesifik PCR yöntemi ile Ac yönünden testlenmiştir. Ayrıca tohumlardan ekim yapılarak, gelişen kabak fidelerinde tipik hastalık belirtileri oluşurken, karpuz fidelerinde herhangi bir belirti olmadığı gözlenmiştir. Sonuç olarak hastalık etmeni bakterinin, aşılama sırasında kabak bitkilerinden karpuz bitkilerine bulaştığı ortaya konmuştur.

Kumugai ve ark., (2014) ABD'nin Kaliforniya eyaletinde kavun üretilen bir tarlada kahverengi düzensiz lekeler olduğunu saptamışlardır. İzolasyonlarda krem renkte, floresan olmayan bakteri kolonilerini elde etmişlerdir. Bakteri çubuk şeklinde, gram negatif, oksidaz pozitif, aerobik, tütün aşırı duyarlılık reaksiyonu oluşturan ve 41 °C gelişim gösteren bir etmen olarak belirlenmiştir. Bu testlere ek olarak BX-L1/BX-S-R2 primerlerini kullanarak real-time PCR ve WFB 1/ WFB 2 primerleri kullanılarak yapılan klasik PCR ile kavunda hastalığa neden olan etmenin *Ac* olduğunu ve Kaliforniya için ilk rapor olduğunu bildirmişlerdir.

Horuz ve ark., (2014) Doğu Akdeniz Bölgesinde 2010 ve 2011 yılları yaz aylarında kavun üretim alanlarında özellikler yerel bir çeşit olan *Cucumis melo* cv. Surmeli yapraklarında su emmiş lekeler, açık kahverenginden kırmızımsı kahverengiye kadar değişen renklerde düzensiz lekeler ve meyve yüzeyinde su emmiş, yağlımsı görünümde, kabuğun alt yüzeyinde biten ve meyve etine çok işlemeyen koyu yeşil lekeler, çatlamalar ve yumuşamalar olduğunu saptamışlardır. Bu kısımlardan yaptıkları izolasyonlarda 35 adet yavaş gelişen, yuvarlak, krem renkte, floresan olmayan özellikte gram negatif bakteriyi izole etmişlerdir. Elde ettikleri bakterileri kavun fide ve meyvesinde patojenisite, DAS-ELISA, WFB 1/ WFB 2 primerleri kullanılarak yapılan spesifik PCR testleriyle *Ac* olarak tanılamışlardır. Etmenin Türkiye'de kavunlarda ilk kez saptandığını da rapor etmişlerdir.

Çetinkaya-Yıldız ve Karataş (2014) Doğu Akdeniz Bölgesinde 2011 ve 2012 yılları arasında Adana, Mersin ve Osmaniye illerinde karpuz tarlalarından aldıkları örneklerden 51 adet bakteri izolatu elde ettiklerini bildirmişlerdir. Bu izolatların tanısını geleneksel yöntemler ve WFB 1/ WFB 2 primerleri kullanılarak yapılan spesifik PCR testi ile yapmışlardır. Hastalığın görüldüğü tarlaların Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı tarafından karantinaya alınarak bu alanlarda 4 yıl boyunca kabakgil üretiminin yasaklandığını bildirmişlerdir. Etmenin toprakta ve tohumda yaşam süresinin belirlenmesi çalışmasında patojenin Osmaniye'den alınan toprakta 180 gün, Adana'dan alınan toprakta 120 gün boyunca yaşamını devam ettirdiği, oda sıcaklığında saklanan karpuz tohumlarında ise dokuz ay canlılığını sürdürdüğünü saptamışlardır.

Horuz (2014) tarafından yapılan çalışmada, 2009-2012 yılları arasında Doğu Akdeniz Bölgesi'ndeki önemli karpuz ve kavun üretim alanlarından izole edilen 108 adet *Ac* izolatının biyokimyasal ve moleküler testlerle tanısı, izolatlar arası genetik akrabalığı ise AFLP-PCR yöntemiyle belirlemişlerdir. Bu çalışma sonucunda WFB 1/ WFB 2 primerleri kullanılarak yapılan spesifik PCR ile tüm izolatlar *Ac* olarak tanımlanmıştır. Ayrıca moleküler analiz sonucunda ülkemizdeki izolatların iki farklı inokulum kaynağından geldiğini belirlemişlerdir. Farklı ülkelerden elde edilen izolatlarla ülkemizdeki izolatların aynı kökenli olduğu, hastalığın bu sebepten dolayı tohum ticaretiyle yayılmış olabileceğini moleküler testlerle kanıtlamışlardır.

Popović ve Ivanović (2015) Sırbistan'ın Backa bölgesinde 2014 yılı Ağustos ayında 3 ha alanda olgun karpuz meyvelerinde tipik bakteriyel meyve lekeleri gözlenmiştir. Bu meyvelerden yaptıkları izolasyonlarda 20 adet yuvarlak, krem renkte, floresan olmayan özellikte gram negatif bakteriyi izole etmişlerdir. Bu izolatların tanısını geleneksel yöntemler ve türe spesifik PCR testi ile yapmışlardır. Bu bitkilerden izole edilen izolatlar BX-L1/BX-S-R2 primerlerini kullanarak türe spesifik PCR ile *Ac*'nin meyvelerde varlığını ortaya koymuşlardır. Sırbistan için ilk rapor olduğunu bildirmişlerdir.

2.4 Hastalık Etmeninin Mücadelesine Yönelik Çalışmalar

2.4.1 Kültürel önlemler

Hastalığın önlenmesinde kültürel mücadelenin oldukça önemli olduğu bilinmektedir. Bu önlemler arasında; hastalıktan ari, sertifikalı tohum ve fideler kullanılması, yağmurlama sulama yerine damla sulamanın tercih edilmesi, fidelik veya tarlada ve yakınlarındaki alanlarda hasta bitkilerin ve yabancı karpuzların sökülerek imha edilmesi, bakterinin yayılmasını azaltmak için yaprak alanının uzun süre ıslak kalmasının engellenmesi, serada ve viyollerde hastalıktan ari toprak, su ve alet-ekipmanların kullanılması, bakım işlemleri sırasında fidelerin yaralanmamasına özen gösterilmesi, fideliklerde kabakgil türlerinin birbirinden uzak yetiştirilmesi, seraların çıkış kapılarının rüzgarlı günlerde kapalı tutulması gibi kültürel önlemler yer almaktadır (Hopkins, 1995).

Bakterinin yayılmasında sulamanın etki ettiği bilinmektedir ve bakterinin serada bulaşmasının ve yayılmasının düşük sıcaklık ve nemde azalabileceği bildirilmektedir (Latin and Hopkins, 1995).

Hastalığın görüldüğü alanlarda en az 4 yıl süreyle özellikle karpuz, kabakgil üretiminin yapılmaması ve bu alanlarda kendiliğinden gelişen bitkiler ve yabancı otlarında yok edilmesinin bulaşma riskini azaltacağı bilinmektedir. Ayrıca KBML hastalığı ile bulaşık tarlalarda ekimden önce bulaşık bitkileri yok etmek için herbisit kullanılması da önerilmektedir (Hopkins, 1995).

Zimerman-Lax ve ark., (2015) sera koşullarında nitrat ve amonyum ikili kombinasyonları karşılaştırıldığında, azot gübrelemesinde sadece nitrat kullanıldığında hastalık şiddetinin ve kavun yapraklarında bakteri yoğunluğunun düştüğünü saptamışlardır. Büyüme sezonu boyunca patojenin varlığının, önemli verim kayıplarına neden olan meyve enfeksiyon oranının arttırdığı sanılmaktadır. Bu nedenle hastalık şiddeti ve Ac'nin bitki yapraklarındaki yoğunluğunun azalması önemlidir. Araştırmacılar Ac'ye karşı azot gübrelemenin etki mekanizmasının henüz bilinmediğini ve bu konuda birçok araştırma yapılmasına ihtiyaç duyulduğu vurgulamışlardır.

Ferreira ve ark., (2015) KBML hastalığının gelişimine kalsiyum silikatın (silikon) etkililiğini araştırmıştır. Farklı miktarlarda kalsiyum silikat (0.00, 0.12, 0.24, 0.71 ve 1.41g Si (silisyum) kg⁻¹) içeren topraklar içerisinde sarı kavun hibrit çeşidi bitkiler plastik saksılarda büyütülmüştür. Bitki çıkışından 20 gün sonra Ac inokule edilmiştir. Hastalık oranı ve şiddeti her dört günde bir kontrol edilmiştir. Ayrıca inkubasyon periyodu ve hastalık şiddeti saptanmıştır. 45 günlük bitkilerden makro ve mikro besin elementleri ile birlikte bitki gelişimi saptanmıştır. En yüksek Si dozunda hastalık oranı %50 ve hastalık şiddeti %89 oranında azalmıştır. İnkubasyon periyodu ise, kontrolle kıyaslandığında %192 oranında artmıştır. Kavunda bitki beslenmesindeki artışın KBML hastalığı gelişiminin baskılanmasında önemli bir role sahip olduğu bildirilmiştir.

2.4.2 Dayanıklı çeşitlerin kullanımı

Kabakgillerden karpuz ve kavun türleri hastalığa en duyarlıdır (Latin, 2000). Karpuz çeşitlerinin hastalığa dayanıklılığı konusunda yapılan çalışmalarda Congo çeşidi hastalığa dayanıklı bulunmuş (Sowell and Schaad, 1979) fakat bu çeşidin ilerleyen zamanda hastalığa duyarlı olduğu bildirilmiştir (Hopkins *et al.*, 1993). Garrisonian çeşit karpuzların dayanıklılık geni içerdiği bildirilmiştir (Goth and Webb, 1981). Ayrıca, koyu yeşil çizgili olan meyvelerin daha açık yeşil çizgili meyvelere oranla daha az duyarlı olduğunu bildirmişlerdir (Hopkins *et al.*, 1993). Günümüzde ise hastalığa dayanıklı ticari bir kabakgil çeşidi bulunmamaktadır (Bahar *et al.*, 2009; Bahar and Burdman, 2010).

2.4.3 Kimyasal mücadele

KBML hastalığının kimyasal mücadelesinde etkili bir kimyasal henüz bulunamamıştır. Tüm bakteriyel hastalıklarda olduğu gibi Ac ile mücadelede en önemlisi hastalıktan ari tohum ve fide kullanılmasıdır. Tohum kaynaklı bir hastalık olması sebebiyle tohum uygulamaları yapılmaktadır. Bunlar; tohumlara bakırlı preparatlar, peroksiasetik asit, streptomisin sülfat, sodyum hipoklorid, kalsiyum hipoklorid, hidroklorik asit ve tohum fermentasyonu gibi uygulamaları içermektedir (Zhao *et al.*, 2003; Hopkins *et al.*, 2003; Feng *et al.*, 2007). Fakat bu uygulamalar tohum çimlenmesini ve fide gelişimini engellemesi gibi tohum kalitesi üzerine olumsuz etkileri olabilmektedir (Sowell and Schaad, 1979; Hopkins *et al.*, 1996, 2003; Zhao *et al.*, 2003). Ayrıca tohuma kuru sıcaklık uygulaması, klor gazında 9 saat maruz bırakma ve asidik elektrolize su uygulamalarının da Ac'ye karşı etkili olduğunu bildirilmiştir (Hopkins *et al.*, 1996, 2003; Shirakawa, 2003; Stephens *et al.*, 2008; Feng *et al.*, 2009b; Kubota *et al.*, 2012). Bakırlı preparatlar hastalıkla mücadelede koruyucu olarak önerilmektedir. Hastalık kontrolü için yeşil aksamı kaplayacak şekilde 7-10 gün aralıklarla uygulanması ve yağmur yağması durumunda uygulanan kimyasalların etkisi azalmaktadır. Bakırlı preparatların yaygın kullanılması sonucu bakterinin bakıra dayanıklılık kazama riski gibi olumsuz yönü bulunmaktadır (Latin and Hopkins, 1995; Walcott *et al.*, 2004; Wechter *et al.*, 2011). Günümüzde tohum kaynaklı bulaşmaları etkili bir şekilde ortadan kaldıracak ve tohum kalitesinde

kayda değer bir olumsuz etki yaratmayacak dezenfektanlara ihtiyaç duyulmaktadır.

2.4.4 Biyolojik mücadele

Hastalığın birincil inokulum kaynağı tohumdur, patojen daha çok tohum kabuğunun altında, bazen de tohum yüzeyinde bulunabilir (Silva Neto *et al.*, 2006). Genel olarak tohumlara uygulanan fermentasyon, peroksiasetik asit, bakırlı preparatlar, antibiyotik (streptomisin sülfat), hidroklorik asit ve sodyum hipoklorid gibi kimyasallar ve sıcak su uygulamaları tohum kaynaklı *Ac*'yi azaltmakla birlikte, tamamen ortadan kaldıramamaktadır (Sowell and Schaad, 1979; Hopkins *et al.*, 1996, 2003). Bu nedenle, son yıllarda, tohumlara uygulanacak biyolojik mücadelenin KBML hastalığı için iyi bir alternatif olabileceği yönünde birçok araştırma yapılmıştır (Fessehaie and Walcott, 2005; Mederios *et al.*, 2009).

Lu ve Luo (2004) çalışmalarında kavundan izole edilen kesin tanısı yapılmamış endofitik bakterilerinin *Ac* ile biyolojik mücadele çalışmalarında kullanılabileceğini ortaya koymuşlardır.

Fessehaie ve Walcott (2005) yaptıkları çalışmada; *Pseudomonas fluorescens* (A506), *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* (AAA99-2) ve karpuz tohumundan izole edilen tanılanmamış Gram pozitif bakteri (WS-1) *in vitro* ve *in vivo* koşullarında patojenle doğal bulaşık karpuz tohumlarına uygulandığında *Ac*'nin neden olduğu KBML hastalığına etkisini araştırmışlardır. *In vitro* koşullarda bu bakterilerin patojen gelişimini baskıladığı saptanmıştır. Mısır bitkisinde patojen olup karpuz bitkisinde patojen olmayan *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* (AAA99-2) antagonist bakterisi KBML hastalığı çıkışını iklim odası koşullarda %96.5, sera koşullarında ise %100 oranında baskılanmıştır. Sera koşullarındaki bu durum çevre koşullarının hastalık gelişimi için uygun olmadığı şeklinde yorumlanmıştır. İyi bir antagonizmin olabilmesi için çevre koşullarının da hastalık gelişimi için uygun hale getirilmiş olması gerektiğini savunmuşlardır. *Ac* ile bulaşık karpuz çiçek uygulamalarının *Pseudomonas fluorescens* (A506) ve *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* (AAA99-2) antagonist bakterileri ile *Ac*'nin

tohuma bulaşma oranını azalttığını fakat tamamen önlemede başarısız olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* (AAA99-2) antagonist bakteri ile çiçek uygulamasının tohum çimlenmesinde artışa neden olduğunu ve tohum gelişimini olumlu yönde etkilediğini bildirmişlerdir.

Santos ve ark., (2006), *in vivo* koşullarda kavun tohum uygulaması olarak, *Bacillus megaterium* pv. *cerealis* (RAB7) adlı antagonist bakteriyi uygulamış ve KBML hastalık şiddetini %92.7 oranında baskılamıştır.

Yaeram ve ark., (2006), *in vitro* koşullarda *Streptomyces* spp. antagonist bakterinin KBML hastalığına karşı biyolojik kontrol potansiyelinin olduğunu saptanmıştır.

Oliveira ve ark., (2006) epifitik ve endofitik 96 bakteri ile 69 endofitik fungus izolatını hastalık belirtisi göstermeyen kavun bitkilerinden izole etmiş ve *in vivo* koşullarında antagonistlerin kavun tohumlarına uygulandığında *Acidovorax citrulli*'ye karşı etkisini araştırmışlardır. Endofitik bakterilerden ENM5 (Tanılanmamış), ENM9 (*Bacillus cereus*), ENM13(*Bacillus* sp.), ENM16 (*Bacillus cereus*), ENM32 (*Bacillus subtilis*), ve ENM43 (*Bacillus* sp.) izolatlarının KBML hastalığının gelişimini engellediği ve *Bacillus* türlerinin KBML hastalık şiddetini %93 oranında baskıladığı bildirilmiştir. Ayrıca bu izolatların biyolojik mücadelede açısından etki mekanizmaları belirlenmiş, ENM9 ve ENM13 isimli izolatların fosfatı çözdüğü, ENM isimli izolatın antibiyosis gösterdiği, ENM43 isimli izolatın ise HCN (hidrojen siyanür) ürettiğini ortaya koymuşlardır.

Mederios ve ark., (2009) yararlı bakteri izolatları, kavun tohumları ve yapraklarını KBML hastalığına karşı koruma özellikleri ve bitkide kolonize olmaları yönünden incelemiştir. *Bacillus* sp. (RAB9) adlı antagonist bakterisi, Ac ile bulaşık tohumlara uygulandığında hastalık gelişim eğrisindeki alanı %47 oranında azaltmış ve inkubasyon periyodunun ise %18-35 oranında uzatmıştır ve Acibenzolar-S-methyl'e benzer etki göstermiştir. *In vitro* koşullarda seçilen bakteriyel izolatlardan üçü (JM339, MEN2ve PEP91) Ac'ye karşı antibiyosis göstermiştir. Kavundan izole edilen *Paenibacillus lentimorbus* (MEN2) kavun

fidelerinin yapraklarına püskürtülerek *Ac*'ye karşı etkililiği araştırıldığında hastalık şiddeti %81 oranında azalmıştır. Rifampicin ve nalidiksik asite dayanıklı olarak genetiği değiştirilmiş *Bacillus* sp strain RAB9 kavun tohumuna uygulandıktan 12 saat sonra tohum yüzeyinde epifitik olarak, tohuma uygulandıktan 10 gün sonra ise kavun köklerinde endofitik ve gövdesinde epifitik olarak saptanmıştır. Antagonist bakterilerinin kavun kök ve gövdesinde iyi kolonizasyona sahip olduğu saptanmıştır. Ayrıca *Paenibacillus lentimorbus* antagonist bakterinin, bakır uygulamalarından etkilenmediği bu yönüyle önemli biyolojik kontrol potansiyelinin olduğu bildirilmiştir.

Wang ve ark., (2009) yaptıkları bir çalışmada mayaların KBML mücadelesinde etkililiklerini araştırmışlar ve farklı kültür bitkilerinin yaprak ve çiçeklerinden elde edilen 24 antagonist mayanın *in vitro*'da *Ac*'ye karşı antibiosis gösterdikleri, *in vivo* koşullarında karpuzdan izole edilen 0732-1 isimli mayanın cv.Hami kavun yapraklarına uygulandığında hastalık çıkışını azalttığı, tohumlara uygulandığında ise hastalık şiddetini %13-19 oranında önemli bir azalma sağladığı ve streptomycin sülfat ve hipoklorik asit uygulamasına yakın bir etki elde edildiği sonucuna varmışlardır. 0732-1 isimli maya izolatu *Pichia anomalo* (Hansen) Kurtzman olarak tanımlanmıştır.

Johnson ve ark., (2011) *Ac* izolatu ve patojen olmayan *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* (AAA99-2) adlı antagonist bakterileri ile KBML hastalığına karşı tohum uygulaması olarak etkisini araştırmışlardır. Bu amaçla *Ac*'nin *hrcC* geni silinmesiyle tip 3 salgı sistemine karşı mutasyona uğratılmış ve karpuz tohumlarına uygulanarak tohum çimlenmesi esnasında ne oranda kolonize olduğu ortaya konmuştur. *In vitro* koşullarında mutasyona uğratılmış *Ac* ve *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* (AAA99-2) adlı izolat doğal bulaşık tohumlara uygulandığında gelişen fidelerde hastalığın baskılanma oranı sırasıyla %81.8 ve %74.6 olarak saptanmıştır. *In vivo* koşullarda da mutasyona uğratılmış izolatın uygulandığı tohumlarda hastalık şiddeti %23 oranında engellenmiştir. Araştırmacılar mutasyona uğratılmış *Ac* izolatının KBML hastalığı ile entegre mücadele programlarında tohum uygulaması olarak kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Özşahinler ve Özaktan (2012) yaptığı bir çalışmada E.Ü Bitki koruma bölümü bakteriyoloji laboratuvarı stoklarında bulunan çeşitli konukçu X patojen sisteminde biyolojik savaş açısından etkililiği kanıtlanmış antagonist bakteriler arasından seçilmiş olan 26 aday bakterilerle yapılan ve iki kez yinelenen denemeler sonucunda, bazı epifitik bakterilerin *Ac* 'nin karpuz fidelerindeki hastalık şiddetini pozitif kontrol uygulamasına göre %67- 78 oranında engelleyerek, bakırlı preparat uygulamasından daha başarılı olduğunu bildirmiştir.

Horuz (2014) yaptığı çalışmada KBML hastalığının biyolojik mücadele olanaklarını antagonist bakterilerin kullanılmasıyla araştırmıştır. Bitki ve topraktan elde edilen 322 aday antagonist bakteri izolatuvarından 54 adedi *in vitro* ikili kültür testlerinde patojenin gelişimini baskılanmıştır. Bu izolatlar içerisinde seçilen 14 antagonist tohum uygulaması olarak uygulandığında hastalık çıkışı %10- 94, hastalık şiddeti ise %10- 96 oranında engellenmiştir. Sera koşullarında ise test edilen üç antagonistin (Antg-12, Antg-97 ve Antg-101) hastalık oluşumunu %20- 49, tarla koşullarında ise %7- 27 oranında baskıladığı bildirilmiştir.

Jiang ve ark., (2015) yaptıkları bir çalışmada, sera ve tarla koşullarında kendi laboratuvarlarında bulunan biyolojik kontrol potansiyeli kanıtlanmış 200 aday antagonist bakteri izolatının *Ac*'ye etkililiğini araştırdığında, 5 adedini başarılı bulmuştur. KBML hastalığına karşı 5 bakteri türünden biri olan 54 numaralı izolat en başarılı bulunmuştur. 54 numaralı izolat karpuz fidelerine uygulandığında hastalık şiddetini %60 oranında azalttığını bildirmişlerdir. 54 numaralı antagonist bakteri izolatı *Bacillus amyloliquefaciens* olarak tanımlanmıştır.

Conceição ve ark., (2014) kavundan izole edilen antagonist *Rhodotorula aurantiaca* (LMA1), *Rhodotorula glutinis* (LMS) ve *Pichia anomala* (CC-2) isimli maya izolatlarının ve silikonun (kalsiyum silikat) KBML hastalığına etkisini araştırmışlardır. Silikon toprağa karıştırıldıktan 25 gün sonra kavun tohumları ekilmiş ve tohum çimlendikten sonra kotiledon yapraklara antagonist maya püskürtülmüştür. Bu uygulamadan 24 saat sonra *Ac* yapraklara püskürtülmüştür. Bu uygulama sonuçlarına göre, antagonist maya *Rhodotorula aurantiaca* (LMA1) ve silikon tek olarak veya kombinasyon halinde

kullandıklarında 29 gün boyunca kavun bitkilerinde hastalık çıkışını engellediğini bildirmişleridir.

Farimaz ve ark., (2014) çeşitli bitki aktivatörleri ve ticari gübrelerin KBML hastalığına etkisini araştırmışlardır. Bu çalışmada 12 preparatı (ISR-2000, Crop-Set, Stubble-Aid, Messenger, Peras INC-2, Biocrop L45, Biozyme TF, Seaweed, Reva Zinc, Streptomycin, Okey ve Peras) denemişlerdir. Bu uygulama sonuçlarına göre, Crop-Set hariç tüm preparatların %15-58 oranında hastalığı baskıladığını belirlemişlerdir. Reva Zinc uygulaması hastalığı %58, Stubble-Aid uygulaması hastalığı %53 oranında engellemiştir. KBML hastalığının mücadelesinde Reva Zinc ve Stubble-Aid gibi iki preparatın tohum uygulamaları olarak pratikte kullanılabileceği önerilmiştir.

Melo ve ark., (2015), KBML hastalığına karşı mayaların biyolojik kontrol etkililiğini araştırdıkları bir çalışmada; fide, yaprak ve meyveye Ac'yi püskürtme şeklinde uygulamış ve tohum uygulaması yapmışlardır. Ayrıca mayaların *in vitro* aktiviteleri ve bitki gelişim düzenleme potansiyelleri değerlendirilmiştir. 60 izolat içinde LMA1 (*Rhodotorula aurantiaca*) , CC-2 (*Pichia anomala*) ve LMS (*Rhodotorula glutinis*) isimli izolatlar fide korunmasında en etkili olarak bulunmuştur. Bu 3 izolat arasında LMA1 ve CC-2'nin yaprak ve tohum uygulamalarında etkili olduğu saptanmış ve hastalık şiddetinde sırasıyla % 58.6 ve % 47.2'lik bir azalışa neden olmuştur. LMA1 ve LMS isimli izolatlar ise meyveyi korumuştur. *In vitro* koşullarda izolatların hiçbiri bakteri gelişmesini engellememiş, öldürücü toksin üretmemiş ve patojen ile besin yarışması göstermemiştir. Bu izolatların kavun bitkisinin gelişmesine olumsuz etki göstermemesi nedeniyle KBML hastalığına karşı bitki yetiştiriciliğinin farklı dönemlerinde (LMA1, CC-2 ve LMS fidelerde, LMA1 ve LMS meyvelerde, LMA1 ve CC-2 kavun tohumlarında) entegre mücadele programlarında kullanılabileceği bildirilmiştir.

İçsel bitki dokuları endofitik bakteriler için korunaklı bir ortam sağlayarak, bitki patojenlerine özellikle de vasküler solgunluk patojenine benzer şekilde kolonize olmalarına olanak sağlar. Bu nedenle, antagonistik endofitik bakteriler biyolojik mücadele elemanı olarak umut verici bulunmaktadır (Berg and

Hallmann, 2006). Ayrıca endofitik bakterilerin bitkilerde verimi artırıcı etkisi olduğuna dair çalışmalar da yapılmıştır (Chen *et al.*, 1996; Arias, 2000; Luz, 2000; Romeiro, 2000; Wall, 2000; Akbaba, 2014; Akat, 2015; Fakhraei, 2015). Endofitik bakteriler bitki hastalıklarının baskılanmasında; antibiosis (Sturz *et al.*, 1998), yer ve besin rekabeti (Puentea *et al.*, 2009) mekanizmalarını kullanarak patojene karşı doğrudan etki gösterirken, bitkide dayanıklılık sistemlerini de uyarak patojenlere karşı dolaylı etki göstermektedirler (M'Piga *et al.*, 1997).

Endofitik bakterilerin, bitki hastalıklarının biyolojik mücadelesinde kullanılması ile ilgili sınırlı çalışma yapılmıştır. Van Buren ve ark., (1993) patates bitkisinde bakteriyel kanser hastalığını (*Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*), floresan *Pseudomonas* (CICA90) izolatı ile azalttığını bildirmişlerdir. Şeker pancarı bitkisinde *Rhizoctonia solani* etmeninin neden olduğu kök çürüklüğü hastalığını *Bacillus* (MSU-127) bakteri izolatı ile azalttığını bildirmişlerdir. Chen ve ark., (1995) tarafından yapılan bir çalışmada; endofitik bakterilerle pamuk bitkisinde *Rhizoctonia solani* etmeninin sebep olduğu kök çürüklüğü ve *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* etmeninin sebep olduğu vasküler solgunluk hastalığı azalmıştır. Chakraborty ve ark., (2009) tarafından yapılan bir çalışmada kahverengi kök çürüklüğü hastalığını (*Phellinus noxius*) engellemek için çay bitkisinden izole edilen *Ochrobactrum anthropi* (TRS-2) endofitik bakteri izolatı uygulanmıştır. Bu endofitik bakterinin hastalığı azalttığı ve bitki gelişimini de arttırdığı bildirilmiştir. Hassan ve ark., (2014) şeker pancarında hastalığa sebep olan *Colletotrichum falcatum* etmenine karşı, *Ochrobactrum intermedium* (NH-5) ve *Stenotrophomonas maltophilia* (NH-300) endofitik bakterilerini uyguladıklarında hastalık oranının %44-52 oranında azaldığını bildirmiştir. Ülkemizde ise bir çalışmada; Yolageldi ve ark. (2006) zeytin köklerinden izole ettikleri endofitik bakterilerin zeytinde *Verticillium* solgunluğunu önleme potansiyellerini *in vitro* ve *in vivo* koşullarda araştırmış ve bazı endofitik bakterilerin başarılı antagonistler olduğunu saptamışlardır. Çubukçu ve Benlioğlu (2007) tarafından yürütülen bir çalışmada, pamuk bitkilerinden endofitik bakteriler izole edilmiş, *in vitro* ve *in vivo* koşullarda ise E21, C5 ve F5 adlı endofitik bakteri izolatlarının *Verticillium dahliae* etmenine karşı etkili oldukları bildirilmiştir. Akbaba, (2014) tarafından hıyar bitkilerinden izole edilen endofitik bakteri izolatlarının, *in vivo* koşullarında hıyar köşeli yaprak leke hastalığına

(*Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*) etkisini araştırdığı bir çalışmada, endofitik bakteri izolatlarının %21'i hıyar bitkilerinde hastalığın gelişimini %50'den daha yüksek oranda engellemiştir. Fakhræi, (2015) tarafından yapılan çalışmada, hıyar bitkisinden izole edilen endofitik bakteriler *Fusarium solgunluk* hastalığını (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*) %32-62 oranında azaltmıştır. Ayrıca bu izolatlar arasında bulunan *Pantoea agglomerans* ve *Bacillus thuringiensis* gibi endofitik bakteriler hastalık oranını, sırasıyla, %52 ve %49 oranında azaltmıştır ve kontrol bitkilerine göre verimde %30'luk bir artış sağlamıştır.



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Çalışmada kullanılan test patojeni bakteri

Çalışmada bakteriyel patojen olarak bakteriyoloji laboratuvarı stoklarında bulunan, karpuz fidelerinden izole edilmiş, biyokimyasal ve fizyolojik testlerle tanısı yapılmış *Ac* izolatı kullanılmıştır.

3.1.2 Çalışmada kullanılan endofitik bakteriler

Bakteriyoloji laboratuvarı stoklarımızda bulunan ve daha önce hıyar bitkisinde bazı fungal ve bakteriyel hastalık etmenlerine karşı biyolojik mücadele açısından etkililiği araştırılmış endofitik bakteriler arasından seçilen 20 aday EB izolatı bu tez çalışmasında kullanılmıştır. Çizelge 3.1’de izolatlar ile ilgili gerekli bilgiler verilmiştir.

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan endofitik bakteriler ile ilgili bilgiler

İzolat No	İzolat Adı	İzole Edildiği Yer	İzole edildiği konukçu bitki	Bakteri tür/cins
1	4	Altıntepe mah.	Hıyar (Şampion)	Gram (+)
2	5	Altıntepe mah.	Hıyar (Şampion)	Gram (-)
3	8	Çamönü	Hıyar (Habana)	G (-)
4	11	Çamönü	Hıyar (Gordion)	G (-)
5	12	Çamönü	Hıyar (Erdemli)	G (-)
6	15	Çamönü	Hıyar (Habana)	G (-)
7	18	Çamönü	Hıyar (Gordion)	G (-)
8	31	Kocayatak	Hıyar (Gurme)	Floresan Pseudomonas, G (-)
9	48	Demre	Hıyar	Floresan Pseudomonas, G (-)

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan endofitik bakteriler ile ilgili bilgiler (devam)

İzolat No	İzolat Adı	İzole Edildiği Yer	İzole edildiği konukçu bitki	Bakteri tür/cins
10	53	Yeşilköy-Kaş	Hıyar	Floresan Pseudomonas, G (-)
11	61	Patara	Hıyar (Gözde)	Floresan Pseudomonas, G (-)
12	64	Patara	Hıyar	G (-)
13	73		Hıyar	Floresan Pseudomonas, G (-)
14	80		Hıyar	<i>Ochrobactrum pseudintermedium</i>
15	83		Hıyar	<i>Pantoea agglomerans</i>
16	88		Hıyar	G (-)
17	96		Hıyar	Floresan Pseudomonas, G (-)
18	99		Hıyar	<i>Bacillus thuringiensis</i>
19	108		Hıyar	G (-)
20	112		Hıyar	<i>Pseudomonas fluorescens</i>

3.1.3 Çalışmada kullanılan test bitkisi ve bitki yetiştirme ortamı

Çalışmada, *in vivo* testlerde Crimson sweet F1 çeşidi (Syngenta) karpuz tohumları kullanılmıştır. Bitki yetiştirme ortamı olarak steril torf kullanılmıştır.

3.1.4 Çalışmada kullanılan besi yerleri

Çalışmada patojen ve endofitik bakterilerin geliştirilmesi ve stok olarak uzun süreli saklanması, inokulum üretiminde ve etki mekanizmalarının tespitine yönelik çalışmalarda Çizelge 3.2 ve 3.3'te belirtilen çeşitli besi yerleri kullanılmıştır. Bakteriyel kültürlerin -80°C'de uzun süreli saklanması amacıyla %15 gliserol içeren nutrient broth (8 g/lt saf su) kullanılmıştır.

Çizelge 3.2 Bakteri izolasyonu, pigment oluşumu ve genel besi yeri olarak kullanılan King B ortamı için gerekli kimyasallar ve miktarları

1 litre King B Besi ortamı		
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 3.3 Demire bağlı metabolitlerin belirlenmesi için kullanılan Demir (III) içeren King B besi yeri için gerekli kimyasallar ve miktarları

1 litre King B ^{Fe+3} Besi ortamı		
King's B ^{Fe+3} (Schaad et al., 2001)	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.	
	FeCl ₃	80 µg
	Ortama 50°C'ye soğutulur. FeCl ₃ ilave edilir.	

3.1.5 Moleküler çalışmada kullanılan primerler

Çalışmada Walcott ve ark., (2000)'in bildirdiği etmene spesifik WFB1/WFB2 primer çifti kullanılmıştır. *In vivo* testlerde Ac'ye etkili bulunan EB izolatlarının moleküler tanısında ise 27F/1492R isimli universal 16s rRNA

primeri kullanılmıştır (Jiang *et al.*, 2006). PCR ürünlerinin agaroz jel (%1.5'luk) elektroforezi analizleri için Tris-acetate-EDTA (TAE) Buffer kullanılmıştır.

Çizelge 3.4 Tez çalışmasında kullanılan primer çiftlerinin oligo dizinleri

Primer İsimleri	Oligo dizin	
WFB1	F	5'- GAC CAG CCA CAC TGG GAC-3'
WFB2 (Walcott <i>et al.</i> , 2000)	R	5'- CTG CCG TAC TCC AGC GAT -3'
27F	F	5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG -3'
1492R (Jiang <i>et al.</i> , 2006)	R	5'- TACGGYTACCTTGTTACGACTT -3'

50XTAE (Fermentas) bufferdan seyreltme ile 0.5X TAE buffer elde edilmiştir; %1,5'luk agaroz jelin hazırlanması ve jel elektroforezi için kullanılmıştır.

3.1.6 Referans kimyasal

Çalışmada referans kimyasal olarak Mancozeb (%64, Hektaş) ve Bakıroksiklorid (%50, Bayer) etkili maddeli ruhsatlı fungusitler kullanılmıştır.

3.2 Yöntem

3.2.1 Bitkilerin yetiştirilmesi

Ülkemizde yaygın yetiştiriciliği yapılan Crimson sweet F1 çeşidi (Syngenta) karpuz tohumları 45 gözlü steril torf içeren viyollere ekimi yapılmıştır. Bitkiler ortam sıcaklığının 25 °C, oransal nemin %70-80 olduğu, 14 saatlik ışık periyodu (14 saat aydınlık, 10 saat karanlık) koşullarındaki bitki büyüme odasında tutulmuştur.

3.2.2 Moleküler testler

3.2.2.1 Ac'nin klasik PCR ile tanısı

Ac izolatlarının klasik PCR ile moleküler tanısını gerçekleştirmek amacıyla belirtilen olgonükleotid dizinleri verilmiş olan spesifik primer çiftleri kullanılmıştır (Çizelge 3.4). Çizelge 3.5'te Ac'nin PCR ile tanılanması için gerekli master mix içeriği verilmiştir. PCR döngüsü Çizelge 3.6'da verilen koşullara göre gerçekleştirilmiştir (Walcott *et al.*, 2000). Elde edilen PCR ürünleri %1.5 agarose jelde 40 volt gerilimde 2 saat koşturularak elde edilen bantlar UV ışık altında transilluminatörde görüntülenmiş ve 360 bp'de oluşan bantlar fotoğraflanmıştır.

Çizelge 3.5 Ac'nin tanılanması için kullanılan PCR master mix ve içeriği

Acidovorax citrulli için PCR Master Mix			
Gerekli Kimyasallar	Stok/Başlangıç	Final Konsantrasyon	1 örnek için gerekli miktar
PCR reaction buffer	10 X	1X	2.5 µl
MgCl₂	25 mM	1.5mM	1.5 µl
dNTP_s	2.5 mM	0.2 mM	2 µl
WFB1	10 mM	mM	2 µl
WFB2	10 mM	mM	2 µl
H₂O	-	-	12.8 µl
TaqPolimeraz	5U	1U	0.2 µl
Örnek nükleik asit	10 ⁸ CFU/ml	-	2 µl
Toplam Hacim	-	-	25 µl

Çizelge 3.6 Ac'nin tanılanması için PCR koşulları

PCR çalışma koşulları					
1 döngü	30 döngü			1 döngü	1 döngü
95 °C	95 °C	65 °C	72 °C	72 °C	20 °C
1 dk	30 sn	30 sn	30 sn	5 dk	∞

3.2.2.2 Endofitik bakterilerin klasik PCR ile tanısı

In vivo testlerde Ac'ye etkili bulunan EB'lerin moleküler tanısında 16s rRNA hedef bölgesine göre dizayn edilmiş 27F/1492R primer çiftleri kullanılmıştır. Hazırlanan master mix içeriği Çizelge 3.7'de verilmiştir. PCR döngüsü Çizelge 3.8'de verilen koşullara göre gerçekleştirilmiştir (Jiang *et al.*, 2006). PCR tüplerine master mix 20 µl olarak bölünerek Termal Cycler'de çoğaltılmıştır. Elde edilen PCR ürünleri TAE buffer (Fermentase, 0.5M) ile hazırlanan %1,5'luk agaroz jelde 80 Voltta 1saat elektroforezde koşularak sonuçlar UV transilluminator görüntüleme cihazında bantların varlığıyla değerlendirilmiştir. Elde edilen PCR ürünleri sekans analizine gönderilmiş (Macrogen ve Invitrogen) ve sekans sonuçları NCBI veri tabandaki bilgiler ile karşılaştırılarak EB izolatları tanılanmıştır.

Çizelge 3.7 27F/1492R 16s rRNA primerleri için kullanılan master mix için gerekli kimyasallar ve miktarları

16s rRNA 27F/1492R primerleri için master mix				
Gerekli Kimyasallar	Başlangıç Stok	Final Konsantrasyon	1 örnek için gerekli miktar	Sekansa göndermek için gerekli miktar (50µL)
PCR reaction				
buffer	10 X	1 X	2 µl	5 µl
MgCl₂	25mM	1,5 mM	1,2µl	3 µl
dNTP	2,5M	0,2 mM	1,6µl	4 µl
27F	10mM	1 mM	2 µl	5 µl
1492R	10mM	1 mM	2 µl	5 µl
H₂O	-	-	8 µl	20 µl
TaqPolimeraz	5 U	1 U	0,2µl	0.5 µl
Örnek nükleik asit	10 ⁷ CFU/ml (OD ₆₀₀ ; 0,5)		3 µl	7.5 µl
Toplam hacim	-	-	20 µl	50 µl

Çizelge 3.8 EB'lerin tanılanması için PCR koşulları

PCR çalışma koşulları					
1 döngü	35 döngü			1 döngü	1 döngü
95 °C	94 °C	60°C	72 °C	72 °C	15 °C
3 dk	1 dk	1 dk	2 dk	5 dk	∞

3.2.3 Endofitik bakterilerle tohum uygulamalarının *Ac*'ye karşı etkililiğinin testlenmesi

3.2.3.1 Tohumların *Ac* ile inokulasyonu

Tez çalışmasında sağlıklı karpuz (cv. Crimson sweet F1 çeşidi (Syngenta) tohumları kullanılmıştır. Patojen bakteri inokulasyonundan önce tohumlara NaHipoklorit ile yüzey dezenfeksiyonu uygulanmıştır. Karpuz tohumları ($n= 100$ tohum/uygulama) yapay olarak $\approx 1 \times 10^8$ CFU/ml yoğunluğunda 50 ml'lik patojen bakteri (*Ac*, OD_{600nm}: 0.15) hücre süspansiyonu yapay olarak vakum infiltrasyonu yoluyla inokule edilmiştir. Bulaşık karpuz tohumlarında 1 g örnekte *Ac* popülasyonu (cfu/g karpuz tohumu) izolasyon işlemi ile denemenin başlangıcında belirlenmiştir. Bu amaçla, *Ac* ile bulaştırılmış tohumlardan 1 g örneğe steril su eklenmiş 15 dakika süreyle 120 rpm çalkalayıcıda bekletilmiştir. Elde edilen bu sıvıdan seyretme serileri hazırlanmış ve King B besiyeri yerine ekimler yapılmıştır. 24 °C'de 48-72 saatlik inkubasyondan sonra gelişen koloniler sayılarak birim tohum başına patojen bakteri popülasyonu (cfu/g tohum) olarak saptanmıştır. Tohumlar 25°C de bir gece boyunca kağıt havlularda havada kurutulmaya bırakılmıştır (Şekil 3.1).



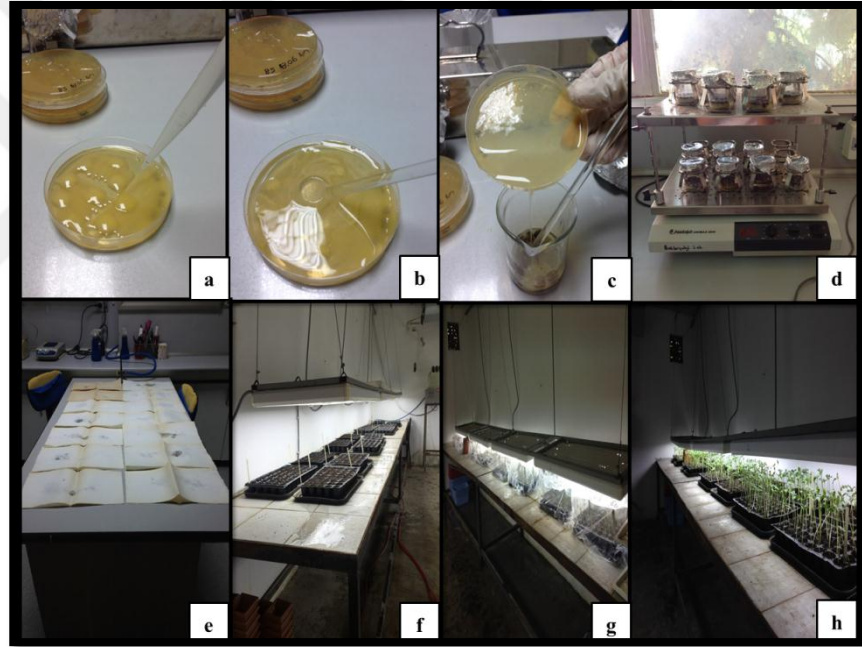
Şekil 3.1 Karpuz tohumlarının *Ac* ile inokulasyonu: (a) tohumların yıkanması, (b) yıkanan tohumların kurutulması, (c) tohumlara vakum infiltrasyonu yoluyla *Ac* bulaştırılması, (d) uygulama yapılmış olan tohumların kurutma kağıtlarına alınması

3.2.3.2 Tohumlara endofitik bakteri uygulanması

Tohumlar 25°C de bir gece boyunca kağıt havlularda havada kurutulduktan sonra, seçilen antagonist adayı endofitik bakterilerden hazırlanan süspansiyon (OD_{600nm} : $0.3 \approx 1 \times 10^9$ CFU/ml, 2 ml/g tohum) *Ac* ile bulaşık tohumlara 30 dakika süreyle 120 rpm çalkalayıcıda bekletilerek uygulanmıştır. *Ac* ile bulaşık tohumlara steril su benzer şekilde yoluyla uygulanmış ve bu tohumlar pozitif kontrol uygulaması olarak değerlendirilmiştir. Benzer şekilde, bakteriyel antagonist uygulamalarının etkililiğinin karşılaştırılması amacıyla, *Ac* ile bulaşık tohumlara bakırlı preparat uygulaması yapılmıştır. Negatif kontrol olarak sağlıklı ve steril su ile uygulama görmüş tohumlar kullanılmıştır. Tohumlar 25°C’de bir gece boyunca kurutulduktan sonra içerisinde steril torf bulunan viyollere ekilmiştir. Denemeler, tesadüf parselleri deneme desenine göre kurulmuş, her uygulama 3 tekerrürlü ve her tekerrürde en az 15 tohum yer almıştır. Fidelerin çıkışından sonra viyoller, hastalık gelişimi için uygun koşulların sağlanması amacıyla 3-4 gün süreyle

plastik örtü ile kapatılmıştır. Fide çıkışı ve KBML fidelik bulaşma verileri 5. günden itibaren 21 gün boyunca her gün kaydedilmiştir (Şekil 3.2). 21. günde bitkilerdeki hastalık gelişimi aşağıda belirtilen 0-4 skalası modifiye edilerek 0-7 skalasına göre (Araújo *et al.*, 2005 and Amadi *et al.*, 2009) değerlendirilmiştir (Çizelge 3.9) (Şekil 3.3). Elde edilen skala değerleri Townsend Heuberger (T.H) formülü* yardımı ile % hastalık şiddeti değerlerine dönüştürülmüş, ABBOTT formülü yardımıyla uygulamaların Pozitif Kontrole karşı etkililikleri karşılaştırılmıştır.

$$*\% \text{ Hastalık şiddeti} = \frac{\sum(\text{Skala değeri} \times \text{Skalada değerlendirilen bitki sayısı})}{\text{Toplam bitki sayısı} \times \text{En yüksek skala değeri}} \times 100$$



Şekil 3.2 Endofitik bakterilerin tohumlara uygulanması ve *in vivo*'da *Ac*'ye karşı etkililiklerinin araştırılması: (a,b,c) hazırlanan süspansiyon aşamaları, (d) *Ac* ile bulaşık tohumlara 30 dakika süreyle 120 rpm çalkalayıcıda bekletilmesi, (e) Uygulama görmüş tohumların 25°C'de bir gece kurutulması, (f) Tohumların steril torf bulunan viyollere ekilmesi, (g) Fidelerin çıkışından sonra 3-4 gün süreyle plastik örtü ile kapatılması, (h) 21. gündeki fidelerin genel görünümü



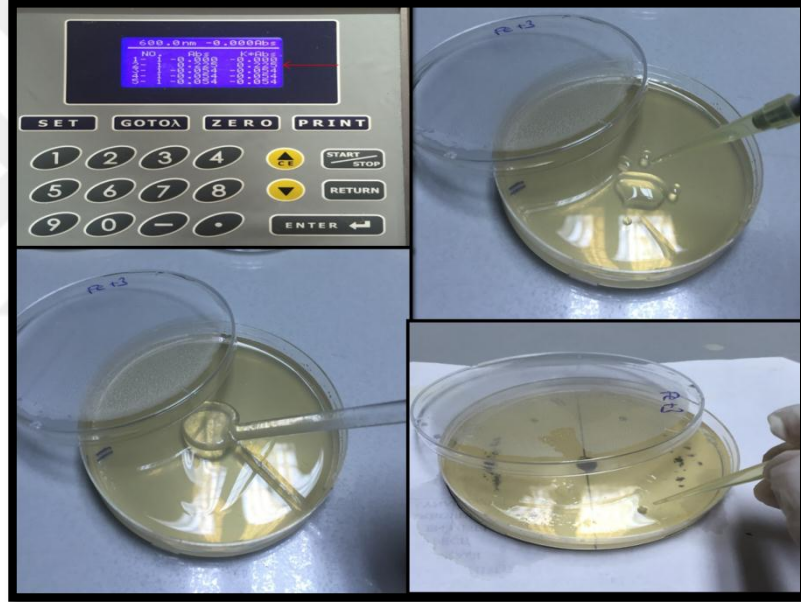
Şekil 3.3 Ac'nin oluşturduğu hastalık şiddetini değerlendirmede kullanılan 0-7 skalası (Araújo *et al.*, 2005 and Amadi *et al.*, 2009)

Çizelge 3.9 Hastalık şiddeti değerlendirilmesinde kullanılan 0-7 skalası

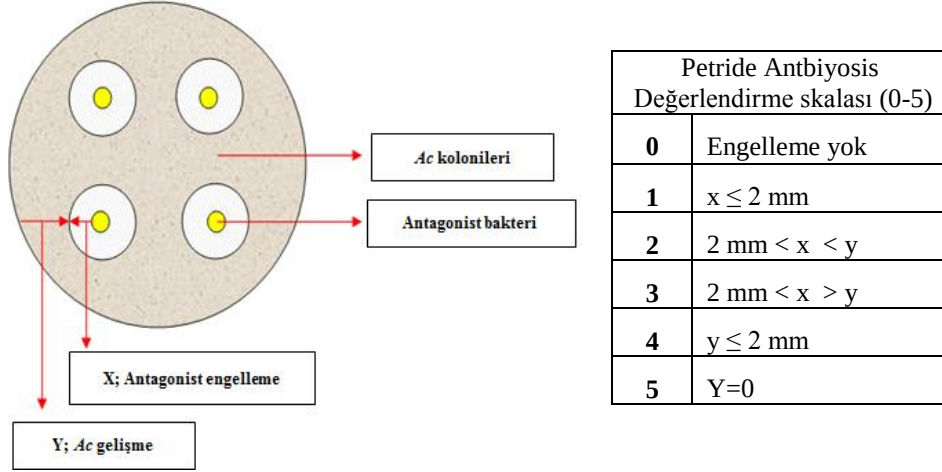
Skala değeri	Açıklama
0	Hastalık belirtisi yok
1	Yaprağın % 1-10'unda lekelenme
2	Yaprağın % 11-20'sinde lekelenme
3	Yaprağın % 21-35'inde lekelenme
4	Yaprağın % 36-50'sinde lekelenme
5	Yaprağın % 51-70'inde lekelenme
6	Yaprağın % 71-85'inde lekelenme
7	Yaprağın % 86-100'ünde çökme ve ölüm

3.2.4 Endofitik bakterilerin *in vitro* etki mekanizmalarının testlenmesi

In vivo testlerde *Ac*'ye karşı başarılı bulunan EB izolatlarının *in vitro* etki mekanizmaları aydınlatılmaya çalışılmıştır. *Ac* (1×10^8 CFU/ml) süspansiyonu demir içermeyen King B (Fe^0) ve demir içeren King B (Fe^{+3}) besi ortamlarına baget yardımı ile yayıldıktan sonra, endofitik bakteriler nokta ekim yöntemiyle uygulanmıştır (Şekil 3.4). Uygulama gören petriler $24^\circ C$ de 48-72 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Antagonist kolonilerin çevresinde *Ac* gelişiminin engellendiği zon (x) ve petri çeperine olan mesafe (y) ölçülerek 0-5 skalasına göre değerlendirilmiştir (Şekil 3.5) (Geels and Schippers, 1983).



Şekil 3.4 Demir içeren King B (Fe^0) ve demir içermeyen King B (Fe^{+3}) besi ortamlarına ekim



Şekil 3.5 *In vitro*'da Demir'e bağlı siderofor etkisinin değerlendirilmesinde kullanılan 0-5 skalası (Geels and Schippers, 1983)

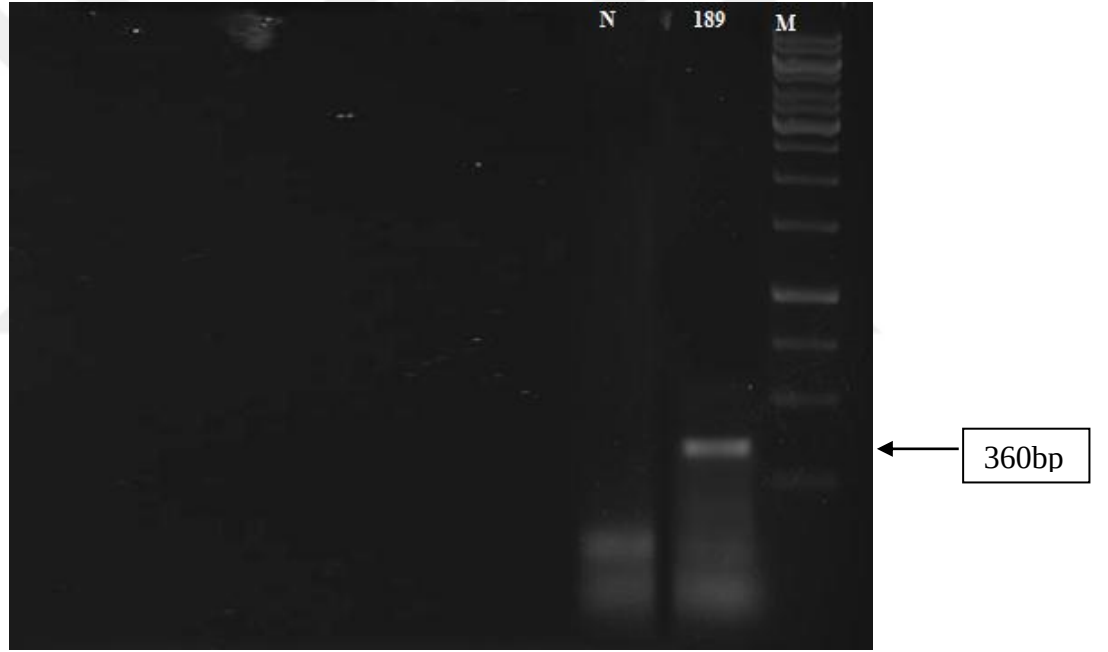
3.2.5 Verilerin analizi

Çalışmada elde edilen verilere, bilgisayarda SPSS (SPSS Inc. PASW Statistics version 18) paket programı ile varyans analizi uygulanmış ve ortalamalar arasındaki farklılıklar yapılan DUNCAN testiyle belirlenmiştir.

4. BULGULAR

4.1 *Ac*'nin Moleküler Tanılama Testi Sonuçları

Tez projesinde yer alan karpuz bakteriyel meyve lekesi hastalık leke etmeni olan *Ac* izolatının tanılanması için; WBF1/WBF2 primer çiftleri kullanılarak klasik PCR yapılmıştır. *Ac* için spesifik olan WBF1/WBF2 primerleri ile yapılan PCR sonucunda elde edilen DNA bantları Şekil 4.1'de görülmektedir. PCR'da negatif kontrol olarak ultra saf su kullanılmıştır. PCR amplifikasyonu sonucunda *Ac* izolatın 360 bp'de bant oluşturduğu gözlenmiştir ve *Acidovorax citrulli* olduğu saptanmıştır.



Şekil 4.1 WBF1/WBF2 primerleri ile testlenen *Ac*'nin PCR elektroforez-jel görüntüsü (M: 1 kb'lık ladder DNA, N: Negatif Kontrol)

4.2 Endofitik Bakterilerle Tohum Uygulamalarının *Ac*'ye Karşı Etkililiği Testlerinin Bulguları

Bu tez çalışması kapsamında seçilen 20 aday antagonist bakteri ve iki farklı bakırlı preparat, *Ac* ile yapay olarak inokule edilmiş karpuz tohumlarına uygulanmıştır. İş yükü ve iklim odalarındaki yer sorunu nedeniyle, 20 antagonist

bakteri 2 gruba ayrılarak *in vivo* tohum denemeleri kurulmuştur. Her bir grupta kullanılacak Ac ile vakum infiltrasyon yöntemiyle bulaştırılmış karpuz tohumlarının içerdiği bakteri yükü deneme öncesinde saptanmıştır. Buna göre; birinci deneme için karpuz tohumlarında elde edilen Ac popülasyonu $5,6 \times 10^7$ cfu/ g tohum, ikinci denemede ise $4,3 \times 10^7$ cfu/ g tohum olarak teyid edilmiştir. Fide çıkışı ve KBML belirtileri 5. günden itibaren 21 gün boyunca her gün izlenmiş, 21. günde bitkilerdeki hastalık gelişimi dikkate alınarak 0-7 skalasına göre (Çizelge 3.9; Araujo *et al.*, 2005 ve Amadi *et al.*, 2009) değerlendirilmiştir. Antagonist bakteriler ve bakırlı preparatlar ile gerçekleştirilen tohum uygulamalarının sonuçları Çizelge 4.1 ve 4.2 ve Şekil 4.2 ve Şekil 4.7’de görülmektedir.

Çizelge 4.1 Birinci denemede yer alan endofitik bakterilerle tohum bakterizasyonu uygulamasının Ac’ye karşı *in vivo* etkililiği sonuçları

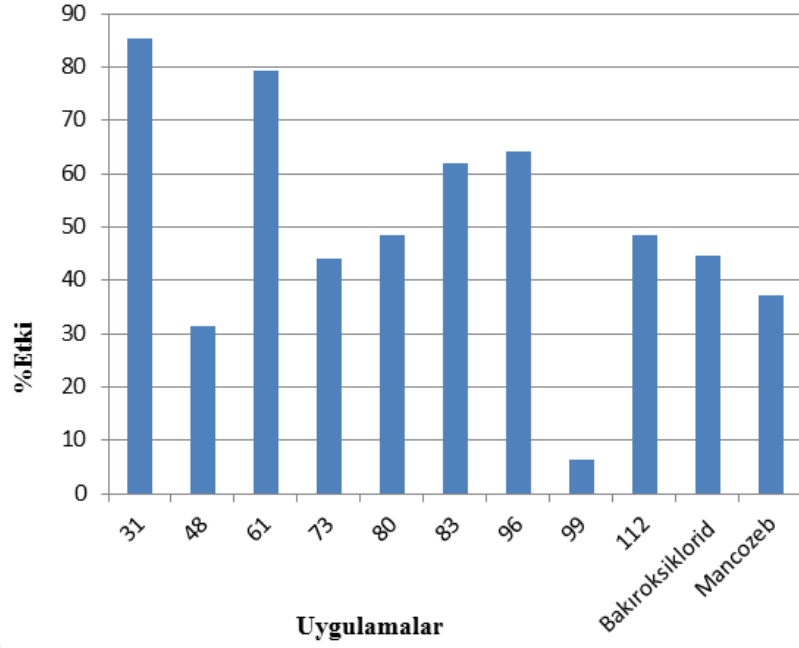
Uygulama*	Tekerrürlerde saptanan hastalık şiddeti (%)			Ortalama hastalık şiddeti (%)	%CV değeri***	% Etki****
	1.	2.	3.			
Pozitif K	19,7	29,5	11,6	20,3^{a**}	44	
Negatif K	0,0	0,0	0,0	0,0 ^e		
31	1,4	3,1	4,3	2,9^d	53	85,3
48	12,2	17,6	11,9	13,9 ^{abc}	23	31,4
61	6,7	3,3	2,5	4,2^d	53	79,2
73	7,1	15,2	11,6	11,3 ^{abc}	35	44
80	8,4	10,3	12,6	10,4 ^{bc}	20	48,3
83	7,6	8,3	7,1	7,7^{cd}	7,8	62
96	4,7	11,6	5,4	7,2^{cd}	52	64,1
99	9,8	23,8	23,3	19 ^{ab}	41	6,3
112	12,3	13,3	5,7	10,4 ^{bc}	39	48,4
Bakır oksiklorid	14,2	11,5	8	11,2 ^{abc}	27	44,4
Mancozeb	16,6	13,3	8,2	12,7 ^{abc}	33	37,2

*Tohum ekimi 06.11.2015 tarihinde yapılmış, 17.11.2015 tarihinde deneme değerlendirilmiştir.

**Tekerrürlerde saptanan ortalama hastalık şiddeti (%) değerlerine uygulanan DUNCAN testi sonucunda aynı harfi taşıyan uygulamalar, $P \leq 0.05$ olasılıkla birbirinden farklıdır.

*** Uygulamaların varyasyon katsayıları (CV) değeri

**** Uygulamaların % hastalık şiddeti değerlerinin Pozitif Kontrol uygulamasına göre farkı (%) alınmıştır.

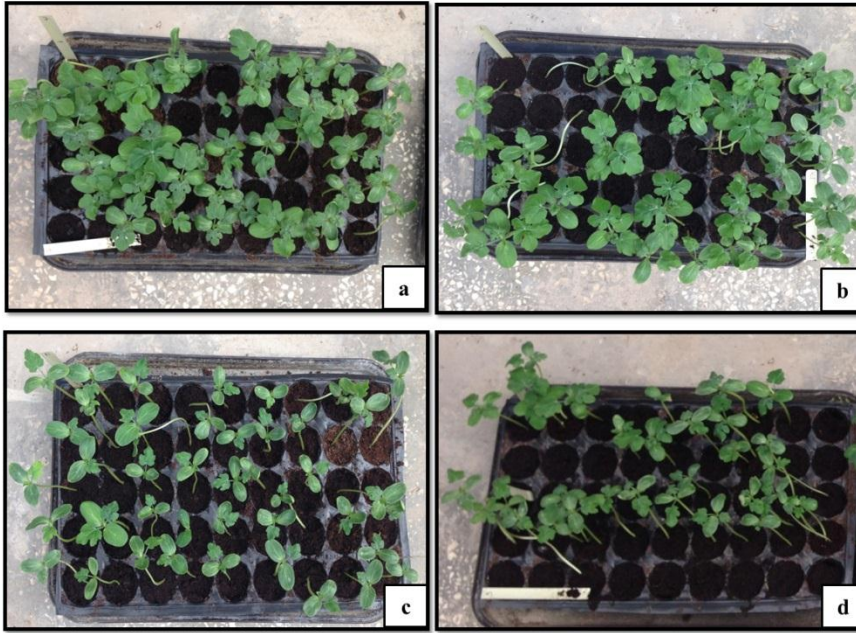


Şekil 4.2 Birinci denemede yer alan endofitik bakterilerin tohum bakterizasyonu uygulamalarının Ac'ye karşı *in vivo* etkililiği sonuçları

Birinci denemede ilk 9 bakteri ve bakırlı preparatlar denenmiş, pozitif kontrolde hastalık şiddeti % 20,3 olarak değerlendirilmiştir (Çizelge 4.1; Şekil 4.3). Pozitif Kontrolde hastalık şiddetinin yeterince yüksek olmaması iklim odasında hastalık için uygun koşulların yaratılamamasından kaynaklanmıştır. Bu sonuçlar da standart sapmanın yüksek olmasına neden olmuştur. Test edilen 9 izolatın 4'ü hastalık şiddetini pozitif kontrole göre, ortalama, % 62 - 85 oranında engelleyerek, istatistiksel olarak, pozitif kontrolden tamamen farklı gruplarda yer almıştır (Çizelge 4.1; Şekil 4.4; Şekil 4.5). En başarılı sonuç ise, Ac'in karpuz fidelerindeki bakteriyel meyve lekesi belirtileri kontrole göre, sırasıyla, % 79 - 85 oranında engelleyen 61 ve 31 no.lu izolatlardan elde edilmiştir (Şekil 4.4). Ancak, CV değerlerine bakıldığında varyasyon katsayılarının %30'dan yüksek olması (%53) nedeniyle, bu izolatlardan elde edilen sonuçların çok sağlıklı olmadığı kanısına varılmıştır. 48, 73 ve 99 no.lu izolatlar ise, Ac'ye karşı ortalama % 6-44'lük bir etkiye sahip olmuş, ancak, istatistiksel olarak pozitif kontrol ile aynı grupta yer almıştır (Çizelge 4.1; Şekil 4.5). Bakırlı preparatlar da benzer şekilde, pozitif kontrol ile aynı grupta yer almıştır (Çizelge 4.1; Şekil 4.6).



Şekil 4.3 Birinci denemedeki pozitif kontroldeki Ac'nin neden olduğu belirtiler



Şekil 4.4 Birinci denemede Ac'ye karşı başarılı bulunan endofitik bakteriler: (a) 31, (b) 61, (c) 96, (d) Pozitif kontrol



Şekil 4.5 Birinci denemede *Ac*'ye karşı başarısız olan endofitik bakteriler: (a) 48, (b) 99, (c) Pozitif kontrol



Şekil 4.6 Bakırlı preparatlar (a) Bakıroksiklorid ve (b) Mancozeb'in *Ac*'ye *in vivo* etkisi, (c) Pozitif kontrol

İkinci denemede diğer 11 izolat ve bakırlı preparatlar ile gerçekleştirilen tohum bakterizasyonu uygulamasından elde edilen sonuçlar ise Çizelge 4.2 ve Şekil 4.7'de yer almaktadır.

Çizelge 4.2 İkinci denemede yer alan endofitik bakterilerin tohum bakterizasyon uygulamalarının Ac'ye karşı *in vivo* etkililiği sonuçları

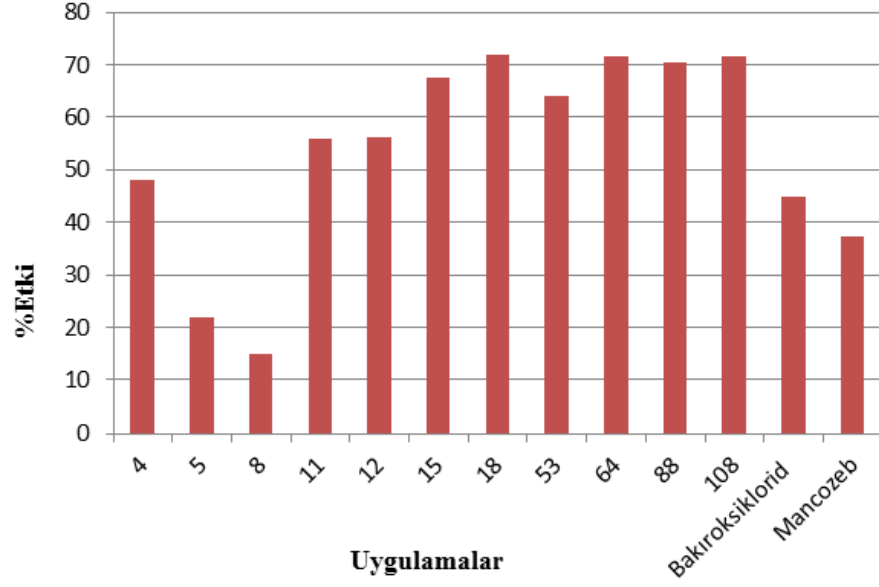
Uygulama *	Tekerrürlerde hastalık şiddeti (%)			Ortalama hastalık şiddeti (%)	%CV değeri***	% Etki****
	1.	2.	3.			
Pozitif K	73,4	44	59,1	58,8^{a**}	25	
Negatif K	0,0	0,0	0,0	0,0 ^h		
4	31,8	38,9	20,7	30,4 ^{cdef}	30	48,2
5	48,2	34,8	54,4	45,8 ^{abc}	21	22,1
8	57,1	35,7	57,1	49,9 ^{ab}	24	15,1
11	23,3	23,3	30,9	25,8 ^{defg}	12,9	56
12	39,2	18,5	19,4	25,7 ^{defg}	45	56,2
15	12,8	10	34,5	19,1^{fg}	70	67,5
18	15	17,8	16,6	16,5^g	8,5	71,9
53	19,2	13,7	30,3	21,1 ^{efg}	40	64,1
64	13,5	16,6	19,8	16,6 ^g	18	71,6
88	15,4	19,6	16,8	17,3 ^{fg}	12	70,5
108	15	17,8	17,1	16,6^g	8	71,7
Bakır oksiklorid	34,3	32,5	30,4	32,4 ^{cde}	6	44,8
Mancozeb	35,2	35,4	39,5	36,7 ^{bcd}	6	37,5

* Tohum ekimi 06.11.2015 tarihinde yapılmış, 20.11.2015 tarihinde deneme değerlendirilmiştir.

** Tekerrürlerde saptanan ortalama hastalık şiddeti (%) değerlerine uygulanan DUNCAN testi sonucunda aynı harfi taşıyan uygulamalar, $P \leq 0.05$ olasılıkla birbirinden farklıdır.

*** Uygulamaların varyasyon katsayıları (CV) değeri

**** Uygulamaların % hastalık şiddeti değerlerinin Pozitif Kontrol uygulamasına göre farkı (%) alınmıştır.

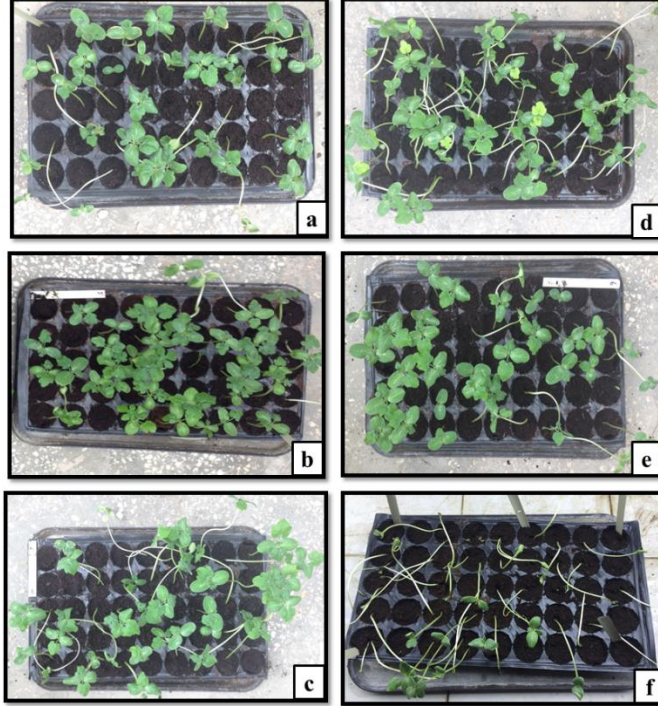


Şekil 4.7 İkinci denemede yer alan endofitik bakterilerin tohum bakterizasyon uygulamalarının *Ac*'ye karşı *in vivo* etkililiği sonuçları

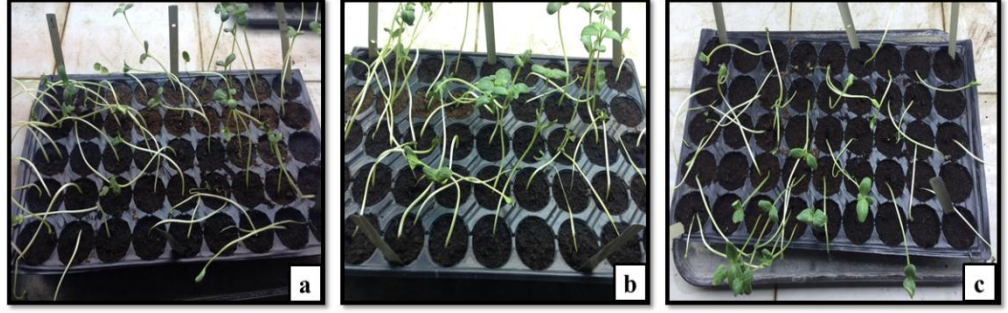
İkinci denemede, pozitif kontrolde hastalık şiddeti % 58,8 gibi yüksek bulunmuştur (Çizelge 4.2; Şekil 4.7; Şekil 4.8). Test edilen 11 EB izolatından 9'u hastalık şiddetini pozitif kontrole göre % 48-72 oranında engelleyerek pozitif kontrolden tamamen farklı gruplarda yer almıştır. En başarılı sonuç ise, *Ac*'nin karpuz fidelerindeki bakteriyel meyve lekesi belirtilerini pozitif kontrole göre % 64 - 72 oranında engelleyen 15, 18, 53, 64, 88, 108 no.lu izolatlardan elde edilmiştir (Çizelge 4.2; Şekil 4.9). Ancak; CV değerlerine bakıldığında, 15 ve 53 no.lu EB izolatlarının %40-70 arasında olması varyasyon katsayısının yüksek olduğunu ve bu izolatlar ile ilgili sağlıklı değerlendirme yapılamayacağını göstermiştir. Bu arada, 18, 64, 88 ve 108 no.lu izolatların CV değeri % 8 -18 arasında değişmiştir. Bu değerlerin bitkisel istatistikler için kabul edilebilir CV değeri olan %30'dan düşük olması nedeniyle daha sağlıklı veriler olduğu saptanmıştır. 5 ve 8 no.lu izolatlar ise, *Ac* belirtilerini pozitif kontrole göre % 15-22 oranında engellemesine karşın, istatistik analizde pozitif kontrol ile aynı etki grubunda yer alarak başarısız bulunmuştur (Çizelge 4.2; Şekil 4.10). Bakırlı preparatlar ise, hastalık şiddetini pozitif kontrole göre % 37-45 oranında engelleyerek pozitif kontrolden farklı gruplarda yer almıştır.



Şekil 4.8 İkinci denemedeki pozitif kontrolde *Ac*'nin oluşturduğu çökerten, kotiledon yapraklarında çürüme benzeri hastalık belirtileri



Şekil 4.9 İkinci denemede başarılı olan endofitik bakteriler: (a) 15, (b) 18, (c) 64, (d) 88, (e) 108, (f) Pozitif kontrol



Şekil 4.10 İkinci denemede *Ac*'yi engellemede başarısız bulunan endofitik bakteriler: (a) 5, (b) 8, (c) Pozitif kontrol

In vivo testerde EB izolatlarının *Ac*'ye etkisi toplu olarak Şekil 4.9 ve Şekil 4.10'de ayrıca belirtilmektedir. Burada *Ac*'nin fide belirtilerini % 70'in üzerinde engelleyerek en etkili bulunan EB izolatlarının 31, 61, 18, 64, 88 ve 108 no.lu uygulamalar olduğu anlaşılmaktadır.

4.3 *In vivo*'da Başarılı Bulunan Endofitik Bakterilerin *In Vitro*'da *Ac*'ye Etki Mekanizmalarının Belirlenmesi Testinin Bulguları

In vivo testlerde, pozitif kontrole göre *Ac*'nin belirtilerini % 50 ve üzerinde engellemeyi başaran 11, 12, 15, 18, 31, 53, 61, 64, 83, 88, 96 ve 108 no.lu EB izolatları *in vitro*'da *Ac*'ye karşı etki mekanizmasının aydınlatılması açısından test edilmiştir (Çizelge 4.3). Bu testlerde, EB izolatlarının Fe^{+3} varlığında ve yokluğunda *Ac*'ye antagonistik etkisi araştırılarak etki mekanizmasında rol oynayan faktörün siderofor ya da antibiozise dayalı olma olasılıkları değerlendirilmiştir.

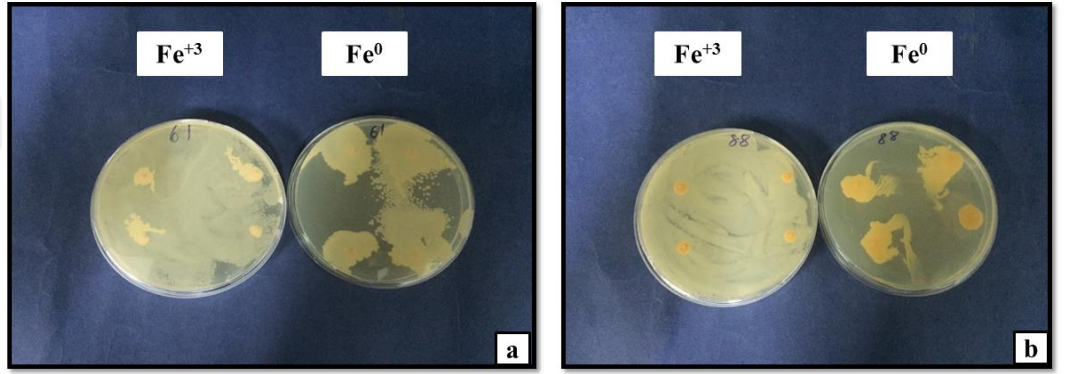
Çizelge 4.3 *In vivo*'da *Ac*'ye karşı başarılı bulunan endofitik bakterilerin olası *in vitro* biyokontrol mekanizmaları

Antagonist İzolat No*	<i>In vivo</i> Etki(%)	<i>In vitro</i> Etki (0-5 Skala değerlerine göre)		<i>In vitro</i> olası Biyokontrol Mekanizması
		King B Fe0	King B Fe+3	
11	56	1	0	Zayıf siderofor etki
12	56,2	1	0	Zayıf siderofor etki
15	67,5	5	0	Güçlü siderofor etki
18	71,9	5	0	Güçlü siderofor etki
31	85,3	0	0	Etki yok
53	64,1	5	0	Güçlü siderofor etki
61	79,2	5	0	Güçlü siderofor etki
64	71,6	0	0	Etki yok
83	62	5	0	Güçlü siderofor etki
88	70,5	5	0	Güçlü siderofor etki
96	64,1	5	0	Güçlü siderofor etki
108	71,7	1	0	Zayıf siderofor etki

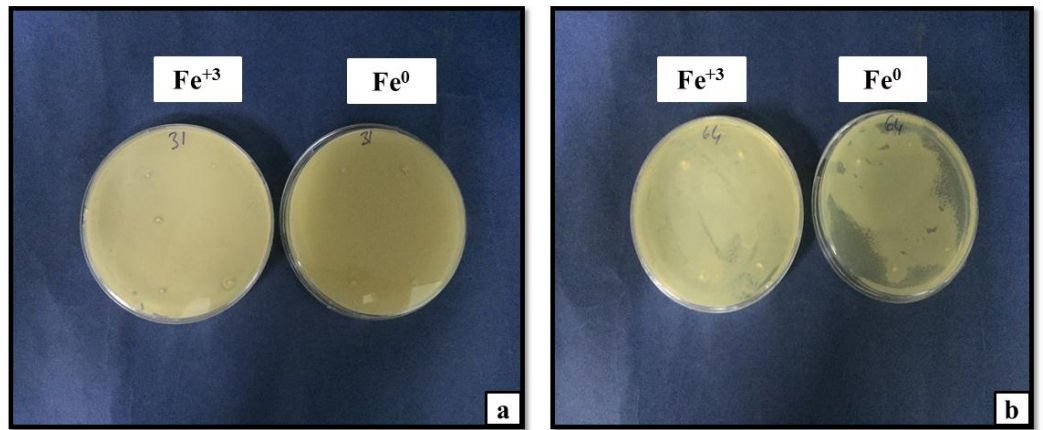
*Bakteri ekimi 11.01.2016 tarihinde yapılmış 13.01.2016 tarihinde deneme değerlendirilmiştir.

Ac'nin fide belirtilerini *in vivo* testlerde % 50'nin üzerinde engelleyebilen 12 EB izolatının olası *in vitro* biyokontrol mekanizmasını saptamak üzere yapılan test sonuçlarına göre; 10 EB izolatının siderofor salgılanmasından kaynaklanan Fe^{+3} için rekabet ettiği sonucuna varılmıştır. Bu izolatlardan, özellikle, 15, 18, 53, 61, 83, 88, 96 no.lu EB izolatları Fe^{+3} 'in kısıtlı olduğu durumda oldukça güçlü bir antibiyozis göstererek patojen bakterinin gelişmesini engellemiş ve demir iyonlarına bağlı siderofor mekanizmasının testlenmesinde kullanılan 0-5 skalasına göre en yüksek skala değerini almıştır. Ancak, ortamda Fe^{+3} 'ün varlığında antibiyozis etkisi tamamen ortadan kalkarak engelleme yok olmuştur (Şekil 4.11). 11, 12 ve 108 no'lu bakteriyel antagonistlerin ise *in vitro* testlerde 1 skala değerini alarak siderofora dayalı zayıf bir antibiyozis etki gösterdikleri anlaşılmaktadır

(Çizelge 4.3). Sonuç olarak; *in vitro* etki mekanizması açısından *Ac*'ye karşı testlenen bakteriyel antagonistlerden 31 ve 64 no.lu izolatlar hariç diğerlerinde siderofora dayalı bir antibiozis mekanizmasına sahip oldukları saptanmıştır (Şekil 4.12). *Ac*'ye karşı *in vivo* testlerde başarılı bulunan EB izolatlarının hiçbirisinde doğrudan antibiyosis saptanmamış, genelde demir rekabetine dayalı bir biyolojik savaş mekanizması hakim olmuştur. 31 ve 64 no.lu EB izolatlarının ise, *in vivo* testlerde *Ac*'ye karşı başarılı bulunmasına karşın, *in vitro* biyokontrol testlerinde antibiyosis ya da demir rekabetinin saptanamaması uyarılmış dayanıklılık vb. diğer mekanizmaların etkili olabileceğini düşündürmüştür.



Şekil 4.11 Endofitik bakterilerin demirli ve demirsiz ortamda *Ac*'ye karşı siderofor etki testi sonuçları: ve güçlü siderofor etki gösteren bakteriler (a) 61, (b) 83



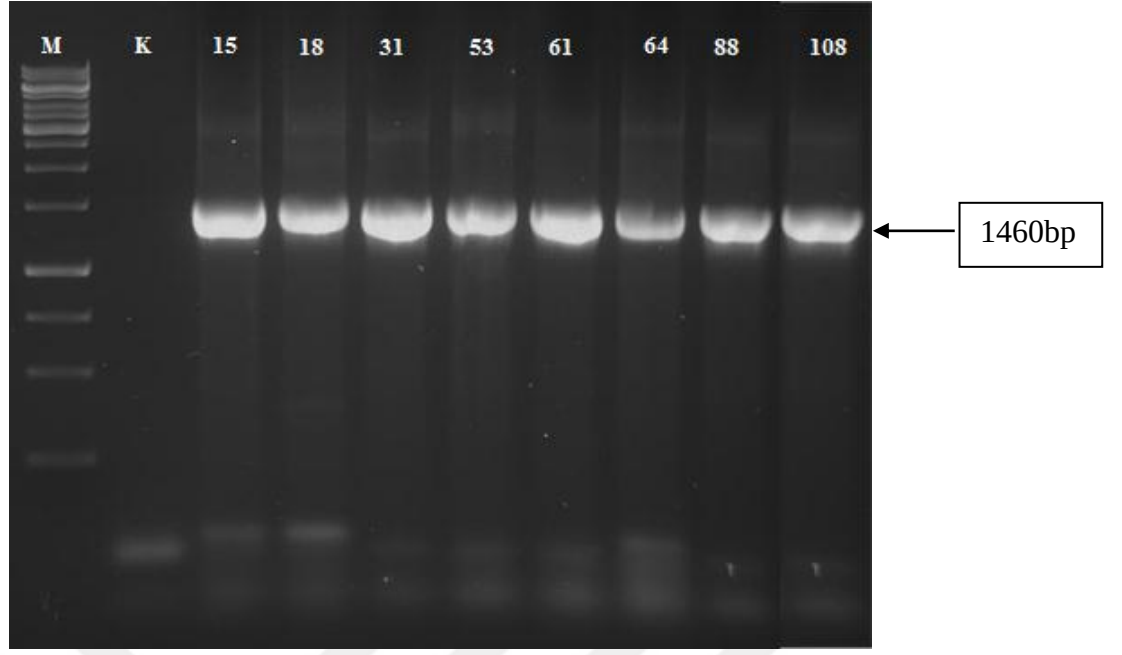
Şekil 4.12 Endofitik bakterilerin demirli ve demirsiz ortamda *Ac*'ye karşı siderofor etki testi sonuçları: ve güçlü siderofor etki göstermeyen bakteriler (a) 31, (b) 64

4.4 Etkili Bulunan Endofitik Bakterilerin Moleküler Tanısı

EB'lerin moleküler tanılama çalışmaları için 16s rRNA hedef bölgesine göre dizayn edilmiş olan 27F/1492R primer çiftleri kullanılarak PCR işlemi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen PCR ürünleri sekans analizine gönderildikten sonra sekans sonuçları NCBI veri tabandaki bilgiler ile karşılaştırılmıştır (Şekil 4.13). Sekans analizi sonuçlarına göre (%99 olasılıkla), *in vivo* testlerde Ac'ye karşı etkili bulunan EB izolatlarından 15 no.lu izolat *Cronobacter sakazakii* (NCBI ref|NR_118449.1), 18 no.lu izolat *Serratia ureilytica* (NCBI ref|NR_042356.1), 31 no.lu izolat *Pseudomonas fluorescens* (NCBI ref|NR_102835.1), 53 no.lu izolat *Pseudomonas lutea* (NCBI ref|NR_029103.1), 61 no.lu izolat *Pseudomonas putida* (NCBI ref|NR_074596.1), 64 no.lu izolat tanılanamamıştır, 88 no.lu izolat *Chryseobacterium elymi* (NCBI ref|NR_115851.1), 108 no.lu izolat *Enterobacter cloacae* (NCBI ref|NR_117679.1) olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4 16s rRNA sekans analizine göre bakteri türleri ve referans numaraları

EB izolat	Türü	NCBI veri erişim numarası
15	<i>Cronobacter sakazakii</i>	118449.1
18	<i>Serratia ureilytica</i>	042356.1
31	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	102835.1
53	<i>Pseudomonas lutea</i>	029103.1
61	<i>Pseudomonas putida</i>	074596.1
64	Tanılanamamıştır	-
88	<i>Chryseobacterium elymi</i>	115851.1
108	<i>Enterobacter cloacae</i>	117679.1



Şekil 4.13 27F/1492R primerleri ile testlenen EB izolatlarının PCR elektroforez-jel görüntüsü
(M: 1 kb'lık ladder, K: Negatif kontrol)

5. TARTIŞMA

Karpuzun ekonomik anlamda en önemli hastalığı Ac'nin neden olduğu bakteriyel yaprak yanıklığı ve meyve lekesi hastalığıdır. Tüm bakteriyel hastalıklarda olduğu gibi Ac ile mücadelede en önemli unsur hastalıktan ari tohum ve fide kullanılmasıdır. Tohum kaynaklı bir hastalık olması sebebiyle, hastalıkla mücadelede tohum uygulamaları önerilmektedir. Bunlar; tohumlara bakırlı preparatlar, peroksiasetik asit, streptomisin sülfat, sodyum hipoklorid, kalsiyum hipoklorid, hidroklorik asit ve tohum fermentasyonu gibi uygulamaları içermektedir (Zhao *et al.*, 2003; Hopkins *et al.*, 2003; Feng *et al.*, 2007). Fakat bu uygulamaların tohum çimlenmesini ve fide gelişimini engellemesi gibi tohum kalitesi üzerine olumsuz etkileri olabilmektedir (Sowell and Schaad, 1979; Hopkins *et al.*, 1996, 2003; Zhao *et al.*, 2003).

Son yıllarda tohumlara uygulanacak biyolojik mücadelenin KBML hastalığı için iyi bir alternatif olabileceği yönünde; antagonist bakteriler (Fessehaie and Walcott, 2005; Oliveira *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2006; Yaeram *et al.*, 2006), Medeiros *et al.*, 2009; Johnson *et al.*, 2011; Özşahinler ve Özaktan, 2012; Horuz, 2014; Jiang *et al.*, 2015), maya fungusları (Wang *et al.*, 2009; Conceição *et al.*, 2014; Melo *et al.*, 2015) ve çeşitli bitki aktivatörlerini (Farimaz *et al.*, 2014) içeren çalışmalar önem kazanmıştır.

Yürütülen bu tez çalışmasında, daha önce sağlıklı hıyar bitkilerinin içsel dokularından izole edilen ve hıyar bitkisindeki önemli fungal ve bakteriyel patojenlere karşı başarılı bulunan EB izolatlarının iklim odası koşullarında gerçekleştirilen *in vivo* testlerde, Ac'yi başarıyla engellediği saptanmıştır. Özellikle, bu tez çalışmasında Ac'ye karşı etkisi araştırılan endofitik bakteri izolatları, hastalık etmeninin de endofit karakterli olması nedeniyle oldukça başarılı bulunmuştur. 83 no.lu *Pantoea agglomerans* izolatı, daha önce yürütülen bir başka çalışmada hıyar bakteriyel köşeli yaprak lekesi hastalığı etmeni *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*'a ve hıyar solgunluğu etmeni *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*'a karşı başarılı bulunmuştur (Özaktan ve ark., 2015a; Özaktan ve ark., 2015b). *Pantoea agglomerans* ABD'de yumuşak çekirdeklielerde ateş yanıklığı (*Erwinia amylovora*) hastalığına karşı ruhsatlı olan

ve üzerinde çok çalışılan ve başarılı bir bakteriyel antagonisttir (Bora ve Özaktan, 1998; Özaktan and Bora, 2004).

EB'lerin biyolojik savaş elemanı ve bitki büyümesini artırıcı olarak kullanılabilecek ideal adaylar olabileceği bilinmektedir. Endofitik mikroorganizmaların etkisi ile bitki hastalıklarının baskılanması birçok patosistemde gösterilmiştir (Narisawa *et al.*, 1998). EB'lerin, fungal ve bakteriyel bitki patojenlerinin gelişimini baskılama yeteneğine sahip olduğunu gösteren birçok çalışma bulunmaktadır. Endofit biyokontrol ajanlarının biyokontrol mekanizmaları arasında; antifungal ya da antibakteriyel maddelerin üretimi (Maurhofer *et al.*, 1992), siderofor üretimi (Kloepper *et al.*, 1980;), besin rekabeti (Kloepper *et al.*, 1980), yer rekabeti ve dolaylı olarak sistemik kazanılmış dayanıklılık veya bağışıklık teşviki (Van Peer *et al.*, 1990; Wei *et al.*, 1991; Chen *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 1995a, 1995b) sayılabilir.

EB'ler olarak *P. agglomerans* ve *P. fluorescens*'in en bilinen ve yaygın çalışılan, birçok bitki türünde bitki gelişimi/meyve veriminde önemli artış sağlayan ve biyolojik savaş açısından dikkat çeken organizmalar olduğu dikkati çekmektedir (Gagné *et al.*, 1993; Uthede *et al.*, 1999; De Silva *et al.*, 2000; Bertrand *et al.*, 2001; Çakmakçı *et al.*, 2001). Özellikle *Pantoea* spp'ların bitki içsel dokularından sıklıkla izole edildiği, fosforu çözerek ve/veya fitohormon üretimini artırarak bitki gelişimini teşvik ettikleri bilinmektedir (Tsavkelova *et al.*, 2007). Cezayir'de yürütülen bir çalışmada *P. agglomerans* olarak tanısı yapılan bakterinin IAA, siderofor ve fosfatı çözme aktiviteleri değerlendirilip kontrol bitkileriyle karşılaştırıldığında maximum değerler tespit edilmiş ve çalışma sonucuna göre; *P. agglomerans*'in kurak ve tuzlu koşullarda iyi bir bitki gelişim aktivitesi sergilediği sonucuna varılmıştır (Silini-Chérif *et al.*, 2012). Benzer şekilde *Pseudomonas* ve *Bacillus* sp. gibi bakteriyel endofitlerin de bitki gelişmesini arttırdığını bildiren çalışmalar bulunmaktadır (Wei *et al.*, 1991; Chen *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 1995a, 1995b; McInroy and Kloepper, 1995). Bizim çalışmamızda da, *P. agglomerans* ve *P. fluorescens* grubundan bakterilerin Ac'nin biyolojik kontrolü açısından başarılı bulunması daha önce yapılan çalışmaların sonuçlarıyla paralellik göstermektedir.

P. agglomerans gibi Enterobacteriaceae grubu üyesi 108 no.lu EB'izolatı *Enterobacter cloaceae* de Ac'ye karşı *in vivo* testlerde başarılı bulunan antagonist bakteri olmuştur. *E. cloaceae* ile yapılan çalışmalara bakıldığında bu bakterinin biyolojik mücadele potansiyelinin yanı sıra (Nelson *et al.*, 1986; Nelson and Craft, 1991), bitki gelişimini artırma ve biyoremediasyon özelliğinin de bulunması (Nie *et al.*, 2002; Vessey, 2003; Moore *et al.*, 2006) en önemli avantajıdır.

Tez çalışmasında, *in vivo* testlerde Ac'yi %50'nin üzerinde engellemeyi başaran en etkili 8 EB izolatından 3'ünün floresan *Pseudomonas* grubuna dahil olması dikkati çekmiştir. Floresan *Pseudomonas* grubu içinde, *Pseudomonas fluorescens* ve *P. putida* bakteriyel ve fungal patojenlere karşı etkili olduğu bilinen başarılı bakteriyel antagonistlerden birisidir (Bora ve Özaktan, 1998; Gül ve ark., 2011). Bu tez çalışmasında 31 no.lu EB izolatı *P. fluorescens*, 61 no.lu EB izolatı *P. putida* ve 53 no.lu EB izolatı ise *P. lutea* olarak tanılanmıştır. Özşahinler ve Özaktan (2012) tarafından Ac'ye karşı yürütülen bir başka biyolojik savaş çalışmasında Ateş Yanıklığı etmeni *Erwinia amylovora*'ya karşı A.B.D.'de ruhsatlı bir biyolojik preparat olan BLIGHTBAN'ın aktif organizması *P. fluorescens* A506 izolatının (Stockwell *et al.*, 2002) Ac'nin fide belirtilerini başarıyla engellediğini belirtmiştir. Fessehaie ve Walcott (2005) de yaptıkları çalışmada; *Pseudomonas fluorescens* (A506) izolatını *in vitro* ve *in vivo* koşullarda patojenle doğal bulaşık karpuz tohumlarına uygulamışlar ve bakteriyel izolatların Ac ile bulaşık tohumlara uygulandığında etkili bir biyolojik mücadele elemanı olduğunu, yapraklarda da koruyucu etkisinin bulunduğunu, özellikle fideliklerde ve seralarda kavun bakteriyel meyve lekesi hastalığının entegre mücadelesinde umut verici bir araç olduğunu belirtmişlerdir.

Flourosent *Pseudomonas* izolatlarının kolonize olması ve biyolojik savaş açısından etkin bulunması için izole edildiği konukçulara fazla bağlı olmadığı daha önce yapılan çalışmalarda da dikkati çekmiştir. Bu ilişkiyi, Bora ve Özaktan (1998) şöyle açıklamışlardır: flourosent *Pseudomonas*lar gelişme, kolonizasyon ve ekolojik açıdan sorunsuz mikroorganizmalardır. Bu da, onların biyolojik savaş potansiyellerinin yüksek olmasını sağlamaktadır. Bizim çalışmamızda, karpuz tohumlarına uygulanarak Ac'ye karşı etkililiği testlenen EB izolatları da genelde

hıyar bitkisi içsel dokularından izole edilmiştir ve karpuz fidelerinde Ac'yi başarıyla engellemiştir.

Floresan *Pseudomonas* grubu bakteriler, biyolojik savaşta başarılarının yanı sıra, bitki gelişimini artırma özellikleriyle de bitki koruma alanında yardımcı olmaktadır. Tez çalışmasında Ac'yi engellemede başarılı bulunan 53 no.lu izolat sekans analizi sonucunda *Pseudomonas lutea* olarak tanılanmıştır. *P. lutea*, biyokontrol özellikleri çok iyi bilinmemekle birlikte, fosfat çözme yeteneği nedeniyle bitki gelişimini artırmada yararlı bir bakteri türüdür (Peix *et al.*, 2004). Bu tez çalışmasında biyokontrol etmeni olarak başarılı bulunması ve bitki gelişimini artırma konusunda yararlı bir bakteri olduğunun bilinmesi IPM (Integrated pest management) programlarında bu yeni yararlı bakteriye yer verilebileceğini düşündürmektedir.

Floresan grubu bakterilerin biyolojik mücadele ve bitki gelişimini artırma alanının dışında bir diğer özelliği ise; biyoremediasyonda iş gören çevre dostu bakteriler olmasıdır (Dejonghe *et al.*, 2001). Ancak; bazı floresan *Pseudomonas*lar çevreye zararlı olmadığı halde bazılarının fırsatçı insan patojeni olması nedeniyle kullanımda dikkatli olunması gerekmektedir.

Tez çalışmasında Ac'yi *in vivo* testlerde başarıyla engelleyen 18 no.lu izolatın sekans analizi sonucunda *Serratia ureilytica* olarak tanılanması yeni bir bulgudur. *Serratia* grubu bakterilerden *S. marcescens* hem biyolojik savaş (Kobayashi *et al.*, 1995; Chet *et al.*, 1990) hem de bitki gelişimini artırıcı özelliği olan (Lavania *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 1995; Kobayashi and Palumba, 2000) önemli bir Genusdur. Bizim çalışmamızda *S. ureilytica* olarak moleküler tanısı yapılan tür ise azot kaynağı olarak üreyi parçalama özelliği bulunan bir PGPR (Bitki gelişimini teşvik eden rizobakteriler) bakterisi olarak bilinmektedir (Bhadra *et al.*, 2005). Bu yönüyle, tez çalışması kapsamında biyokontrol özelliği ön plana çıkan yeni bir tür olarak kabul edilebilir.

Ac'nin biyolojik mücadelesinde floresan *Pseudomonas* izolatlarının yanı sıra, bazı *Bacillus* izolatlarının da başarılı olduğunu gösteren çalışmalara rastlanmaktadır. Oliveira ve ark., (2006) *Bacillus* türlerinin KBML hastalık

şiddetini %93 oranında baskıladığı bildirilmiştir. Jiang ve ark., (2015) *Bacillus amyloliquefaciens* izolatu karpuz fidelerine uygulandığında hastalık şiddetini %60 oranında azalttığını bildirmişlerdir. Kavundan izole edilen *Paenibacillus lentimorbus* (MEN2) kavun fidelerinin yapraklarına püskürtülerek Ac'ye karşı etkililiği araştırıldığında hastalık şiddeti %81 oranında azalmıştır (Mederios et al., 2009). Ancak, bu tez çalışmasında Ac'ye karşı testlenen *Bacillus thuringiensis* izolatu, *in vivo* testlerde %50'nin altında bir etkililik göstermiş ve testlenen diğer EB izolatları kadar başarılı bulunmamıştır.

Tez çalışmasında Ac'ye karşı etkili bulunan 88 no.lu EB izolatu sekans analizi sonucunda Bacteria alemi, Bacteroidetes şubesi, Flavobacteria sınıfı, Flavobacteriales takımı, *Flavobacteriaceae* familyası, *Chryseobacterium* cinsi *Chryseobacterium elymi* olarak tanılanmıştır (Cho et al., 2010). Bu bulgu, bizim için bakteriyel bitki patojenlerinin biyolojik savaş elemanı olarak yeni bir kayıttır. *Chryseobacterium* sp. ve konukçuları arasındaki ilişki tam olarak bilinmemesine rağmen, sıklıkla bitki kök ve rizosferinde bulunduğunu, bitki patojenlerine karşı antagonist potansiyelleri olduğunu bildiren birkaç çalışmaya rastlanılmıştır (Shin et al., 2007). Turp ve Atatürk çiçeği (*Euphorbia pulcherrima*) bitkisinde *Rhizoctonia* 'nın neden olduğu sırasıyla çökerten ve kök boğazı çürüklüğüne karşı *Chryseobacterium gleum*'un biyolojik ajan olma potansiyeli araştırılmış ve hastalığın şiddetini önemli bir derecede azalttığı bildirilmiştir (Krause et al., 2001). Bir diğer çalışmada, Kore'de deniz kenarında yetişen tuza tolerant bitkilerin köklerinden *Chryseobacterium* sp. benzeri endofitik bakteriler izole edilmiştir. İzolatların değişen oranlarda kitinaz, pektinaz ve proteaz aktivitelerine sahip olduğu ve *Rhizoctonia solani* ve *Fusarium oxysporum* 'a karşı antifungal aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir (Shin et al., 2007).

Tez çalışmasında Ac'ye karşı başarılı bulunan 15 no.lu EB izolatu da sekans analizi sonucunda Bacteria alemi, Proteobacteria şubesi, Gammaproteobacteria sınıfı, Enterobacterales takımı, *Enterobacteriaceae* familyası, *Cronobacter* cinsi *Cronobacter sakazakii* olarak tanılanmıştır (Farmer et al., 1980; Iversen et al., 2007). Bu sonuç da, tez çalışmasının özgün sonuçlarından birisi olarak dikkati çekmiştir. *Cronobacter* spp.'nin doğal habitatı tam olarak bilinmemektedir. Klinik ve bitki kökenli 9 *Cronobacter sakazakii* izolatının özellikleri araştırılmıştır. 9

izolatın bitki rizosferinde bulunabilme özelliği gösterdiği, fosfat mineralini çözme ve İndol asedik asit (IAA) üretme yeteneğine sahip olduğu saptanmıştır. Bir izolat hariç diğerlerinin siderefor üretebildiği, ayrıca domates ve mısır köklerinde endofitik olarak kolonize olabildiği saptanabilmiştir (Schmid *et al.*, 2009). Bu yönleriyle bitki gelişimini arttırma ve biyokontrol etkisi olabileceği söylenebilir. Ancak; burada en dikkat çekici konu, fırsatçı insan patojeni olma riskidir. Bitki hastalıklarıyla biyolojik savaşta ve bitki gelişimini arttırmada başarılı bulunan bazı bakterilerin insan patojeni olma riski taşımaları onların en büyük dezavantajıdır. Bu nedenle, klasik yöntemlerle tanıdan çok moleküler tanı teknikleri ile ancak kesin tanıları yapılabilmektedir. Bu tür bakteriler ile çalışılması risk oluşturabilir.

Ac'ye karşı *in vivo* testlerde başarılı bulunan EB izolatlarının *in vitro* etki mekanizmalarının aydınlatılması da biyolojik savaş araştırmalarının sonuçlarının yorumlanması, biyolojik savaş elemanının çevre ve hedef dışı organizmalar açısından güvenle kullanılması açısından önem taşımaktadır.

Demirin kısıtlı olduğu şartlarda, fluoresan *Pseudomonas*lar ve *Rhizobium* spp., gibi rhizobakterler tohum kaynaklı hastalıkların biyolojik kontrolünde yer alan demir şelat bileşikler veya siderofor oluştururlar (O'Sullivan and O'Gara, 1992; Penyalver *et al.*, 2001). Yapılan *in vitro* testlerde; etki mekanizması açısından *Ac*'ye karşı testlenen bakteriyel antagonistlerden 31 ve 64 no.lu izolatlar hariç diğerlerinin siderofora dayalı bir antibiosis mekanizmasına sahip oldukları saptanmış olup, EB izolatları tarafından siderofor üretiminin *Ac*'nin biyolojik kontrolünden sorumlu olabileceği düşünülmüştür.

EB'lerin büyük çoğunluğu, *in vitro*'da fungal patojenlere karşı antibiosiz etkisi göstermesine rağmen, çok azı kök dokuları içerisinde fungal patojenleri antibiosiz mekanizması yoluyla kontrol edebilme yeteneği gösterebilmiştir (Sturz *et al.*, 1999; Krechel *et al.*, 2002). 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 olmuş ve buradaki etkinin siderofor etkiden kaynaklandığı anlaşılmıştır (Scher and Baker, 1982). Bu çalışmada kullanılan 15, 18, 53, 61, 83,

88 ve 96 no.lu EB izolatlarının *in vitro*'da güçlü siderofor salgılama yeteneği göstermesi, Fe^{+3} için yarışmanın yanı sıra ISR(Induced systemic resistance)'nin de determinantı olarak kabul edilmektedir.

Diğer yönden *Ac*'nin gelişimini etkilemede başarılı bulunan 31 ve 64 no.lu antagonist bakterilerin etki mekanizması, bu tez çalışmasında tam olarak aydınlatılamamıştır. Bitki hastalıklarının biyolojik kontrolünde rol oynayan besin maddesi veya yer için rekabet, antimikrobiyal bileşiklerin üretimi veya bitki dayanıklılığın uyarılması gibi diğer etki mekanizmaları da biyolojik mücadelenin başarısında rol oynamış olabilir. *In vivo* etki testlerinde başarılı bulunan bazı bakteriler *in vitro* testlerde herhangi bir antagonistik etki göstermeyebilir. Ya da tam tersi, *in vitro* testlerde başarılı bulunan bir biyolojik mücadele elamanı *in vivo* testlerde aynı etkiyi göstermeyebilir. Bunun nedenini ise, Bora ve Özaktan, (1998) şöyle açıklamıştır: antagonist bakteri agar + besi yerinde patojenin gelişimini engelleyici antibiyotik veya bazı metabolitleri üretebilir, ancak saksı testlerinde bunu yapmakta güçlük çekebilir. Yine antagonist bakteri ve patojen petri kabında birbirinden belli uzaklıkta ekildiği için karşılaşma olasılığı yüksek olabilir ancak saksıda bu şans bulamayabilirler (Cook and Baker, 1983). Kısaca, *in vivo* uygulamalarda tüm koşullar bakterinin gelişeceği şekilde ayarlanabilir. Saksı testlerinde her ne kadar sıcaklık, nem gibi parametreler ayarlansa da toprakta / kök yüzeyinde antagonistin kolonize olması veya toprağın mikro florası üzerine yapılacak çok şey olmadığı için bu tip uyumsuzluklarla karşılaşılabilir (Bora ve Özaktan, 1998). Bu nedenle biyolojik mücadele ajanlarının seçilmesinde sadece *in vitro* testlere dayalı bir seçim yapmak doğru değildir.

Bu tez çalışmasında etkisi araştırılan bakırlı referans kimyasal, *Ac*'yi engellemede bazı bakterilerden daha başarısız bulunmuştur. Bakırın çok yüksek etki göstermemesinin nedeni tohum kabuğunun altında bulunan bakterilerin tohum uygulaması boyunca bakır iyonlarından korunmuş olması ile açıklanabilir. Tohum kabuğunun altına yerleşen patojen bakteri (*Ac*), bakır iyonlarının bitki içine girmeyişi nedeniyle kimyasal uygulamasından korunmuş ve akabinde fidelikleri enfekte etmiş olabilir. Bu nedenle, bakırlı preparatlar KBML için tohum uygulamalarında etkili olmayabilir. Diğer muhtemel sorun, bakırlı preparatların yaygın kullanılması sonucu bakterinin bakıra dayanıklılık kazanma

riski gibi olumsuz yönü bulunmaktadır (Latin and Hopkins, 1995; Walcott *et al.*, 2004; Wechter *et al.*, 2011). Bu durum, tohumlara uygulanan KBML hastalığıyla mücadelede bakırın kullanımını sınırlayan en önemli handikaptır. Bu nedenle, fidelik ve tarla koşullarında başarılı bir şekilde bakırlı preparatlarla mücadele edemediğimiz KBML hastalığıyla biyolojik mücadele çalışmaları umut verici bir alternatif olarak değerlendirilmektedir.



6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Ac'nin neden olduğu KBML hastalığı kabakgillerde önemli verim kaybına neden olan bir hastalıktır. Hastalığın tohum kaynaklı olması ve çok hızlı bir şekilde yayılması nedeniyle alınacak önlemler sınırlıdır. Hastalıkla mücadelede, pratikte, sadece bakırlı preparatlar kullanılmakta ve etkili yeni mücadele yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu tez çalışması Ac ile biyolojik mücadele konusunda EB izolatlarıyla yapılmış bir ön çalışma niteliği taşımaktadır ve bu çalışmanın bulguları ışığında gelecekte hastalıkla mücadele konusunda yapılacak çalışmalarda dikkate alınması gereken noktalar aşağıdaki gibi özetlenebilir:

- Vakum infiltrasyon yöntemi Ac'nin tohuma inokulasyonunda başarılı bir yöntem olmuştur.
- *In vitro* ve *in vivo* çalışmaları arasında her zaman bir uyum görülmeyebilir. *In vivo* test sonuçlarına göre başarılı bulunan bakterilerin her zaman *in vitro*'da aynı olumlu etkiyi göstermeyebilir. Tam tersi, *in vitro* testlerde başarılı bulunan bakteriler de *in vivo* test koşullarında olumlu sonuçlar vermeyebilir. Bu nedenle antagonist adayı bakterilerin eleme testlerinde, basit *in vivo* ya da yarı *in vivo* testlere ağırlık verilmelidir.
- KBML'yi engellemede fluorescent Pseudomonaslar, *P. agglomerans* ve *E. cloaceae* gibi enterik bakteriler oldukça başarılı bulunmuştur.
- KBML'ni engellemede başarılı bulunan ve bitki hastalıklarıyla biyolojik savaş açısından değerlendirdiğimizde bizim için de yeni türler olan bazı bakterilerin bu tez çalışması sonucunda saptanmış olması da çalışmanın dikkati çeken bir sonucudur. Ancak, özellikle, *Cronobacter sakazakii* ve *Serratia* genusundan bazı bakterilerin fırsatçı insan patojenleri olarak bilinmesi de bitki hastalıklarıyla biyolojik savaş çalışmalarında çevre ve insan sağlığı açısından dikkat etmemiz gereken önemli bir sonuçtur. Bu tür etmenler, doğal habitat olarak bitki içsel dokularında yaşayabilirler, ancak, biyolojik savaş açısından etkili olsalar da, bu tür etmenlerin kesin moleküler tanısı yapılarak biyolojik savaş çalışmaları kapsamında kullanılmaması gerekmektedir.

- Antagonist etkililiği, izole edildiği konukçuya bağlı olmayıp farklı konukçu dokularından elde edilen izolatlar konukçusu olmayan bir başka bitkideki hastalığın biyolojik mücadelesinde de başarılı sonuçlar verebilmektedir.
- Hastalık tohum kaynaklı olduğundan ve bulaştıktan sonra oldukça hızlı yayıldığından tohum uygulamaları hastalığı önlemede oldukça önemlidir.
- Bakteriyel antagonistler Ac'yi engellemede bakırlı preparatlardan daha başarılı bulunmuştur.
- KBML'yi entegre mücadelesi kapsamında antagonistlerin de kullanılması gerektiği bu çalışmayla da ortaya konmuştur.
- Bu tez çalışması bulguları, Ac'nin biyolojik mücadelesine dönük bir ön çalışmadan umutvar sonuçların alındığını göstermektedir. Bu bakteriyel antagonistlerin gerçek performanslarının değerlendirilebilmesi için, Ac ile doğal enfekteli karpuz tohumlarıyla yapılacak saksı ve tarla denemelerine gereksinim duyulmaktadır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Adewuyi, A., Oderinde, R.A. and Ademisoje, A.O.,** 2013, Antibacterial activities of nonionic and anionic surfactants from *Citrullus lanatus* seed oil, *Jundishapur J Microbio*, 6(3):205-208pp.
- Akat, Ş.,** 2015, Endofitik bakterilerin hıyar bitkilerinde kolonizasyonunun ve bitki gelişimine etkisinin araştırılması, E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilim Dalı, Yüksek lisans Tezi, 91s.
- Akbaba, M.,** 2014, Bitki gelişimini arttıran bakteriyel endofitlerin hıyar bakteriyel köşeli yaprak leke hastalığının (*Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*) önlenmesinde kullanıma olanakları, E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilim Dalı, Yüksek lisans Tezi, 119s.
- Amadi, J.E., Adebol, M.O. and Eze, C.S.,** 2009, Isolation and identification of bacterial blotch organism from watermelon (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. and Nakai), *African Journal of Agricultural Research*, 4(11): 1291-1294pp.
- Araújo, D.V., Mariano, R.L.R. and Michereff, S.J.,** 2005, Métodos de inoculação de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* em melao, *Summa Phytopathologica*, 31:66-70pp.
- Arias A.,** 2000, Plant growth promoting microorganisms in Uruguay: Status and prospects, Proc. 5th Int. Conf. Plant Growth Promoting Rhizobacteria, Brasil.
- Assis, S.M.P., Mariano, R.L.R. and Michereff, S.J.,** 1999, Metodos de inoculação de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* em melao, *Summa Phytopathologica*, 31:66-70pp.
- Aysan, Y., Horuz, S., Çetinkaya Yıldız, R., Mirik M. ve Saygılı, H.,** 2011, Karpuz üretim alanlarında *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*'nin yayılmasında tohum kökenli bulaşmaların önemi, Türkiye IV. Tohumculuk Kongresi, 14-17 Haziran 2011, Samsun, 292-293s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Babadoost, M. and Pataky, N.**, 2002, First report of bacterial fruit blotch of watermelon caused by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in Illinois, *Plant Disease*, 86(4):443p.
- Bahar, O., Kritzman, G. and Burdman, S.**, 2009, Bacterial fruit blotch of melon: screens for disease tolerance and role of seed transmission in pathogenicity, *European Journal of Plant Pathology*, 123(1):71-83pp.
- Bahar, O. and Burdman, S.**, 2010, Bacterial fruit blotch: a threat to the cucurbit industry, *Israel Journal of Plant Sciences*, 58(1):19-31pp.
- Berg, G. and Hallmann, J.**, 2006, Control of plant pathogenic fungi with bacterial endophytes, In: Schulz B, Boyle C, Sieber TN (eds) *Soil biology*, vol 9. microbial root endophytes, Springer, Berlin, 53–67pp.
- Bertrand, H., Nalin, R., Bally, R. and Cleyet- Marel, J.C.**, 2001, Isolation and identification of the most efficient plant growth-promoting bacteria associated with canola (*Brassica napus*), *Biol Fertil Soil.*, 33, 152-156pp.
- Bhadra, B., Pradosh Roy, P. and Chakraborty R.**, 2005, *Serratia ureilytica* sp. nov., a novel urea-utilizing species, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55, 2155–2158pp.
- Black, M.C., Isakeit, T., Barnes, L.W., Kucharek, T.A., Hoover, R.J. and Hodge, N.C.**, 1994, First report of bacterial fruit blotch of watermelon in Texas, *Plant Disease*, 78:831p.
- Block, C.C. and Shepherd, L.M.**, 2008, Long-term survival and seed transmission of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in melon and watermelon seed, *Plant health Progress*, Doi:10.1094/Php-2008-1219-01-BR.
- Bora, T. ve Özaktan, H.**, 1998, Bitki Hastalıklarıyla Biyolojik Savaş, E.Ü Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Fitopatoloji Anabilim Dalı, S: 132-136s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Burdman, S., Kots, N. and Kritzman, G.,** 2004, Characterization of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* strains isolated from watermelon and melon fields in Israel, *Phytopathology*, 94 (6): 12p.
- Burdman, S., Kots, N., Kritzman, G. and Kopelowitz, J.,** 2005, Molecular, physiological, and host-range characterization of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* isolates from watermelon and melon in Israel, *Plant Disease*, 89(12):1339-1347pp.
- Burdman, S. and Walcott, R.,** 2012, *Acidovorax citrulli*: generating basic and applied knowledge to tackle a global threat to the cucurbit industry, *Molecular Plant Pathology*, 13 (8): 805–815pp.
- Chakraborty, U., Chakraborty, B.N., Basnet, A. and Chakraborty, P.,** 2009, Evaluation of *Ochrobactrum antropi* TRS-2 and its talc based formulation for enhancement of growth of tea plants and management of Brown root disease, *Journal of Applied Microbiology*, 107:625-634pp.
- 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*, 5:83–91pp.
- Chen, Y., Mei, R., Lu, S., Liu, L. and Kloepper, J.W.,** 1996, The use of yield increasing bacteria (YIB) as plant growth promoting rhizobacteria in Chinese agriculture, In: Management of soil borne diseases, R.S. Uthkede and W.K., Gupta (Eds), Ludhiana: Kalyani Publishers, 164-184pp.
- Chet, I., Ordentlich A., Shapira, R. and Oppenheim, A.,** 1990, Mechanisms of biocontrol of soil-borne plant pathogens by Rhizobacteria, *Plant and Soil*, 129: 85-92pp.
- Cho, S.H., Lee, K.S., Shin, D.S., Han, J.H., Park, K.S., Lee, C.H., Park, K.H., and Kim, S.B.,** 2010, Four new species of *Chryseobacterium* from the rhizosphere of coastal sand dune plants, *Chryseobacterium elymi* sp. nov., *Chryseobacterium hagamense* sp. nov., *Chryseobacterium lathyri* sp. nov. and *Chryseobacterium rhizosphaerae* sp. nov, *Syst. Appl. Microbiol.*, 33:122-127pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Conceição, C.S., Felix, K.C.S., Mariano, R.L.R., Medeiros, E.V. and Souza, E.B.,** 2014, Combined effect of yeast and silikon on the control of bacterial fruit blotch in melon, *Scientia Horticulturae*, 174:164-170pp.
- Cook, R. J. and Baker, K.F.,** 1983, The Nature and Practice of Biological Control of plant Pathogens, *APS, St Paul, Minn.*, 539pp.
- Crall, J.M. and Schenck, N.C.,** 1969, Bacterial fruit rot of watermelon in Florida, *Plant Disease Reporter*, 53(1):74-75p.
- Çakmakçı, R., Kantar, F. and Şahin, F.,** 2001, Effect of N₂ fixing bacterial inoculations on yield of sugar beet and barley, *J. Plant Nutr. Soil Sci.*, 164, 527-531pp.
- Çetinkaya, Yıldız, R. ve Karataş, A.,** 2014, Doğu Akdeniz Bölgesi'inde karpuzda bakteriyel meyve lekesi hastalığının epidemiyolojisi, V. Bitki Koruma Kongresi, 3-5 Şubat 2014, Antalya, 198s.
- Çubukçu, N. ve Benlioğlu, K.,** 2007, Pamuklarda *Verticillium* solgunluğu (*Verticillium dahliae* kleb.)'na karşı endofitik bakterilerle biyolojik mücadele olanakları (Biological control options of *Verticillium* wilt (*Verticillium dahliae* kleb.) of cotton by endophytic bacteria), ADÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, 59s.
- De Silva, A., Patterson, K., Rothrock, C. and Moore, J.,** 2000, Growth promoting of highbush blueberry by fungal and bacterial inoculants, *Hortscience*, 35 (7), 1228-1230pp.
- Dejonghe, W., Boon, N., Seghers, D., Top, E.M. and Verstraete, W.,** 2001, Bioaugmentation of soils by increasing microbial richness: missing links, *Environ Microbiol*, 3:649–657pp.
- Demir, G.,** 1996, A new disease of watermelon in Türkiye: Bacterial fruit blotch of watermelon (*Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (Schaad et al.) Willems et al.), *The Journal of Turkish Phytopathology*, 25:43-50pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Deng, W.L., Huang, T.C. and Tsai, Y.C.,** 2010, First report of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* as the causal agent of bacterial leaf blight of betelvine in Taiwan, *Plant Disease*, 94(8): 1065p.
- EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization),** 2015, Eradication of *Acidovorax citrulli* from Emilia-Romagna, <http://archives.eppo.int/EPPOReporting/2012/Rse-1205.pdf> (Erişim tarihi: 02 Kasım 2015).
- EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization),** 2016, EPPO A1 List of pests recommended for regulation as quarantine pests, <https://www.eppo.int/QUARANTINE/listA1.htm> (Erişim tarihi: 12 Ocak 2016).
- Eşiyok, D.,** 2012, Kışlık ve Yazlık Sebze Yetiştiriciliği, Meta Basım, İzmir, 402s.
- Evans, T.A. and Mulrooney, R.P.,** 1991, First report of watermelon fruit blotch in Delaware, *Plant Disease*, 75:1074p.
- Fakhraei, D.,** 2015, Endofitik bakterilerin hıyar bitkilerinde dayanıklılığı uyarma yoluyla fusarium solgunluğuna etkisinin araştırılması, E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilim dalı, Doktora Tezi, 135s.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations),** 2012, FAO'nun 2012 verileri, <http://www.faostat.org> (Erişim tarihi: 13 Aralık 2015).
- Farimaz, A., Horuz, S. ve Aysan Y.,** 2014, Çeşitli bitki aktivatörleri ve ticari gübrelerin karpuz bakteriyel meyve lekesi hastalığına etkisi, *Türkiye Biyolojik Mücadele Dergisi*, 5(1):31-38pp.
- Farmer, J.J., Asbury, M.A., Hickman, F.W. and Brenner, D.J.,** 1980, *Enterobacter sakazakii*: a new species of *Enterobacteriaceae* isolated from clinical specimens, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 30:569-584pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Feng, J.J., Chen, K.J., Kim, J.Y., Xu, Y., Zhou, X.Y. and Li, J.Q.,** 2007, Effect of seed priming on seedling growth and disinfection to *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, In triploid watermelon seeds, *Acta Phytopathologica Sinica*, 37:528-534pp.
- Feng, J., Schuenzel, E.L., Li, J. and Schaad, N.W.,** 2009a, Multilocus sequence typing reveals two evolutionary lineages of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, *Phytopathology*, 99:913-920pp.
- Feng, J., Li, J., Randhawa, P., Bonde, M. and Schaad, N.W.,** 2009b, Evaluation of seed treatments for the eradication of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* from melon and watermelon seeds, *Can. J. Plant Pathol.*, 31:180–185pp.
- Feng, J.J., Li, J.O., Walcott, R.R., Zhang, G.M., Luo, L.E., Kang, L., Zheng, Y. and Schaad, N.M.,** 2013, Advances in detection of *Acidovorax citrulli*, the causal agent of bacterial fruit blight of cucurbits, *Seed Science and Technology*, 41:1-15pp.
- Ferreira, H.A., Nascimento, C.W.A., Datnoff, L.E., Nunes, G.H.S., Preston, W., Souza, E.B. and Mariano, R.L.R.,** 2015, Effects of silicon on resistance to bacterial fruit blotch and growth of melon, *Crop Protection*, 78:277-283pp.
- Fessehaie, A. and Walcott, R.R.,** 2005, Biological Control to Protect Watermelon Blossoms and Seed from Infection by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, *Phytopathology*, 95:413-419pp.
- Fravel, D.R.,** 2005, Commercialization and implementation of biocontrol, *Annual Review of Phytopathology*, 43:337-359pp.
- Gagné, S., Debhi, L., Lequere, D., Cayer, F., Marin, J.L., Lemay, R. and Fournier, N.,** 1993, Inoculated into the pear-based growing media, *Soll Biol Biochem.*, 25, 269-272pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Geels, F.P. and Schippers, B.**, 1983, Selection of antagonistic fluorescent *Pseudomonas* spp. and their root colonization and persistence following treatment of seed potatoes, *Phytopathol. Z.*, 108:193-206pp.
- GKGM (Gıda Ve Kontrol Genel Müdürlüğü)**, 2015, Kavun ve karpuz hastalıkları ile mücadele, http://www.tarim.gov.tr/GKGM/Belgeler/BitkiHizmetleri/hastalik_zararlilari_ile_mucadele_dokumanlari/kavun-karpuz.pdf. (Erişim tarihi: 20 Aralık 2015).
- Goth, R.W. and Webb, R.E.**, 1981, Resistance of commercial watermelon (*Citrullus lanatus*) to *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli*, *Plant Disease*, 65:671-672p.
- Gül, A., Özaktan, H., Yolageldi, L. ve Çakır, B.**, 2011, Bitki gelişimini artıran kök bakterilerinin sıcaklık ve *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* stresi altındaki domates bitkilerinin gelişimine etkileri, TÜBİTAK TOVAG Projesi, 108 O 069 no.lu proje kesin raporu, 194s.
- Hallmann, J., Quadt, H.A, Rodrguez, R. and Kloepper, J.W.**, 1998, Interactions between *Meloidogyne incognita* and endophytic bacteria in cotton and cucumber, *Soil Biology Biochemistry*, 30:925-937pp.
- Hamm, P.B. and Spink, D.S.**, 1997, First report of bacterial fruit blotch of watermelon in Oregon, *Plant Disease*, 81:113p.
- Harighi B.**, 2007, Bacterial leaf spot of Christ's thorn, a new disease caused by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in Iran, *Journal of Plant Pathology*, 89 (2) 283-285pp.
- Hassan, M. N., Afghan, S., Hassan, Z. and Hafeez, Y.F.**, 2014, Biopesticide activity of sugarcane associated rhizobacteria: *Ochrobactrum intermedeium* strain NH-5 and *Stenotrophomonas maltophilia* strain NH-300 against red rot under field conditions, *Phytopathologia Medditerranea*, 53 (2) 229-239pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Holeva, M.C., Karafla, C.D., Glynos, P.E. and Alivizatos, A.S.,** 2009, First report of natural infection of watermelon plants and fruits by the phytopathogenic bacterium *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in Greece, *Phytopathologia Mediterranea*, 48(2)316p.
- Hopkins, D.L., Thompson, C.M. and Elmstrom, G.W.,** 1993, Resistance of watermelon seedlings and fruit to the fruit blotch bacterium. *Hortscience*, 28:122-123p.
- Hopkins, D.L.,** 1995, Copper-containing fungicides reduce the spread of bacterial fruit blotch of watermelon in the greenhouse, *Phytopathology*, 85:510p.
- Hopkins, D.L., Cucuzza, J.D. and Watterson, J.C.,** 1996, Wet seed treatments for the control of bacterial fruit blotch of watermelon, *Plant Disease*, 80:529-532pp.
- Hopkins, D.L. and Thompson, C.M.,** 2002, Seed transmission of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in cucurbits, *Hortscience*, 37:924-926pp.
- Hopkins, D.L., Thompson, C.M., Hilgren, J. and Lovic, B.,** 2003, Wet seed treatment with peroxyacetic acid for the control of bacterial fruit blotch and other seedborne diseases of watermelon, *Plant Disease*, 87:1495-1499pp.
- Horuz, S. ve Aysan, Y.,** 2011, Karpuz bakteriyel meyve lekesi hastalığı etmeni *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* 'nin tohumla taşınma oranının belirlenmesi, Türkiye IV. Tohumculuk Kongresi, 14-17 Haziran 2011, Samsun, 308-312s.
- Horuz, S. and Aysan, Y.,** 2012, Outbreak of bacterial fruit blotch disease on melon and watermelon in Çukurova Region, Turkey, Proceedings of the Xth EUCARPIA Meeting on Genetics and Breeding of *Cucurbitaceae*, 15-18 Ekim 2012, Antalya, 763-766pp.
- Horuz, S., Çetinkaya Yıldız, R., Mirik, M. and Aysan, Y.,** 2014, Occurrence, isolation, and identification of *Acidovorax citrulli* from meoln in Turkey, *Plant Protection Science*, 50:179-183pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Horuz, S.**, 2014, Karpuz bakteriyel meyve lekesi hastalığı etmeni *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* 'nin tanısı, moleküler karakterizasyonu ve bakteriyel antagonistlerle biyolojik mücadelesi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 217s.
- Hu, F.P., Young, J.M. and Triggs, C.M.**, 1991, Numerical analysis and determinative tests for non-fluorescent plant-pathogenic *Pseudomonas* spp. and genomic analysis and reclassification of species related to *Pseudomonas avenae* Manns 1909, *International Journal of Systematic Bacteriology*, 41:516-525pp.
- Isakeit, T., Black, M.C. and Jones, J.B.**, 1998, Natural infection of citronmelon with *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, *Plant Disease*, 82:351p.
- Iversen, C., Lehner, A., Mullane, N., Bidlas, E., Cleenwerck, I., Marugg, J., Fanning, S., Stephan, R. and Joosten, H.**, 2007, The taxonomy of *Enterobacter sakazakii*: proposal of a new genus *Cronobacter* gen. nov. and descriptions of *Cronobacter sakazakii* comb. nov. *Cronobacter sakazakii* subsp. *sakazakii*, comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *malonaticus* subsp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov. and *Cronobacter genomospecies*, *BMC Evol. Biol.*, 7:64p.
- Jacobs, J.L., Damicone, J.P. and Mccraw, B.D.**, 1992, First report of bacterial fruit blotch of watermelon in Oklahoma, *Plant Disease*, 76:1185p.
- Jiang, H., Dong, H., Zhang, G., Yu, B., Chapman, L. R. and Fields, M.W.**, 2006, Microbial Diversity in Water and Sediment of Lake Chaka, an Athalassohaline Lake in Northwestern China, *Applied and Environmental Microbiology*, 72(6):3832–3845pp.
- Jiang, C.H., Wu, F., Yu, Z.Y., Xie, P., Ke, H.J., Li, H.W., Yu, Y.Y. and Guo, J.H.**, 2015, Study on screening and antagonistic mechanisms of *Bacillus amyloliquefaciens* 54 against bacterial fruit blotch (BFB) caused by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, *Microbiological Research*, 170:95-104pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Johnson, K.L., Minsavage, G.V., Le, T., Jones, J.B. and Walcott, R.R.,** 2011, Efficacy of a nonpathogenic *Acidovorax citrulli* strain as a biocontrol seed treatment for bacterial fruit blotch of cucurbits, *Plant Disease*, 95:697-704pp.
- King, E.O., Ward, M.K., and Raney, D.E.,** 1954, Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein, *J.Lac.Clin.Med.*, 44:301-307pp.
- Kloepper, J. W., Leong, J., Tientze, M., Schroth, M. N.,** 1980, Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth promoting rhizobacteria, *Nature*, 286, 885–886.
- Krause, M.S., Madden, L.V. and Hoitink, H.A.,** 2001, Effect of potting mix microbial carrying capacity on biological control of rhizoctonia damping-off of radish and rhizoctonia crown and root rot of poinsettia, *Phytopathology*, 91(11):1116-1123pp.
- Krechel, A., Faupel, A., Hallmann, J., Ulrich, A. and Berg, G.,** 2002, Potato-associated bacteria and their antagonistic potential towards plant-pathogenic fungi and the plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood, *Can J Microbiol*, 48, 772–786pp.
- Kobayashi, D.Y., Guglielmoni, M. and Clarke, B.B.,** 1995, Isolation of the chitinolytic bacteria *Xanthomonas maltophilia* and *Serratia marcescens* as biological control agents for summer patch disease of turfgrass, *Soil Biol. Biochem.*, 27(11):1479-1487pp.
- Kobayashi, D.Y. and Palumbo, J.D.,** 2000, Bacterial endophytes and their effects on plants and uses in agriculture, *Microbial endophytes*, Marcel Dekker, Inc., New York, NY, 199–233pp.
- Kubota, M., Hagiwara, N. and Shirakawa, T.,** 2012, Disinfection of seeds of cucurbit crops infested with *Acidovorax citrulli* with dry heat treatment, *J. Phytopathol*, 160:364–368pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kumugai, L.B., Woods, P.W., Walcott, R.R. and Moua, X.,** 2014, First report of bacterial fruit blotch on melon caused by *Acidovorax citrulli* in California, *Plant Disease*, 98(10):1423p.
- Langston, D.B., Walcott, R.R., Gitaitis R.D. and Sanders, F.H.,** 1999, First report of a fruit rot of pumpkin caused by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in Georgia, *Plant Disease*, 83(2):199p.
- Latin, R.X. and Rane, K.K.,** 1990, Bacterial fruit blotch of watermelon in Indiana, *Plant Disease*, 74:331p.
- Latin, R.X. and Hopkins, D.L.,** 1995, Bacterial fruit blotch of watermelon: The hypothetical exam question becomes reality, *Plant Disease*, 79:761-765pp.
- Latin, R.X., Tikhonova, I. and Rane, K.K.,** 1995, Factors affecting the survival and spread of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in watermelon transplant production facilities, *Phytopathology*, 85:1413-1417pp.
- Latin, R.X.,** 2000, Bacterial Fruit Blotch of Cucurbits, Compendium of Cucurbit Diseases, The American Phytopathological Society Press, USA, 34-35p.
- Lavania, M., Chauhan, P.S., Chauhan, S.V.S., Singh, H.B. and Nautiyal, S.C.,** 2005, Induction of plant defense enzymes and phenolics by treatment with plant growth-promoting rhizobacteria *Serratia marcescens* NBRI1213, *Current Microbiology*, 52:363-368pp.
- Lelliot, R.A. and Stead, D.E.,** 1987, Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants, Blackwell Scientific Publications, Oxford, England, 216p.
- Lilley, A.K., Fry J.C., Bailey, M.J. and Day, M.J.,** 1996, Comparison of aerobic heterotrophic taxa isolated from four root domains of mature sugar beet (*Beta vulgaris*), *FEMS Microbiol Ecol*, 21:231-242pp.
- Liu, L., Kloepper, J.W. and Tuzun, S.,** 1995, Induction of systemic resistance in cucumber against *Fusarium* wilt by plant growth-promoting rhizobacteria, *Phytopathology*, 85:695-698pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- 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, 843–847pp.
- 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, 695–698pp.
- Luz, W.C.,** 2000, Plant Growth Promoting Rhizobacteria in Graminicolus crops in Brazil, In: Proc.5th Int. Conf. Plant Growth Promoting Rhizobacteria, Brasil.
- Lu, Y, and Luo, M.,** 2004, Isolation of endophytic bacteria from hami melon and screening of antagonistic bacteria, *Journal of Shihezi University* (Natural Science Edition), 22:104-109pp.
- Mahaffee, W.F. and Kloepper, J.W.,** 1997, Temporal changes in the bacterial communities of soil, rhizosphere, and endorhiza associated with fieldgrown cucumber (*Cucumis sativus* L.), *Microbial Ecology*, 34:210–223pp.
- Martin, H.L. and Horlock, C.M.,** 2002, First report of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* as a pathogen of gramina in Australia, *Plant Disease*, 88(12):1406p.
- Maurfoher, M., Reihmann, C., Schmidli-Sacrerer, P., Heeb, S.D. and Defago, G.,** 1992, Salicylic acid biosynthesis genes expressed in *Pseudomonas fluorescens* strain P3 improve the induction of systemic resistance in tobacco against tobacco necrosis virus, *Phytopathology*, 88, 678-684pp.
- McInroy, J.A. and Kloepper, J.W.,** 1995, Population Dynamics of endophytic bacteria in fieldgrown sweet corn and cotton, *Can. J. Microbiolgy*, 41: 895–901pp.
- Mederios, F.H.V., Moreas, I.S.F., Da Silva Neto, E.B., Silverira, E.B., De Lima R. and Mariano, R.,** 2009, Management of melon bacterial blotch by plant beneficial bacteria, *Phytoparasitica*, 37: 453-460pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Melo, L.A., Tebaldi, N.D., Mehta, A. and Marques, A.S.A.**, 2014, Comparing *Acidovorax citrulli* strains from melon and watermelon: Phenotypic characteristics, pathogenicity and genetic diversity, *Tropical Plant Pathology*, 39(2): 154-162pp.
- Melo, E.A., Mariano, R.L.R., Laranjeira, D., Santos, L.A., Gusmão, L.O. and Souza, E.B.**, 2015, Efficacy of yeast in the biocontrol of bacterial fruit blotch in melon plants, *Plant Pathology*, 40:56–64pp.
- Mirik, M., Aysan Y. and Sahin, F.**, 2006, Occurrence of bacterial fruit blotch of watermelon caused by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in the Eastern Mediterranean Region of Turkey, *Plant Disease*, 90(6):829p.
- Mirik, M. and Aysan, Y.**, 2008, Karpuz Bakteriyel Meyve Lekesi Hastalığı Bacterial Fruit Blotch of Watermelon *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, Bitki Bakteri Hastalıkları Kitabı, Prof. Dr. Hikmet SAYGILI, Prof. Dr. Fikret ŞAHİN, Doç. Dr. Yeşim AYSAN, 31-33s.
- 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*, 50:301-320pp.
- Moore, F.P., Barac, T., Borremans, B., Oeyen, L., Vangronsveld, J., Lelie, D., Campbell, C.D. and Moore, E.R.B.**, 2006, Endophytic bacterial diversity in poplar trees growing on a BTEX-contaminated site: the characterisation of isolates with potential to enhance phytoremediation, *Systematic and Applied Microbiology*, 29:539–556pp.
- Mullin, R.S. and Schenck, N.C.**, 1963, Bacterial leaf spot on watermelon, *Plant Disease Reporter*, 47:848p.
- Munoz, M. and Monterroso, D.**, 2002, Identification of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in watermelon seeds in Nicaragua, Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (Costa Rica), 66:101-104pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Narisawa, K., Tokumasu, S. and Hashiba, T.,** 1998, Suppression of clubroot formation in chinese cabbage by the root endophytic fungus, *Heteroconium chaetospira*, *Plant Pathology*, 47, 206-210.
- Nascimento, A.R.P., Mariano, R.L.R. and Silva, E.I.,** 2004, Alternative hosts of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, *Horticultura Brasileira*, 22:511-515pp.
- Nelson, E.B., Chao, W.L., Norton, J.M., Nash, G.T. and Harman, G.E.,** 1986, Attachment of *Enterobacter cloacae* to hyphae of *Pythium ultimum*: possible role in the biological control of *Pythium preemergence* damping-off, *Phytopathology*, 76:327-335pp.
- Nelson, E.B. and Craft, C.M.,** 1991, Introduction and establishment of strains of *Enterobacter cloacae* in golf course turf for the biological control of dollar spot, *Plant Disease*, 75:510-514pp.
- Nie, L., Shah, S., Rashid, A., Burd, I.G., Dixon, G. and Glick, R.B.,** 2002, Phytoremediation of arsenate contaminated soil by transgenic canola and the plant growth-promoting bacterium *Enterobacter cloacae* CAL2, *Plant Physiol. Biochem.*, 40:355–361pp.
- O'Brien, R.G. and Martin, A.L.,** 1999, Bacterial blotch of melons caused by strains of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 39:479-485pp.
- O'Sullivan, D.J. and O'Gara, F.,** 1992, Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogens, *Microbiol. Rev.*, 56:662-676pp.
- Oliveira, A.DE., Santos, M.H.M. Dos., Silveira, E.B. DA., Gomes, A.M.A., Mariano, R. and De, L.R.,** 2006, Biological control of bacterial blotch of melon by seed treatment with epiphytic and endophytic bacteria, *Horticultura Brasileira*, 24(3):373-377pp.
- Özaktan, H. and Bora, T.,** 2004, Biological control of fire blight in pear orchards with a formulation of *Pantoea agglomerans* strain EH 24, *Brazilian Journal of Microbiology*, 35:224-229pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Özaktan, H., Çakır, B., Gül, A., Yolageldi, L. ve Akköprü, A.,** 2015a, Bakteriyel endofitlerin hıyar yetiştiriciliğinde biyogübre ve biyopestisit olarak kullanılma olanakları, Tübitak ve AB Cost Projesi, 111 O 505 no.lu proje kesin raporu, 154s.
- Özaktan, H., Çakır, B., Gül, A., Yolageldi, L. and Akköprü, A.,** 2015b, Isolation and evaluation of endophytic bacteria against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* infecting cucumber plants, *Austin Journal of Plant Biology*, 1(1): 1003-1006pp.
- Özşahinler, F. ve Özaktan, H.,** 2012, Karpuz ve kavunda bakteriyel meyve lekesi hastalığının (*Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*) yararlı bakterilerle önlenmesi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 79s.
- Palkovics, L., Petroczy, M., Kertesz, B., Nemeth, J., Barsony, C., Mike, Z. and Hevesi, M.,** 2008, First report of bacterial fruit blotch of watermelon caused by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in Hungary, *Plant Disease*, 92(5):834-835pp.
- Peix, A., Rivas, R., Santa-Regina, I., Mateos, P.F., Martí'nez-Molina, E., Rodri'guez-Barrueco, C. and Vela'zquez, E.,** 2004, *Pseudomonas lutea* sp. nov., a novel phosphate-solubilizing bacterium isolated from the rhizosphere of grasses, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54: 847–850pp.
- Penyalver, R., Oger, P., Lopez, M.M. and Farrand, S.K.,** 2001, Ironbinding compounds from *Agrobacterium* spp.: Biological control strain *Agrobacterium rhizogenes* K84 produces a hydroxamate siderophore, *Appl. Environ. Microbiol.*, 67:654-664pp.
- Popović, T. and Ivanović, Ž.,** 2015, Occurrence of *Acidovorax citrulli* causing bacterial fruit blotch of watermelon in Serbia, *Plant Disease*, 99:886p.
- Puentea, M., Ching, Y., Li B.L. and Yoav Bashana, C.,** 2009, Endophytic bacteria in cacti seeds can improve the development of cactus seedlings, *Environmental and Experimental Botany*, 66:402–408pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Rane, K.K. and Latin, R.X.**, 1992, Bacterial fruit blotch of watermelon association of the pathogen with seed, *Plant Disease*, 76:509-512pp.
- Romeiro, R.S.**, 2000, Preliminary results of PGPR research at the Universidade Federal de Viçosa, Brasel, Proc.In: 5th Int. Conf. Plant Path. Bact.
- Ren, Y.Z., Li, H., Li, G.Y., Wang, Q.Y. and Li, J.Q.**, 2006, First report of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* infecting edible seed watermelon (*Citrillus lanatus* var. *lanatus*) in China, *Plant Disease*, 90(8):1112p.
- Robinson, R.W. and Decker Walters, D.S.**, 1997, Cucurbits, CAB International, New York, NY, USA, 226p.
- Santos, E.R., Gouveia, E.R., Mariano, R.L.R. and Souto Maior, A.M.**, 2006, Biocontrol of bacterial fruit blotch of melon by bioactive compounds produced by *Bacillus* spp., *Summa Phytopathologica*, 32(4):376-378pp.
- Schaad, N.W., Sowell, G., Goth, R.W., Colwell, R.R. and Webb, R.E.**, 1978, *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli* subsp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 28:117-125pp.
- Schaad, N.W., Jones, J.B. and Chun, W.**, 2001, Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria, Third Edition, APS PRESS, St. Paul, Minnesota, 121-125pp.
- Schaad, N.W., Postnikova, E., Sechler, A., Claflin, L.E., Vidaver, A.K., Jones, J.B., Agarkova, I., Ignatov, A., Dickstein, E. and Ramundo, B.A.**, 2008, Reclassification of subspecies of *Acidovorax avenae* as *A. avenae* (Manns 1905) emend., *A. cattleyae* (Pavarino, 1911) comb. nov., *A. citrulli* (Schaad et al., 1978) comb. nov., and proposal of *A. oryzae* sp. nov, *Systematic Applied Microbiology*, 31:434-446pp.
- 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, 1567-1573pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Schmid, M., Iversen, C., Gontia I., Stephan, R., Hofmann, A., Hartmann, A., Jha, B., Eberl, L., Riedel, K. and Lehner, A.,** 2009, Evidence for a plant-associated natural habitat for *Cronobacter* spp., *Research in Microbiology*, 160:608-614pp.
- Seo, S.T., Park, J.H., Lee, J.S., Han, K.S., Cheong, S.R.,** 2006, Bacterial fruit blotch of melon caused by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, *Research in Plant Disease*, 12(3):185-188pp.
- Shin, D.S., Park, M.S., Jung, S., Lee, M.S., Lee, K.H., Bae, K.S. and Kim, S.B.,** 2007, Plant growth-promoting potential of endophytic bacteria isolated from roots of coastal sand dune plants, *J. Microbiol. Biotechnol.*, 17(8):1361-1368pp.
- Shirakawa, T.,** 2003, Epidemiology of watermelon bacterial fruit rot in nursing and seed sterilization method, *Agric. Hort*, 78:393–400pp.
- Silini-Chérif, H., Silini A., Ghoul M. and Yadav S.,** 2012, Isolation and characterization of plant growth promoting traits of a rhizobacteria: *Pantoea agglomerans*, *J. Biol. Sci.*, 15 (6) 267-276pp.
- Silva Neto, E.B., Silveira, E.B., Mariano, R.L.R., Nogueira, N.L., Rossi, M. L., and Santos, A.,** 2006, Penetration and colonization of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in leaves, seeds and fruits of melon type yellow, *Fitopatologia Brasileira*, 31, 84-88pp.
- Stephens, D.J., Schneider, R.W., Walcott, R. and Johnson, C.E.,** 2008, A procedure, based on exposure to chlorine gas, for disinfesting watermelon seeds, *Phytopathology*, 98:150–151p.
- Stockwell, V.O., Johnson, K.B., Sugar, D. and Loper, J. E.,** 2002, Antibiosis contributes to biological control of fire blight by *Pantoea agglomerans* strain Eh252 in orchards, *Phytopathology*, 92: 1202-1209pp.
- Sturz, A.V., Christie, B. R. and Matheson, B.G.,** 1998, Associations of bacterial endophyte populations from red clover and potato crops with potential for beneficial allelopathy. *Can. J. Microbiol.* 44: 162–167pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- 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, 360-369pp.
- Somodi, G.C., Jones, J.B., Hopkins, D.L., Stall, R.E., Kucharek, T.A., Hodge, N.C. and Watterson, J.C.**, 1991, Occurrence of a bacterial watermelon fruit blotch in Florida, *Plant Disease*, 75:1053-1056pp.
- Sowell, G. and Schaad, N.W.**, 1979, *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli* on watermelon-Seed transmission and resistance of plant introductions, *Plant Disease*, 63:437-441pp.
- Takashi, S., Shigemikato, K., Abiko, T. and Akira, K.**, 2000, Occurrence of watermelon-seed transmission and resistance of plant introductions, *Plant Disease Reporter*, 63:437-441pp.
- Tian, Y.L., Zhao, Y.O., Hu, B.S. and Liu, F.Q.**, 2013, First report of seedling blight of watermelon caused by *Acidovorax citrulli* transmitted from rootstock of pumpkin in China, *Plant Disease*, 97(3):420p.
- Tsavkelova, E., Cherdyntseva, T., Botina, S. and Netrusov, A.**, 2007, Bacteria associated with orchid roots and microbial production of auxin, *Microbiological Research*, 162: 69-76pp.
- TÜİK (Türkiye İstatistik Kurumu)**, 2014, Bitkisel üretim istatistikleri. (Erişim tarihi: 12 Aralık 2015)
- Tzeng, K.C. and Hsu, S.T.**, 2007, Bacterial diseases of cucurbits in Taiwan, Symposium of International Workshop on the Cucurbit Diseases and Resistance Breeding, 43-48pp.
- Uthede, G. S., Koch, C. A. and Menzies, J. G.**, 1999, Rhizobacterial growth and yield promotion of cucumber plants inoculated with *Pythium aphanidermatum*, Can. J. Plant athol, 21, 265-271pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Van Buren, A.M., Andre, C. and Ishimaru, C.A.,** 1993, Biological control of the bacterial ring rot pathogen by endophytic bacteria isolated from potato, *Phytopathology*, 83:1406p.
- 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, 2462–2470pp.
- Vessey, J.K.,** 2003, Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers, *Plant and Soil*, 255: 571–586pp.
- Walcott, R.R., Langston, D.B., Sanders, F.H. and Gitaitis, R.D.,** 2000, Natural outbreak of a bacterial fruit rot of cantaloupe in Georgia caused by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, *Plant Disease*, 84:372p.
- Walcott, R.R., Gitaitis, R.D., Castro, A.C., Sanders, F.H. and Diaz- Perez, J.C.,** 2002, Natural infestation of onion seed by *Pantoea ananatis*, causal agent of center rot, *Plant Disease*, 86:106-111pp.
- Walcott, R.R., Gitaitis, R.D. and Castro, A.C.,** 2003, Role of blossoms in watermelon seed infestation by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, *Phytopathology*, 93:528-534pp.
- Walcott, R.R., Fessehaie, A. and Castro, A.C.,** 2004, Differences in pathogenicity between two genetically distinct groups of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* on cucurbit hosts, *J. Phytopathol*, 152:277–285pp.
- Walcott, R.R.,** 2005, Bacterial fruit blotch of cucurbits (Erişim tarihi: 25 Aralık 2015).
- Walcott, R.R.,** 2008, Integrated pest management of bacterial fruit blotch of cucurbits, In: Integrated management of disease caused by fungi, phytoplasma and bacteria, Springer Book, 188p.
- Wall, G.C. and Santos, V.M.,** 1988, A new bacterial disease of watermelon in the Mariana Islands, *Phytopathology*, 78:1605p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Wall, L.G.**, 2000, Consequences of an overview on Plant Growth Promoting Rhizobacteria work in Argentina: The field should be wider, In: Proc.5th Int. Conf. Plant Growth Promoting Rhizobacteria, Brasil.
- Wang, X., Li, G., Jiang, D. and Huand, Hung-J.**, 2009, Screening of plant apiphytic yeasts for biocontrol of bacterial fruit blotch (*Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*) of hami melon, *Biological Control*, 50:164-171pp.
- Webb, R.E. and Goth, R.W.**, 1965, A seedborne bacterium isolated from watermelon, *Plant Disease*, 49:818-821pp.
- Wechter, W.P., Levi, A., Ling, K.S., Cousin, C. and Block, C.C.**, 2011, Identification of resistance to *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* among melon (*Cucumis* spp.) plant introductions, *HortScience*, 46:207–212pp.
- Wei, G., Kloepper, J.W. and Tuzun, S.**, 1991, Induction of systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum orbiculare* by select strains of plant growth-promoting rhizobacteria, *Phytopathology*, 81, 1508–1512pp.
- Wen, A., Mangravita-Novo, Hopkins, D.L. and Norman, D.J.**, 2008, Genetic characterization of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* using amplified fragment length polymorphism (AFLP), *Phytopathology*, 98:169p.
- Willems, A., Goor, M., Thielemans, S., Gillis, M., Kersters, K., Ley, J.D., and De Ley, J.**, 1992, Transfer of several phytopathogenic *Pseudomonas* species to *Acidovorax* as *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* subsp. nov., comb. nov., *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae*, and *Acidovorax konjaci*, *International Journal of Systematic Bacteriology*, 42:107-119pp.
- Yaeram, C., Thummabenjapone, P. and Pachinburavan, A.**, 2006, Suitable medium for increasing biomass of antagonistic *Streptomyces* spp. against bacterial fruit blotch disease of watermelon, *Khon Kaen Agriculture*, 34:12-19pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Yan, S., Yang, Y., Wang, T., Zhao, T. and Schaad, N.W.,** 2013, Genetic diversity analysis of *Acidovorax citrulli* in china, *European Journal of Plant Pathology*, 136:171-181pp.
- Yolageldi, L., Özaktan, H., Tunç, C. and Turhan, G.,** 2006, Preliminary investigation on biological control of *Verticillium dahliae*, Proceedings of the 12th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union, 11-15 June 2006, Rhodes-Greece, 247-249pp.
- Zimmerman-Lax, N., Shenker, M., Tamir-Ariel, D., Perl-Treves, R. and Burdman, S.,** 2015, Effects of nitrogen nutrition on disease development caused by *Acidovorax citrulli* on melon foliage, *Eur J Plant Pathol*, Doi: 10.1007/s10658-015-0822-5.
- Zhao, T.C., Sun, F. Z., Wang, J. R. and Xie, Y.J.,** 2003, Control of bacterial fruit blotch of hami melon by seed treatment with bactericides, *Plant Protection*, 29:50-52pp.

ÖZGEÇMİŞ

20/10/1989 tarihinde İstanbul'un Kadıköy ilçesi'nde doğdu. İlköğretim ve lise öğrenimini İstanbul'da tamamladı. Bilecik Üniversitesi Pazaryeri Meslek Yüksekokulu Tıbbi ve Aromatik Bitkiler önlisans eğitimine 2007 yılında başladı ve 2009 yılında mezun oldu. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü'nde lisans eğitimine 2010 yılında başladı ve 2013 yılında mezun oldu. Aynı üniversitede 2014 yılında Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilimdalı, Fitopatoloji Bilimdalında yüksek lisans eğitimine başladı.

