

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİTKİ KORUMA ANA BİLİM DALI
2025-YL-58

**DOMATES BAKTERİYEL BENEK HASTALIĞINA
(*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) KARŞI BAKIRA
TOLERANSLI ANTAGONİST BAKTERİLER İLE
BİYOLOJİK MÜCADELE**

Yeliz SAKAL
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Danışman
Doç. Dr. Ümit ÖZYILMAZ

AYDIN- 2025

KABUL VE ONAY

T.C. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Yüksek Lisans Programı öğrencisi Yeliz SAKAL tarafından hazırlanan “DOMATES BAKTERİYEL BENEK HASTALIĞINA (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) KARŞI BAKIRA TOLERANSLI ANTAGONİST BAKTERİLER İLE BİYOLOJİK MÜCADELE” başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 05/08/2025

Jüri Üyeleri

ONAY:

Başkan : Doç. Dr. Ümit ÖZYILMAZ
Aydın Adnan Menderes Üniversitesi
Üye : Prof. Dr. Pervin KINAY TEKSÜR
Ege Üniversitesi
Üye : Prof. Dr. Ayhan YILDIZ
Aydın Adnan Menderes Üniversitesi

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Fen Bilimleri Enstitüsünün tarih ve sayılı oturumunda alınan numaralı Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ethem AKTÜRK
Enstitü Müdürü



TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca yardımcı olan, yol gösteren, beni destekleyen danışman hocam Doç. Dr. Ümit ÖZYILMAZ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca çalışmamda yardımcı olan arkadaşlarım Kaan ZORLU ve Feriştah BOZYER'e çok teşekkür ederim.





BİLİMSEL ETİK BEYANI

“DOMATES BAKTERİYEL BENEK HASTALIĞINA (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) KARŞI BAKIRA TOLERANSLI ANTAGONİST BAKTERİLER İLE BİYOLOJİK MÜCADELE” başlıklı Yüksek Lisans tezindeki bütün bilgileri etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada, bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yaptığımı bildiririm. İfade ettiklerimin aksi ortaya çıktığında ise her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.

Yeliz SAKAL

05/08/2025



İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	i
TEŞEKKÜR	iii
BİLİMSEL ETİK BEYANI.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vii
KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
RESİMLER DİZİNİ.....	xiv
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xvi
ÖZET	xviii
ABSTRACT	xx
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	9
3. MATERYAL VE YÖNTEM	13
3.1. Materyal.....	13
3.2. Yöntem	13
3.2.1. Antagonist bakteri izolasyonu	13
3.2.2. İkili kültür çalışmaları	15
3.2.3. Antagonist bakterileri ön tanılama testleri	15
3.2.3.1. Oksidatif/Fermentatif (O/F) reaksiyon testi	15
3.2.3.2. Oksidaz testi	16
3.2.3.3. Patates yumuşak çürüklük testi.....	16
3.2.3.4. 37 °C’de gelişim testi.....	16
3.2.3.5. Tütünde aşırı duyarlılık testi.....	17
3.2.3.6. Endospor testi	17
3.2.3.7. Gram boyama testi.....	17
3.2.3.8. Floresan pigment testi.....	18
3.2.4. Antagonist bakterilerin etki mekanizmasına yönelik testler	18
3.2.4.1. DNaz testi	18

3.2.4.2. Kitinaz testi.....	18
3.2.4.3. Proteaz testi	19
3.2.4.4. Siderofor testi	19
3.2.5. Moleküler tanılama testi	20
3.2.6. Bakır direnç testi.....	20
3.2.6.1. Antagonist bakterilerin bakır direnci (ön çalışma)	20
3.2.6.2. Antagonist bakterilerin bakır direnci	22
3.2.7. Patojenisite testi ve uygun inokulum miktarının belirlenmesi	22
3.2.8. Saksı denemeleri.....	23
4. BULGULAR	26
4.1. Antagonist Bakteri İzolasyonu	26
4.2. Antagonist Bakterilerin Etkinliğinin İkili Kültür ile Saptanması	27
4.3. Antagonist Bakterilerin Ön Tanılama Testleri	28
4.4. Antagonist Bakterilerin Etki Mekanizması Testleri	35
4.5. Moleküler Tanılama Testleri	37
4.6. Bakır Direnç Testi	38
4.6.1. Antagonist bakterilerin bakır direnç testi (ön çalışma)	38
4.6.2. Antagonist bakterilerin bakır direnç testi	40
4.7. Patojenisite Testi ve Uygun İnokulum Miktarlarının Belirlenmesi.....	42
4.8. Saksı Denemeleri.....	42
5. TARTIŞMA.....	45
6. SONUÇ.....	48
7. KAYNAKLAR.....	50
ÖZGEÇMİŞ.....	57



KISALTMALAR DİZİNİ

CFU	: Colony Forming Unit
FAO	: Food and Agriculture Organization
kb	: Kilobaz
KB	: King B
LSD	: Least Significant Difference
MBC	: Minimum Bakterisidal Konsantrasyonu
MGY	: Mannitol Glutamate Yeast Extract
MIC	: Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
NA	: Nutrient Agar
NB	: Nutrient Broth
PDA	: Patates Dekstroz Agar
TSB	: Tryptic Soy Broth
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil.3.1. Antagonist bakteri izolasyonu iş akış şeması.....	14
Şekil.3.2. İkili kültür testi aşamaları	15
Şekil.3.3. Her bir petri kabı için besi yerindeki Cu konsantrasyonunun ayarlanması	21
Şekil 4.1. Antagonist bakterilerin bitki boyuna etkileri.....	44





RESİMLER DİZİNİ

Resim 3.1. Saksı denemelerinde hastalık inokulasyonu ve uygulama yapılan karakterlerin üzerinin nemlendirilmiş poşet ile örtülmesi	24
Resim 4.1. Seyreltmelerden ekilen ve besi yerlerinde gelişen bakterilerin genel görünümü.....	27
Resim 4.2. Antagonist adayı bakterilerin engelleme zonları.	27
Resim 4.3. O/F testi pozitif olan C2NK3, oksidatif reaksiyonu pozitif ancak fermentatif reaksiyonu negatif olan A3NK4 ve pozitif kontrol olan Ecc133 bakterisi	30
Resim 4.4. Oksidaz testi sonucu, mor renk pozitif sonuç.	30
Resim 4.5. Patates yumuşak çürüklük testi negatif sonuç veren C2NK3, pozitif sonuç veren O2EK2, A3NK3, C3EY10 ve negatif kontrol.	31
Resim 4.6. 37 °C’de gelişim için benmaride sıcaklık testi uygulaması.	32
Resim 4.7. Tütünde aşırı duyarlılık testi negatif sonuçlar ve pozitif kontrol.....	32
Resim 4.8. Endospor testi için 80 °C’de sıcak su uygulaması	33
Resim 4.9. Gram reaksiyonu pozitif ve mor renk veren C3EY10 ve gram reaksiyonu negatif ve pembe renk veren O3NK2 izolatları.....	33
Resim 4.10. King B besi yerindeki antagonist bakterilerin UV ışık altındaki ışımaları.	34
Resim 4.11. DNaz testi negatif sonuç ve pozitif sonuç veren bakteriler	35
Resim 4.12. Proteaz testi engelleme zonları.	36
Resim 4.13. Kitinaz testi pozitif HRO-C48 ve CBEK3 bakterileri	36
Resim 4.14. Siderofor testi pozitif veren bakteri	37
Resim 4.15. Sekans çalışması için yapılan PCR’da oluşan ürünlerin jel elektroforez görüntüsü	37
Resim 4.16. Antagonist bakterilerin bakır direnci ön çalışması	38
Resim 4.17. Antagonist bakterilerin bakır direnci	40



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1 2023 yılı dünyada en çok domates üretim alanına sahip ilk on ülke	2
Çizelge 1.2 2023 yılı dünyada en çok domates üretim miktarına sahip ilk on ülke.....	3
Çizelge 1.3 2024 yılı Türkiye domates ekim alanı ve üretimi	3
Çizelge 1.4 Türkiye’de illere göre sofralık ve salçalık domates ekim alanı	4
Çizelge 1.5 Türkiye’de illere göre sofralık ve salçalık domates üretim miktarı	4
Çizelge 3.1 Bakır duyarlılığı ön çalışmasındaki CuSO ₄ , su ve MGY karışım oranları..	21
Çizelge 3.2 Bakır duyarlılığı çalışmasındaki CuSO ₄ , su ve MGY karışım oranları.....	22
Çizelge 3.3 Saksıda biyolojik etkinlik denemelerinde kullanılan farklı kombinasyonlardaki karakterler	24
Çizelge 4.1 İzole edilen bakterilerin bir gram bitki dokusundaki sayıları	26
Çizelge 4.2 İzole edilen bakterilerin ikili kültür etkinlikleri.	28
Çizelge 4.3 Antagonist bakterilerin ön tanılama test sonuçları.....	29
Çizelge 4.4 Antagonist bakterilerin etki mekanizması test sonuçları	34
Çizelge 4.5 Antagonistlerin tür düzeyinde moleküler teşhis sonuçları	37
Çizelge 4.6 15 mM Cu ve alt dozlarında gelişen bakterilerin MIC ve MBC değerleri...	39
Çizelge 4.7 3,75 mM Cu ve alt dozlarında gelişen bakterilerin MIC ve MBC değerleri	41
Çizelge 4.8 Farklı inokulum miktarlarındaki benek sayıları.....	42
Çizelge 4.9 Saksı denemelerinde uygulamadan 24 gün sonra yaprak başına düşen benek sayıları ve pozitif kontrole göre yüzde etkisi.....	43
Çizelge 4.10 Antagonist bakterilerin bitki gelişimine etkisi.	44



ÖZET

DOMATES BAKTERİYEL BENEK HASTALIĞINA (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) KARŞI BAKIRA TOLERANSLI ANTAGONİST BAKTERİLER İLE BİYOLOJİK MÜCADELE

SAKAL Y. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Danışman: Doç. Dr. Ümit Özyılmaz, Aydın, 2025.

Domates bakteriyel benek hastalığı etmeni *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* geçmişten günümüze domates bitkilerinde ciddi derecede hastalığa neden olan bir patojendir. Tarım alanlarında bakteriyel etmenlere karşı en çok kullanılan kimyasal olarak bakırlı preparatlar önerilmektedir. Bu bakırlı preparatların her geçen gün sıklıkla kullanımı bakterilerde duyarlılık azalışına neden olarak dirençli bireylerin ortaya çıkmasına neden olmuş ve bakırlı preparatların etkisizliği ile sonuçlanmıştır. Bu durum bir sorun haline gelmiş olup kimyasal mücadeleye alternatif yollar aranmaktadır. Bu alternatif mücadele yöntemleri içinden en çok dikkat çekenlerden biri de biyolojik mücadeledir. Bu doğrultuda 2024 yılı Nisan ve Mayıs aylarında domates tarlalarına yapılmış arazi çıkışları ile sağlıklı bitkiler laboratuvara getirilerek antagonist bakteri izolasyonu yapılmış ve bu izolatların hastalık etmenine olan durdurucu etkileri ilk önce ikili kültür testleri ile araştırılmıştır. Hastalığa olan durdurucu etkinliği ortaya koyulan antagonist bakterilere; tanılama, bazı etki mekanizmalarının belirlenmesi ve bakıra duyarlılık oranlarının saptanması açısından testler yapılmıştır. İklim odasında yürütülen çalışmalarda ise, daha önceden yapılan tüm testler değerlendirilerek seçilmiş olan 3 etkili antagonistin (CBEK3, C2EK6 ve C2NK3) bakır varlığında ve yokluğunda hastalık etmenine olan etkileri farklı kombinasyonlar ile domates fideleri üzerinde denenmiştir. Uygulamalar sonucu bakır oksiklorid %84 oranında bir etki gösterirken, bakır varlığında hastalık etmenine en çok etki gösteren %83 oranında C2EK6 bakterisi, daha sonra %79 oranında CBEK3 bakterisi, en son olarak C2NK3 bakterisi etki göstermiştir. Bakır yokluğunda ise en fazla C2NK3 bakterisi %72 oranında, C2EK6 bakterisi %67 oranında ve CBEK3 bakterisi %39 oranında hastalık etmenine etki göstermiştir.

Anahtar kelimeler: Domates, Antagonist bakteri, Bakır dayanıklılığı, Biyolojik mücadele, Bakteriyel benek hastalığı.



ABSTRACT

BIOLOGICAL CONTROL OF BACTERIAL SPECK OF TOMATO (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) USING COPPER TOLERANT ANTAGONIST BACTERIA

**SAKAL Y. Aydın Adnan Menderes University, Graduate School of Natural and
Applied Sciences, Department of Plant Protection, Master's Thesis, Supervisor:
Doç. Dr. Ümit Özyılmaz, Aydın, 2025.**

The causal agent of bacterial speck disease in tomato, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, has long been recognized as a serious pathogen causing significant disease in tomato plants. Copper-based formulations are the most widely recommended chemicals against bacterial pathogens in agricultural areas. However, their frequent use has led to decreased bacterial sensitivity, the emergence of resistant strains, and ultimately the loss of efficacy of copper treatments. This situation has become a major problem, leading to the search for alternative control methods. Among these alternatives, biological control has attracted considerable attention. In this context, field surveys were carried out in tomato fields in April and May 2024, and healthy plants were brought to the laboratory for the isolation of antagonist bacteria. The inhibitory effects of these isolates against the pathogen were first tested using dual culture assays. Antagonist bacteria that showed inhibitory activity were further analyzed for identification, assessment of their modes of action, and evaluation of copper sensitivity. In growth chamber experiments, three effective antagonists (CBEK3, C2EK6, and C2NK3), selected based on previous tests, were evaluated on tomato seedlings under various combinations, both in the presence and absence of copper. As a result, copper oxychloride showed 84% effectiveness. In the presence of copper, the strongest inhibitory effect was observed with strain C2EK6 (83%), followed by CBEK3 (79%), and finally C2NK3. In the absence of copper, the strongest effect was observed with C2NK3 (72%), followed by C2EK6 (67%) and CBEK3 (39%).

Key words: Tomato, Antagonist bacteria, Copper resistance, Biological control, Bacterial spot disease.



1. GİRİŞ

İnsanoğlunun varoluşundan bu yana diğer canlılarda olduğu gibi önemli temel ihtiyaçlarından bir tanesi beslenmedir (Yüksek, 2018). Artan dünya nüfusuyla birlikte gıda ihtiyacı da sürekli artmaktadır (Kiracı ve Karataş, 2015). Bu ihtiyacın artmasıyla bitkisel üretimde doğrudan ya da dolaylı olarak birçok sorunu beraberinde getirmiştir. Tarım alanlarının azalması, bilinçsiz ilaçlama, gübreleme ile toprak kirliliği ve verimsizleşme, yüksek dozda ya da yanlış kullanılan bitki koruma ilaçlarının oluşturduğu fitotoksisite riski, hastalık ve zararlıların kullanılan ilaçlara zamanla dayanıklılık oluşturması, bitki gelişimini etkileyen canlı ve cansız çevre faktörlerin etkisi, su kaynaklarının kirlenmesi gibi birçok neden bitkisel üretimi etkilemektedir (Arvas, 2017). Bu sorunları gidermek ve iyileştirmek amacıyla insan sağlığına dost çevreyle uyumlu, bitkiyi korumaya yönelik tarımsal uygulamalar daha önemli hale gelmektedir.

İnsan beslenmesinde önemli bir yere sahip olan domates bir sıcak iklim bitkisidir. Soğuk hava koşulları altında gelişim göstermez. Gelişimi için en uygun sıcaklık 22-26 °C'dir. 14 °C'nin altındaki sıcaklıklarda gelişimi yavaşlar, sıfır derecenin altında ise gelişimi durur. Örtü altı yetiştiriciliğinde sıcaklık 24 °C'nin üzerine çıktığında ise seralar havalandırılmalıdır. Sera içerisindeki nem miktarı ise %65-70 olmalıdır. Güneşlenme süresi en az 6 saat olmalı ve doğrudan güneş almalıdır. Hava sıcaklığının yüksek fakat ışık yoğunluğu düşük ortamlarda domates bitkisi cılız gelişir ve bitki boyu uzun olmaktadır. Tam tersi durumda sıcaklık miktarının düşük, ışık yoğunluğunun fazla olduğu ortamlarda ise bitkinin büyümesi yavaşlar ve meyve dökülmeleri gerçekleşmektedir (Anonim, 2025). Toprak isteği bakımından seçici olmayan bir bitkidir. Birçok toprak tipinde kolaylıkla yetişmektedir. Hava ve su tutma kapasitesi bakımından iyi, tuzluluk oranı yüksek olmayan, derin, geçirgen, organik madde miktarınca zengin, pH aralığı 5-7 arasında olan topraklarda en iyi gelişimi göstermektedir.

Domateste kullanılacak çeşit belirlenirken verimli, kaliteli bitki çeşidi, yetiştirildiği dönem, yetiştirildiği bölgedeki hastalık ve zararlıların durumu, pazar isteği gibi birçok etken göz önünde bulundurulmalıdır. Genellikle çeşit seçilirken hastalık ve zararlılara karşı dayanıklı çeşitler seçilmektedir. Bu çeşitler arasında hibrit çeşitleri ön plana çıkmaktadır.

Domates kullanımı bakımından taze olarak tüketildiği gibi sos, püre, ketçap, salça yapımında da kullanılmaktadır (Al Remi vd., 2018). İçeriğinde zengin mineral, vitamin bulundurmasıyla ve önemli bir lif kaynağı olmasıyla da en çok tüketilen sebzelerden biridir (Kaya vd., 2022). FAO (Food and Agriculture Organization; Gıda ve Tarım Örgütü (2023) verilerine göre dünyada en çok domates üretim alanı bakımından Türkiye; Çin, Nijerya, Hindistan'dan sonra 4. sıradadır. 2023 yılı dünyada en çok domates üretim alanına sahip ilk on ülke Çizelge 1.1.'de verilmiştir. Dünyada en çok üretim miktarına sahip ülkelerden biri olan Türkiye; Çin, Hindistan'dan sonra 3. sıradadır. 2023 yılı dünyada en çok domates üretim miktarına sahip ilk on ülke Çizelge 1.2.'de verilmiştir (FAO, 2023). Türkiye salçalık ve sofralık domates üretimi ve ekim alanı miktarları Çizelge 1.3'te verilmiştir (TÜİK, 2024). Çizelge 1.4'de Türkiye'de illere göre sofralık ve salçalık domates ekim alanı verilmiştir. Çizelge 1.5'te Türkiye'de illere göre sofralık ve salçalık domates üretim miktarı verilmiştir.

Çizelge 1.1 2023 yılı dünyada en çok domates üretim alanına sahip ilk on ülke (ha) (FAO, 2023).

Ülke	Alan miktarı (ha)
Çin	1.156.408
Nijerya	1.097.111
Hindistan	849.000
Türkiye	166.323
Mısır	155.874
Amerika	122.135
İtalya	99.000
Meksika	89.637
Rusya	78.272
Angola	74.706
:	:
Toplam	5.411.824

Çizelge 1.2 2023 yılı dünyada en çok domates üretim miktarına sahip ilk on ülke (ton) (FAO, 2023).

Ülke	Üretim miktarı (milyon ton)
Çin	70.119.693
Hindistan	20.425.000
Türkiye	13.300.000
Amerika	12.370.057
Mısır	6.211.016
İtalya	6.016.050
Meksika	4.394.807
Brazilya	4.166.017
İspanya	3.968.460
Nijerya	3.803.598
:	:
Toplam	192.317.973

Çizelge 1.3 2024 yılı Türkiye domates ekim alanı ve üretimi (TÜİK, 2024)

Ekilen alan (sofralık) (da)	2022	984.391
	2023	958.116
	2024	1.004.397
Ekilen alan (salçalık) (da)	2022	602.800
	2023	705.118
	2024	818.847
Üretim miktarı (sofralık) (ton)	2022	7.954.856
	2023	7.749.152
	2024	8.111.400
Üretim miktarı (salçalık) (ton)	2022	5.045.144
	2023	5.550.848
	2024	6.505.600

Çizelge 1.4 Türkiye’de illere göre sofralık ve salçalık domates ekim alanı (TÜİK, 2024)

Sofralık domates ekim alanı (dekar)		Salçalık domates ekim alanı (dekar)	
Antalya	170.404	Bursa	181.331
Mersin	59.623	Manisa	130.578
Çanakkale	50.372	İzmir	114.769
Konya	38.642	Konya	102.630
Muğla	37.480	Balıkesir	78.726
Şanlıurfa	34.220	Niğde	48.990
Bitlis	33.782	Şanlıurfa	32.770
Bursa	29.760	Çanakkale	25.965
İzmir	29.472	Karaman	8.935
Ankara	28.568	Elazığ	7.991

Çizelge 1.5 Türkiye’de illere göre sofralık ve salçalık domates üretim miktarı (TÜİK, 2024).

Sofralık domates üretim miktarı (ton)		Salçalık domates üretim miktarı (ton)	
Antalya	2.624.200	Bursa	1.537.492
Mersin	718.849	Manisa	1.120.064
Muğla	464.064	İzmir	918.829
Çanakkale	391.817	Balıkesir	760.229
Burdur	293.366	Konya	735.214
Bitlis	219.719	Niğde	477.090
Konya	213.096	Çanakkale	207.691
Şanlıurfa	206.304	Şanlıurfa	188.262
Bursa	187.440	Karaman	57.315
İzmir	186.830	Kayseri	55.535

Ekonomik bakımdan bu kadar önemli olan domates bitkisinde verim ve kaliteyi etkileyen kuşkusuz birçok faktör vardır. Bunlar biyotik ve abiyotik faktörler olarak karşımıza çıkmaktadır. Abiyotik faktörler olarak; kuraklık, tuzluluk, sıcaklık, donma, nem, pH, ultraviyole ışınları, ağır metaller bitkiyi etkileyen çevresel faktörlerdir. Biyotik faktörler olarak; bakteriler, funguslar, virüsler, zararlılar, yabancı otlar gelmektedir. Bitkilerde tahribata neden olan hastalık etmenlerinin içerisinde önemli bir yere sahip olan

fitopatogen bakterilerin etkisi fazlasıyla görülmektedir. Bakteriyel hastalık etmenleri domates bitkisinde, iletim demeti solgunları, yumuşak çürüklükler, yaprak ve meyvelerde leke ve nekrozlar, sürgünlerde kurumalara neden olmaktadır. Özellikle Bakteriyel Benek Hastalığı domates tarlalarında en sık rastlanılan hastalık olarak bilinmektedir. Bundan dolayı üzerinde en çok çalışılan hastalık olarak karşımıza çıkmaktadır (Saygılı vd., 2008).

Domates bakteriyel benek hastalığı (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) etmeni gram negatif, mikroskop altında çubuk şekilde görünen, aerobik, UV altında floresan pigment veren, bitkilerde epifitik olarak bulunan bir bakteridir (Saygılı vd., 2006). Domates bitkisinde oldukça tahripkar olan hastalık etmeni, patlıcan ve biberde de hastalığa neden olmaktadır. Hastalık etmeni tohum kaynaklı bir patojen olup tohum dışında toprakta ve toprakta kalan bitki artıkları üzerinde yaşamını 1 yıl devam ettirebilmektedir. Bitkiye giriş yolları bitkide açılan yaralar ve doğal açıklıklardır (Agrios, 1997). Etmen fide ve tohumla taşınmaktadır. Bununla beraber tarım aletleri, sulama suyu, budama ve insan ile de taşınabilmektedir. Düşük sıcaklık, serin, nemli ve rüzgarlı havalarda hastalığın gelişmesi daha hızlı olmaktadır. Etmenin bitki ile teması halinde 8-10 gün içerisinde belirtiler ortaya çıkmaktadır.

Etmen daha çok bitkinin toprak üstü aksamını etkilemektedir. Genç bitkiler yaşlı bitkilere göre daha çok etkilenmektedir. Yaprak, sap, çiçek ve meyve saplarında tipik olarak sarı renk açılmaları görülmektedir. Bu renk açılmaları zamanla kahverenginden siyaha dönüşen, önce küçük, yuvarlak, koyu renkli, daha sonra ise birleşerek benekleri ortaya çıkarmaktadır. Beneklerin etrafında sarı renkli haleler göze çarpmaktadır. Benekler yüzeysel kabarcıklar şeklinde oluşmaktadır. Meyvedeki en tipik belirtisi ise 1 mm'yi aşmayan küçük, yüzeysel, kabarık beneklerdir.

Hastalık etmeniyle mücadelede kültürel önlem olarak: temiz ve dayanıklı tohum kullanılmaktadır. Fidelik ve seralar sık sık havalandırılmalı, hastalıklı bitki artıkları yok edilmelidir. Fide döneminde görülen hastalıklı bitkiler köklenerek uzaklaştırılmalıdır. Hastalığın görüldüğü alanlarda 1 yıllık ekim nöbeti uygulanmalıdır. Kimyasal mücadele bakımından fidelik ya da tarlada ilk belirtiler görülür görülmez 8 – 10 gün ara ile 2 – 3 defa ruhsatlı ilaçlar ile uygulama yapılmaktadır (Agrios, 1997). Hastalık etmenine karşı bakırlı bileşikler uygulanabilir. Bakırlı preparatlar koruyucu özellik gösterdikleri için genel olarak hastalığın diğer bitkilere yayılmasını engellemekte kullanılmaktadır (Loh ve Martin, 1995). *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* etmenine karşı Türkiye'deki ruhsatlı preparatlar aşağıda verilmiştir (Anonim, 2025).

- %50 metalik bakıra eşdeğer bakır oksiklorid
- %50 metalik bakıra eşdeğer bakır hidroksit
- 51,4 g/l metalik bakıra eşdeğer yağ ve rosin asitlerinin bakır tuzları
- 190 g/l metalik bakıra eşdeğer tribazik bakır sülfat
- 222,5 g/l tea tree oil

Bakteriler stres faktörleri karşısında yaşamlarını devam ettirebilmek için birtakım tepkiler vermektedir. Bakterilerin içinde bulunduğu baskılayıcı çevre faktörleri, mikroorganizma üzerinde farklı inaktivasyon etkileri oluşturabilmektedir. Mikroorganizma yaşamı için gerekli olan herhangi bir dış etkenin eksikliği veya fazlalığı canlının mikrobiyal gelişme hızının düşmesine neden olur (Langsrud vd., 2003). Mikroorganizmalar stres faktörlerinden etkilenmemek için doku, organel fonksiyonlarında değişimler başlatarak iç denge denilen homeostasis sürecinde sapmalar meydana gelmektedir. Bu değişimler mikroorganizmadan mikroorganizmaya değişiklik gösterse de tüm canlılarda gözlemlenen tepkisel ortak bir davranış olarak nitelendirilmektedir (Dönmez vd., 2006; Özbey, 2014).

Literatürde mikroorganizmalar üzerinde fazla miktarlardaki toksik etki yaratan metaller ağır metal olarak isimlendirilmektedir (Özbolat ve Tuli, 2016). Bir mikroorganizmanın yaşamını devam ettirebilmesi için dışarıdan alınması gerekli olan metaller: kalsiyum, bakır, krom, demir, sodyum, potasyum, magnezyum, manganez, nikel, çinkodur (Rajendran vd., 2003). Dışarıdan alınması mühim olan esansiyel metallerin işlevleri; biyokimyasal tepkimeleri katalizlemek, protein yapısını ve hücre duvarı yapısını stabilize etmek, gen ekspresyonunu düzenlemek, ozmotik iç dengeyi korumak, aktivasyon enerjisini başlatmak gibi işlevleri vardır (Ehrlich, 1997; Bruins vd., 2000). Zorunlu metallerin mikroorganizmadaki yüksek konsantrasyonu toksik etki yaratırken, zorunlu olmayan metaller yüksek konsantrasyon olmasa dahi toksik etki gösterdiği saptanmıştır (Silver, 1998; Bruins vd., 2000; Sandrin ve Maler, 2003; Gülcan, 2006).

Bakır, doğada bol bulunan mikroorganizmalar için gerekli esansiyel elementlerden bir tanesidir. Gerek tek hücreli gerekse çok hücreli canlıların metabolizması için oldukça önemlidir. Çeşitli işlevleri olan bakırın yaklaşık 30 adet enzimin içeriğinde bulunmaktadır (Kiaune ve Singhasemanon, 2011; Favier, 1998). Bakır, sanayide elektrik

iletiminde, boya endistürisinde kullanıldığı gibi veterinerlikte ve tarımda fungusit olarak kullanılmaktadır.

Bakırın mikroorganizmadaki ihtiyacı diğer taraftan toksik etkisi göz önüne alındığında, mikroorganizmalar bakırı kendileri için sınırlı bir seviyede tutmak için hassas mekanizmalarla bakırın iç dengeyi bozmadan yeterli seviyede kalmasını sağlarlar (Cooksey, 1990). Bakteriler için kritik bir etkiye sahip olan bakıra karşı kendilerini korumak için çeşitli direnç mekanizmaları geliştirmişlerdir.

Evrimsel olarak değerlendirildiğinde, bakterilerdeki direnç oluşumu plazmid kaynaklı ya da mutasyonel olabileceği saptanmıştır (Munita ve Arias, 2016). Direnç, mikroorganizmanın homeostazisini yavaşlatmaya ya da tamamen durdurmasına yönelik antimikrobiyal bir maddeye karşı bir mikroorganizmanın gösterdiği tepkidir. Bunun dışında bakteri DNA'sında meydana gelen rastgele değişimler sonucu bakterilerde mutasyonel dirence neden olmaktadır (Verraes vd., 2013). Direnç mekanizmaları mikroorganizmaların hayatta kalmak için sürekli değişen çevreye cevap vermek zorunda oldukları araçlardır (Bridier vd., 2011; Araujo vd., 2011).

Direnç yolları, doğal olarak (fenotipik) veya kazanılmış (genotipik) olarak ikiye ayrılır. Doğal direnç diğer bir değişle içsel direnç, mikroorganizmanın kalıtsal özelliklerinden dolayı kendisi için toksik olan antimikrobiyal maddelere gösterdiği dirençtir. Plazmid kaynaklı dirençte ise yatay gen transferi aracılığıyla direnç meydana gelmektedir. Plazmid kaynaklı bu dirençte gendeki değişiklik aynı bakteriye ya da farklı türlerdeki bakterilere aktararak meydana gelmektedir (Bridier vd., 2011; Araujo vd., 2011).

Bakterilerin bakırlı preparatlara karşı geliştirmiş oldukları farklı direnç yolları:

1. Kullanılan ilacın inaktivasyonu ile oluşan direnç,
İlacın direkt olarak inaktivasyonu kategorisinde incelenen bu savunma mekanizmasında, hedef bölgeye bağlanmadan bakteri tarafından salgılanan enzimler aracılığıyla kullanılan ilacın hidrolize edilmesidir (Bonnet, 2004).
2. Hedef molekülün değişmesi sonucu oluşan direnç,
Bir ilacın etki edebilmesi için hücredeki hedef bölgeye bağlanması gerekmektedir. Bu hedef bölgelerindeki değişiklikler sonucu bağlanma gösteremez. Bu

bölgelerdeki değişiklikler ile bağlanma potansiyeli düşük olan farklı bir gen kazanmasıyla hedef bölge değişmiş olabilir (Lambert, 2005).

3. Aktif pompa sistemleri ile bakırın periplazmik boşluğa atılması,
Hücre zarında bulunan efflux pompa sistemleri ile bakır moleküllerinin hücre içinden periplazmik boşluğa atılmasını sağlayan membran proteinleri ile hücre içi bakır seviyesini en aza indirgenmesi ile oluşur (Nikaido, 1994).
4. Hücre duvarı permeabilite değişimi sonucu oluşan direnç,
Dış membran geçirgenlik değişimi sonucu gelişen bu direnç tipinde ilacın hücre içine girişi sınırlandırılması ile oluşmaktadır. Hücre duvarında bulunan porin proteinleri ile ilaç geçişinin yavaşlatılması ile oluşmaktadır (Nikaido, 1994).

Bitki hastalıklarını kontrol etmek amacıyla kullanılan bakırlı preparatlar, ağır metallerin uzun süreli kullanımı, bakıra dirençli izolatların gelişmesine neden olmaktadır (Sundin vd., 1989; Zhang vd., 2017). Bu durum bitki hastalık etmenleri ile mücadeleyi zorlaştırmakta birlikte kullanılan tarım ilaçları da insan ve çevre sağlığına doğrudan ya da dolaylı olarak olumsuz şekillerde etki etmektedir. Bu nedenle alternatif yollar içerisinde biyolojik mücadele en dikkat çeken yöntemler arasındadır. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* etmenine karşı bakırlı preparatlar kullanılmaktadır, fakat etmen zaman içinde direnç kazanabilmektedir. Bu çalışmada domatesin en önemli hastalıklarından biri olan Domates Bakteriyel Benek Hastalığına karşı biyolojik mücadele olanakları araştırılmıştır. Bu kapsamda hastalığa etkili antagonistlerin aranması sırasında bu antagonistlerin de bakıra dayanımları göz önünde bulundurulmuştur. İzole edilen biyolojik savaş ajanları içerisinde seçim yaparken bakıra tolerans gösterebilecek antagonist bakterilerin seçimi yönünde bir çalışmadır. Böylece arazide bakır uygulanması durumunda antagonistler etkilenmeyecek, hastalık ile mücadeleye yardımcı ya da alternatif olacaktır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Marco ve Stall (1983) yaptıkları çalışmada bakır direnci gösteren bakteriyel leke hastalığı etmeni *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*'nın kontrolünü araştırılmıştır. *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*'nın izolatlarında bakıra karşı direnç farklılıkları tespit edilmiştir. Çalışmada hazırlanan bakır çözeltileri 7,0 – 7,5 pH aralığında yapılmıştır. Süspansiyonlardaki bakır miktarı 1-2 mg/L'dir. Bakır süspansiyonuna mancozeb eklenmesi çözünür bakırı 13 mg/L'e çıkarmıştır. Bakıra duyarlı izolatlar her iki çözeltilde de ölmüştür, ancak bakıra dirençli izolatlar daha yüksek bakır konsantrasyonunda ölmüştür. Tarla koşulları bakımından değerlendirildiğinde bakır ve mancozeb karışım uygulamaları bakterilerin duyarlı izolatlarının yanı sıra dirençli izolatları da kontrol altına aldığı saptanmıştır.

Cooksey (1986) yaptığı çalışmada 20 adet *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* izolatının plazmid DNA'sının bakteriler arasında gen transferi yollarından biri olan konjugasyon ile gen aktarımının direnç gelişimine etkisi bakımından incelenmiştir. Pst (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) plazmidleri büyüklük açısından 5 gruba ayrılmıştır. A sınıfı 95 ila 103 kilobaz (kb) arasında; B sınıfı 71 ila 83 kb arasında değişmekte; C sınıfı 59 ila 67 kb arasında değişmekte; D sınıfı 37 ila 39 kb arasında değişmekte ve E sınıfı 29 kb olduğu saptanmıştır. Tüm izolatlar, A ve B sınıflarında en az iki plazmid içermiştir. Üç izolatta *P. syringae* pv. *tomato* plazmidlerinin konjugatif kabiliyeti, konjugatif olmayan plazmid RSF1010'un *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* alıcılarına hareketi ile gösterilmiştir. Üç konjugatif izolatın plazmidleri Tn5 ile belirlenmiştir. Dört konjugatif plazmid, *P. syringae* pv. *syringae* alıcılarına tekrar tekrar aktararak tanımlanmıştır. *P. syringae* pv. *tomato* izolatlarının bakır sülfata (CuSO_4) duyarlılığı değişmiştir. MIC değerleri hassas izolatlar için 0,4 ila 0,6 mM, orta derecede dirençli izolatlar için 1,2 mM ve çok dirençli izolatlar için 1,6 ila 2,0 mM olduğu saptanmıştır. Çok dirençli bir tür olan PT 23, bakır direnci genini verici olarak işlev görmüştür. Alıcı olan *P. syringae* pv. *syringae* izolatları PS51 ve PS61 0,1 mM CuSO_4 ile inhibe edilirken, PS51 (pPT23A) ve PS61 (pPT23C) transkonjügan izolatları için CuSO_4 MIC değerleri sırasıyla 1,8 ve 2,6 mM olduğu saptanmıştır. *P. syringae* pv. *tomato* izolatları PT12.2 ve PT17.2 0,6 mM bakır sülfat ile inhibe edilmiş ancak bakır sülfat MIC değeri, pPT23C'yi aldıklarında sırasıyla 2,6 ve 1,8 mM olduğu saptanmıştır. Bu nedenle, PT23'teki bakır

direnci, pPT23A (101 kb) ve pPT23C (67 kb) olarak adlandırılan iki konjugatif plazmid tarafından kontrol edildiği görülmüştür.

Trevors (1987) bakterilerde bakır direnci konusunda yazmış olduğu makalesinde bakırın birçok mikroorganizma için gerekli olduğunu vurgulamak ile birlikte bakteriler üzerinde engelleyici etkisinden de söz etmiştir. Buna istinaden bazı bakteri türlerinin yüksek bakır seviyelerine tolerans gösterdiğini ortaya koymuştur. Örnek olarak bakır direncinin *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* gibi mikroorganizmalarda plazmid kodlu olduğunu bildirmiştir.

Cooksey (1988) yaptığı çalışmada bakırlı preparatların etkisiz olduğu *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* etmenine karşı etmenin nonpatojenik Tn5 mutanı ve bakırlı bileşiklerin kombinasyonu ile biyolojik kontrol sağlamayı amaçlamıştır. Sera koşullarında Tn5 verilen bitkilere ayrıca patojen inokulasyonu yapıldığında leke oluşumunu ciddi derecede azalttığı gözlemlenmiştir. Ayrıca bitkilere bakıra dirençli Tn5, bakır ve bakıra duyarlı bir patojen inokulasyonu durumunda leke oluşumunu azalttığı saptanmıştır. Bitkilere uygulanan kombinasyonlarda Tn5 mutanın ilaçlı ve ilaçsız etki değerlendirmesi sonucunda ilaç ile birlikte kullanımı leke oranını ciddi şekilde düşürdüğü saptanmıştır.

Andersen vd. (1991) Kaliforniya'daki meyve ağaçlarından izole edilen *Pseudomonas syringae* izolatlarının yaklaşık %40'ı 0,32 mM CuSO₄ içeren besi yerinde gelişmiştir. İzolatların yarısından fazlası oldukça duyarlı olsa da bazı izolatlar besi ortamında 1,12 mM'a kadar bakır sülfatı tolere ettiği saptanmıştır. Besi ortamında bakıra toleranslı izolatların ölümcül olmayan bakır konsantrasyonlarına direnç gösterebilmesi, bakıra direnç gösteremeyen izolatlara kıyasla daha yüksek bakır konsantrasyonlarında kalabilen izolatların oranını 1000 kat arttırdığı saptanmıştır. Sulu bakır çözeltilerindeki (23 ppb Cu⁺²) bakıra dirençli izolatların ortalama yarısı daha önceden bakıra maruz kalmayan izolatların besi ortamında incelenmesiyle bakıra duyarlı izolatların (4,7 ppb) yaklaşık 5 katı olduğu görülmüştür. Bakıra dirençli izolatların yarısı lmcl CuSO₄ ortamında yetiştirildiğinde direnci 160 ppb'ye yükselmiştir. *Pseudomonas syringae*'nin bakıra dirençli izolatları Cu(OH)₂ bulunan yapraklarda, bulunmayan yapraklarda olduğu kadar hızlı büyürken, hassas izolatlar çok az büyüme göstermiştir.

Cooksey vd. (1993), yaptıkları çalışmada bir narenciye bahçesi toprağından izole edilen bakıra dirençli *Pseudomonas fluorescens* izolatı (09906), *Phytophthora* kök

çürüklüğü için biyolojik kontrol ajanı olarak araştırılmıştır. Bu çalışmada kullanılan bakteri izolatları *Pseudomonas fluorescens*'e ait olan 09906 (vahşi tipi) ve 09906.1, 09906.2, 09906.3, 09906.4 Tn5 mutantları kullanılmıştır. MIC değerleri belirlenen bakteriler ile etkinliklerinin değerlendirilmesi açısından 3 farklı deneme yapılmıştır. Vahşi tip *P. fluorescens* 09906 için bakır sülfatın MIC değeri 1,6 mM olarak bulunmuştur. Tn5 izolatlarından 3'ü, 1,2 mM CuSO₄ içeren MGY besi ortamında büyümemiştir. İki mutant, bakıra vahşi tipten 10 kat daha duyarlı olduğu, bir mutantın ara duyarlı olduğu belirlenmiştir.

Griffin (2018) Avustralya'da ciddi sorun oluşturan *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*'ya karşı bakır toleransı ve bakır etkinliği çalışmaları ile çok çeşitli verileri dikkate alarak bir derleme yapmıştır. Yaptığı literatür taramalarında bakırlı preparatın kullanıldığı ortam, bakır tolerans eşikleri, pH dengesinin farklı çalışmalardaki tutarsızlıklarını ortaya koymuştur. O güne kadar, *P. syringae* pv. *tomato*'da bakır toleransında pH dengesi üzerine yayınlanmış bir çalışma mevcut olmadığını saptamıştır. Bakır toleransındaki pH dengesini veya pH'ın bakır toleransındaki biyolojik uygunluğunu saptamak, bakır kullanılan hastalık etmenleriyle mücadelesinde kolaylık sağlayabileceği bu çalışma kapsamında ileri sürülmüştür.

Cazorla vd. (2002) yaptıkları çalışmada İspanya ve Portekiz'de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* etmeninin mango ağaçlarında neden olduğu bilinen bakteriyel uç nekrozu hastalığının meyve üretimini sınırlandırdığını saptamışlardır. Kontrolsüz bakırlı preparat uygulamaları nedeniyle Pss (*Pseudomonas syringae* pv. *syringae*) izolatları bakır direnci açısından incelenmiş ve bunun sonucunda izolatların %59'nun bakır sülfata dirençli olduğu belirlenmekle birlikte çoğu bakıra dirençli izolatların plazmidin konjugasyon yoluyla aktarımı sonucu direnç kazandığı saptanmıştır.

Zhang vd. (2017) 2009 ve 2010 yıllarında Florida, eyaletinde yoğun bakır kullanılan fasulye tarlalarından toplanan örneklerden toplam 35 adet *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* izolatı izole edilmiştir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlara göre, sıvı NB ortamında 24 saatlik inkübasyondan sonra bakteri popülasyonlarına dayanarak izolatların %80'inin (35'ten 28'i) bakıra dirençli olduğunu saptamışlardır. Sera uygulamaları ile elde edilen verilere göre mancozeb kullanımıyla birlikte, bakıra dirençli Psp izolatlarının neden olduğu fasulye hale yanıklığının mücadelesinde bakır hidroksitin etkinliğini arttırdığını saptamışlardır.

Benlioğlu ve Benlioğlu (1998) yaptıkları çalışmada uzun yıllar boyunca bakırlı preparat kullanılan örtü altı ve tarla üretimi yapılan domates alanlarından izole ettikleri 35 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* izolatı ile bakır sülfata (CuSO_4)'a duyarlılıkları için bakteri gelişmesini engelleyen en küçük doz (MIC) değerlerini, 5 duyarlı izolat için 0,2 – 0,4 mM arasında, 6 izolat için 0,6 – 1,2 mM, 19 izolat için 1,2 – 2,4 mM, 5 yüksek derecede dayanıklı izolat içinde >2,8 mM saptayarak etmenin dirençliliğini ortaya koymuşlardır.

Mirik vd. (2007) yaptıkları çalışmada Adana ve Osmaniye'de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* etmeninin neden olduğu bakteriyel leke hastalığının yaygın olarak görüldüğünü bildirmişlerdir. Yapılan gözlem ve araştırmada bakırlı preparatların biber tarlasında hastalık üzerinde etkili olmadığı saptanmıştır. Bu alanlardaki hastalıklı bitki örneklerden 67'sinin *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* etmenine ait olduğu belirlenmiş ve bu izolatlara yapılan testler sonucunda 67 izolatın tamamının bakır sülfata toleranslı olduğu, %7'sinin ise streptomisine dirençli olduğu saptanmıştır.

Eğerci vd. (2021) yaptıkları çalışmada bitki patojeni bakterilerin oluşturduğu hastalıklara karşı yoğun olarak kullanılan bakırlı preparatların giderek etkisiz kalması nedeniyle, laboratuvar stoklarında bulunan 33 bakteri izolatının farklı bakırlı preparatlara duyarlılıklarının tespiti için bir çalışma yapmışlardır. İlk olarak bakır sülfata duyarlılıkları belirlenen bakterilerin ED_{50} değerleri 0,55 $\mu\text{g/ml}$ ile 1,3 $\mu\text{g/ml}$ ve MIC değerleri 0,7 mM ile 7 mM saptanan 6 izolat farklı bakırlı preparatlarla test edilmiştir. ED_{50} ve MIC değerlerine bakıldığında sıvı bakır sülfat ve nano bakır preparatlarına karşı izolatların duyarlı olduğu saptanmıştır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

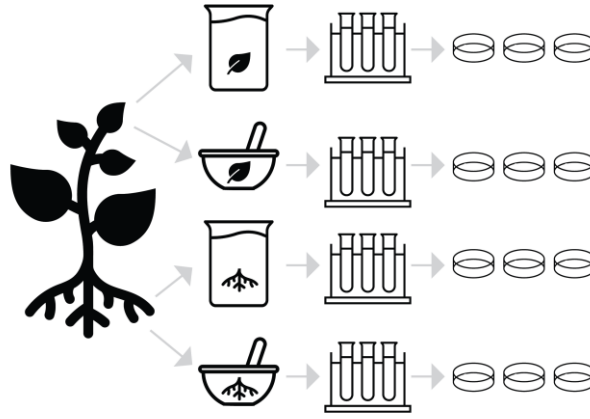
3.1. Materyal

Çalışmada kullanılan antagonist bakteriler Aydın ilinde 10 domates tarlası gezilerek toplanan sağlıklı bitkilerin kök ve yapraklarından izole edilerek temin edilmiştir. Hastalık etmeni ise laboratuvar stoğundaki pt22 (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) (Benlioğlu ve Benlioğlu, 1998) bakterisinin reizolasyonu ile elde edilmiş olan rpt22 izolatı kullanılmıştır. Çalışma esnasındaki tüm araç gereç, kimyasallar Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Bakteriyoloji Laboratuvarından temin edilmiştir. Çalışma 26 °C’de 16 saat ışık, 8 saat karanlık fotoperiyotlu iklim odasında yürütülmüş, domates çeşidi olarak H2274 çeşidi kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan pozitif kontrol olarak *Pectobacterium carotovorum* (Ecc 133), *Serratia plymuthica* (HRO-C48) (Kurze vd., 2001), *Pseudomonas fluorescens* (U1 ve U26) bakterileri kullanılmıştır.

3.2.Yöntem

3.2.1. Antagonist bakteri izolasyonu

Nisan – Mayıs aylarında (2024) 10 domates tarlasından sağlıklı bitkilerden birer örnek alınarak laboratuvarda antagonist bakterilerin izolasyonu yapılmıştır. Aydın’ın ilçelerinden olan Ortaklar’ dan 3 adet, Çine’den 3 adet, İncirliova’dan 3 adet ve Koçarlı’dan 1 adet sağlıklı bitki örnekleri şeffaf naylon torbalara konularak laboratuvara getirilmiştir. Araziden gelen bitkilerden hem kök hem yaprak bölgesinden steril bistüri yardımıyla 1’er gram bitki dokusu alınarak hem endofitik hem de epifitik bakteri izolasyonu yapılmıştır (Şekil 3.1).



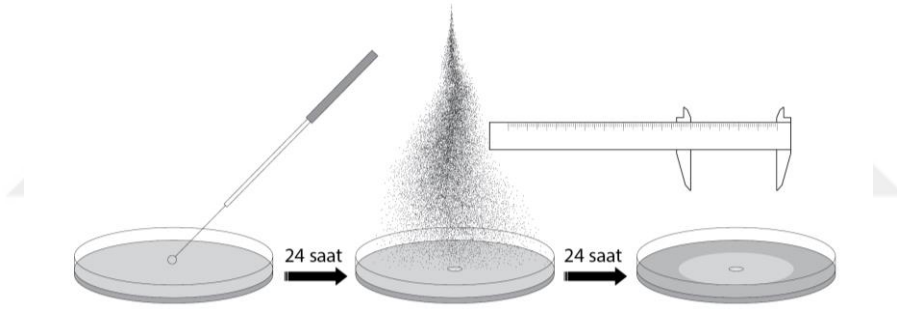
Şekil 3.1. Antagonist bakteri izolasyonu iş akış şeması.

Endofitik bakteri izolasyonu için kökten ve yapraktan alınan bitki dokuları ilk olarak %2'lik sodyum hipklorid (NaClO) içerisinde 2 dakika bekletilmiş, ardından üç kere steril saf su ile durulanmıştır. Durulanan bitki parçaları kurutma kağıdında kurulanmıştır. Steril havan içerisinde 5 ml steril saf su ile ayrı ayrı hem kök hem de yaprak ezilerek bitki özsuğu çıkarılmıştır. Daha önceden hazırlanan ve içerisinde 4,5 ml su bulunan test tüplerine havandan mikropipet ile 500 μl alınarak ilk tüpe bitki özsuğu aktarılmış ve vorteksten geçirilmiştir. Daha sonra bu işlem iki kere daha tekrarlanarak 1/10 seyreltme serileri oluşturulmuştur. Bir gün önceden hazırlanan King B (KB) (King vd., 1954) besi yerine 50 μl alınarak damlatılmış ve steril baget ile besi yeri yüzeyine yayılmıştır. Petri kapları 25 °C'de 4 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır. 4 gün sonunda farklı renk ve şekil gösteren bakteriler ikili kültür yapılmak üzere saflaştırılmıştır.

Bitki dokuları epifitik bakteri izolasyonu için kökten ve yapraktan 1'er gram alınmıştır. 100 ml steril su bulunan beher içinde balık yardımıyla 5 dk karıştırılmıştır. Daha sonra beher içindeki sudan 500 μl alınarak içinde 4,5 ml su bulunan ilk tüpe aktarılmış vorteks ile karıştırılmıştır. Daha sonra bu tüpten tekrar 500 μl alınarak ikinci tüpe aktarılmış ve bu şekilde 4 adet 1/10 seyreltme serisi oluşturulmuştur. Tüpler vorteks ile karıştırıldıktan sonra seyreltme serisinin 3. ve 4. tüplerinden mikropipet ile 50 μl alınarak KB besi yerine damlatılmış ve steril baget ile besi yeri yüzeyine dağıtılmıştır. 25 °C'de 4 gün inkübasyondan sonra farklı şekil ve renkteki koloniler ikili kültür testi yapılmak üzere saflaştırılmıştır.

3.2.2. İkili kültür çalışmaları

Aydın'ın farklı yerlerinden getirilen bitki örneklerinden yapılan izolasyon sonucu elde edilen antagonist adayı bakterinin antimikrobiyal etkilerini belirlemek amacıyla bu test yapılmıştır. Bunun için King B besi yerinin ortasına antagonist adayı bakteriler nokta şeklinde ekilmiştir. Bir gün inkübasyondan sonra hastalık etmeninden McFarland 0,5 skalasına göre süspansiyon oluşturulmuş ve çok az miktarda püskürtülmüştür. Sadece hastalık etmeninin püskürtüldüğü petri kontrol olarak kullanılmıştır. Püskürtme yapılan petriler 25 °C'de 1 gün inkübasyondan sonra oluşan engelleme zonlarının çapı kumpas ile ölçülmüştür (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. İkili kültür testi aşamaları.

3.2.3. Antagonist bakterileri ön tanılama testleri

3.2.3.1. Oksidatif/Fermentatif (O/F) reaksiyon testi

Bu test bileşenleri için 0,1 g bacteriogenic pepton; 0,1 g $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$; 0,02 g KCl; 0,02 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,003 g bromothymol blue ve 0,3 g agar, 100 ml distile su içerisine ilave edilerek besi yeri hazırlanmıştır. Besi yerinin pH'sı 7,2'ye ayarlanmıştır. Ayrıca 50 ml'ye 5 g %10'luk glikoz çözeltisi hazırlanmıştır. Tüplere dağıtılan besi yeri ve hazırlanan glikoz çözeltisi 121 °C 15 dk otoklav edilmiştir. Otoklavdan çıkarılan besi yeri ve glikoz çözeltisi steril kabin içerisinde karıştırılarak 1 gün beklemeye bırakılmıştır. Bir gün sonunda NA besiyerinde 24-48 saat geliştirilen bakterilerden öze ile alınmış, 2 ayrı tüpün

dibine batırılarak bakteri ekimi yapılmıştır. Bir bakteri için iki tüp hazırlanmış ve ikinci tüplerin üzerine 1 ml steril mineral yağ ilave edilerek diğer tüp boş bırakılmıştır. Ekimi yapılan bakteriler 25 °C’de iki gün inkübasyona bırakılmıştır. İki gün sonunda sarı renk veren besi yerleri pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir. Pozitif kontrol olarak *Pectobacterium carotovorum* (Ecc 133) kullanılmıştır. Negatif kontrol olarak ise inokulasyon yapılmamış tüp bırakılmıştır (Bradbury, 1970).

3.2.3.2. Oksidaz testi

Oksidaz testi için %1 sulu tetra methyl-p- phenylendiamine dihydrochloride solüsyonu kullanılmıştır. Steril kabin içerisinde NA besi yerinde 24-48 saat gelişen bakteri kültürlerinden steril kürdan ile bir miktar alınarak Whatman No:1 filtre kağıdı üzerine küçük dairesel hareketlerle yayılmış ve test solüsyonu pastör pipeti ile alınarak bir damla yayılan yere damlatılmıştır. On saniye içerisinde mor renk oluşumu pozitif reaksiyon olarak değerlendirilmiştir (Kovacs, 1956).

3.2.3.3. Patates yumuşak çürüklük testi

Bakterilerin pektolitik aktivelerinin belirlenmesi amacıyla bu test uygulanmıştır. Kullanılacak olan patatesler soyulup alüminyum folyo kaplı tencerenin içerisinde üzerine %96’lık etil alkol dökülerek üzeri hafif kararana kadar yakılmıştır. Steril kabin içerisinde patates yumrularından kare şeklinde kesitler alınmıştır. Daha önceden hazırlanan steril cam petri içerisine steril kurutma kağıtları yerleştirilmiş vaziyette iken 500 µl steril su alınarak kurutma kağıtları nemlendirilmiştir. Üzerine patates kesitleri yerleştirilmiş ve öze ile bakteri inokülasyonu yapılmıştır. Yirmi beş derecede 1 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda patates dilimlerinde yumuşamaya neden olan bakteriler pozitif olarak değerlendirilmiştir. Pozitif kontrol olarak *Pectobacterium carotovorum* (Ecc 133) kullanılmıştır (Bradbury, 1970).

3.2.3.4. 37 °C’de gelişim testi

Antagonist bakterilerin 37 °C’de gelişiminin saptanması amacıyla bu test yapılmıştır. 37 °C’de gelişim için 10 ml’lik tüplere NA besi yeri hazırlanıp eğik agar oluşturulmuştur. Ayrıca bakterilerin 25 °C’de gelişimlerini gözlemek için ikinci bir tüp de hazırlanmıştır. NA besi yerinde geliştirilen 24 saatlik bakteri kültürlerinden iki tüp inokule edilmiş, tüplerden biri 37 °C’deki su banyosuna, diğeri de 25 °C’de 2 gün

inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda gelişimleri gözlenmiş ve kaydedilmiştir (Özyılmaz, 2007).

3.2.3.5. Tütünde aşırı duyarlılık testi

Tütünde aşırı duyarlılık testi için; PDA besi yerinde 24-48 saat gelişen kültürlerden hazırlanan 10^8 hücre/ml yoğunluğunda 5 ml'lik bakteri süspansiyonları tütün yapraklarının damar aralarına steril enjektör yardımıyla enjekte edilmiş ve 1 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra enjekte edilen kısımda meydana gelen açık krem renkli ölü doku belirtisi pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Klement, 1968). Pozitif kontrol olarak rpt22 kullanılmıştır.

3.2.3.6. Endospor testi

Antagonist bakterilerin endospor oluşturup oluşturmadığını tespit etmek için 80 °C'de canlı kalmalarına bakılmıştır. NA besi yerinde geliştirilen 24-48 saatlik kültürlerden 1 ml'lik süspansiyon hazırlanmıştır. Bu süspansiyonlardan ilk olarak daha önce NA hazırlanan petri kaplarına 10 µl mikropipet ile damlatılmıştır. Aynı süspansiyon 80 °C'de su banyosunda 15 dk bekletilmiş, ardından bu süspansiyondan da petri kaplarına yine 10 µl mikropipet ile ekimi yapılmıştır. 25 °C'de 2 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda 80 derecede bekletilen tüplerden ekilen petrilere gelişim gösteren bakteriler pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Bradbury, 1970).

3.2.3.7. Gram boyama testi

Bakterilerin gram reaksiyonu ve hücre şekillerinin belirlenmesi amacıyla bu test uygulanmıştır. Yirmi beş mikrolitre steril su lam üzerine damlatılmıştır. 24- 48 saatlik bakteri kültürlerinden öze ile çok az miktarda bakteri alınarak lam üzerine yayılmıştır. Ardından lam alevden geçirilerek bakteriler fikse edilmiştir. Daha sonra hazırlanan lamlar 5'li gruplar halinde önce kristal viyole'de 1 dk, iodine'de 1 dk, alkolde 30 sn., safraninde 45 sn. bekletilmiştir. Her kimyasal işlemten sonra lamlar çeşme suyu ile yıkanmıştır. Daha sonra lamlar kurutma kağıdı üzerinde kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan lamlar mikroskopta incelenerek gram reaksiyonları ve hücre şekilleri belirlenmiştir (Klement, 1968).

3.2.3.8. Floresan pigment testi

Antagonist bakterilerin King B besi yerinde UV ışık altında floresan pigment oluşturup oluşturmadıklarını tespit etmek amacıyla bu test uygulanmıştır. 24-48 saatlik bakteri kültürleri King B besi yerine ekimi yapılarak 25 °C’de 2 gün inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra UV ışık altında mavi yeşil parlama gösteren bakteriler pozitif olarak değerlendirilmiştir (King vd., 1954).

3.2.4. Antagonist bakterilerin etki mekanizmalarına yönelik testler

3.2.4.1. DNaz testi

DNA’yı parçalayan bakterileri saptamak için kullanılan test yöntemidir. Bu test için hazır DNA besi yeri (Merck) kullanılmıştır. 121 °C’de 15 dk otoklav işleminden sonra besi yeri 9 cm’lik küçük petrilere dökülmüştür. Besi yeri kuruduktan sonra antagonist bakteriler petri ortasına küçük dairesel ekim yapılmıştır. Yirmi beş derecede 5 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında petri üzerine 2 ml 1 M HCl eklenmiştir. 10 dk beklemenin ardından bakterilerin etrafında açık zon oluşması pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir. Pozitif kontrol olarak ise *Serratia plymuthica* (HRO-C48) bakterisi bırakılmıştır (Jeffries vd., 1957).

3.2.4.2. Kitinaz testi

Bakterilerin kitini parçalayan kitinaz enzimini üretip üretmediğini belirlemek için bu test uygulanmıştır. Bu test için nutrient broth, agar ve kitin kullanılmıştır. 300 ml’lik besi yeri için 0,8 g NB (Nutrient Broth); 4,5 g agar ve %0,4 oranında kitin 1,2 g olarak kullanılmıştır. Fakat kitini yumuşatmak için fosforik asit içerisinde 3 gün buzdolabında bekletilmiş, daha sonra bol miktarda suyla yıkanarak süzgeçten geçirilmiştir. Yıkanan kitin NB besi yerine karıştırılmış, pH’sı 7,2’ye ayarlanmış ve agar ilave edilerek 121 °C’de 15 dk otoklav edilmiştir. Hazırlanan besi yerine 2 günlük NA ortamında geliştirilen bakteriler çizgi ekim ile ekilmiş ve 25 °C’de 7 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır. HRO-C48 bakterisi pozitif kontrol olarak bırakılmıştır (Berg, 1996; Berg vd., 2000; Reid ve Ogrydzial, 1981; Ramized vd., 2004).

3.2.4.3. Proteaz testi

Bakterilerin proteini parçalayan enzim üretilip üretilmediğini saptamak için bu test uygulanmıştır. Besi yeri Tryptic Soy Broth, agar ve yağsız süt karışımları ile hazırlanmıştır. Hazırlanan besiyerinin %50'si TSB ve agardan oluşmakta, diğer %50'si süttan oluşmaktadır. TSB son konsantrasyon 1/5 oranında kullanılmıştır. İlk olarak 150 ml TSB ve agar ile besiyeri hazırlanarak 121 °C'de 15 dk otoklav edilmiştir. Ardından besiyeri otoklavdan çıkar çıkmaz %0,1 yağlı süttan 150 ml besiyerine aktarılmıştır. Homojen bir şekilde karıştırıldıktan sonra besiyeri petri kaplarına dökülmüştür. Besiyeri kuruduktan sonra petri kabı 4'e bölünerek NA besiyerinde 24-48 saatlik bakteri kültürlerinden ekimi yapılmıştır. Yirmi beş derecede 5 gün inkübasyondan sonra bakteri kolonilerinin etrafında açık zon oluşturan bakteriler pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Krechel vd., 2002).

3.2.4.4. Siderofor testi

Crom Azurol S (CAS) agar besiyeri ile sideroforun varlığı araştırılmıştır. Çalışmalara başlamadan önce tüm cam malzemeler metal kirlenmesine karşı 6 M HCl ile yıkanmış ve saf su ile üç kez durulanmıştır. Blue CAS agar besiyeri aşağıdaki gibi hazırlanmıştır. Besiyeri: 100 ml 10× MM9 tuz solüsyonu (6,78 g Na₂HPO₄; 0,3 g KH₂PO₄; 0,5 g NaCl; 1 g NH₄Cl; 100 ml saf su), 15 g agar, 30,24 g 1,4-piperazinediethanesulfonic acid (Pipes), 750 ml deiyonize su içine eklenmiş, pH'yı 6,8'e ayarlamak için 12 g NaOH solüsyonu ilave edilmiş ve 121 °C'de 15 dakika otoklav ile sterilize edilmiştir. Otoklav ile sterilize edilmiş ve 50 °C'ye soğutulmuş besiyerine, 30 ml demirden arındırılmış kasamino asit solüsyonu (%10), filtre ile sterilize edilmiş 10 ml glukoz (%20), 1 ml tiamin HCl (%0,2) ve 3 ml L-triptofan (%1) aseptik koşullarda eklenmiştir. Cox (1994)'un önerdiği yonteme göre kasamino asiti demirden arındırmak için kasamino asit solüsyonu 1:1 oranında kloroform içine hazırlanmış %3'lük 8-hydroxyquinoline solüsyonu ile karıştırılmış, kuvvetli bir şekilde çalkalanmış ve 8000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Üstte oluşan faz aseptik olarak dikkatli bir şekilde alınmış ve kullanılmıştır. CAS solüsyonu: 50 ml deiyonize su içine 60,5 mg CAS eritilmiş ve üzerine 10 ml demir (III) solüsyonu eklenmiştir. Hazırlanan bu solüsyon manyetik karıştırıcı üzerindeki 40 ml deiyonize su içinde eritilmiş 72,9 mg hexadecyltrimethylammonium bromide (HDTMA) üzerine yavaşça eklenerek karıştırılmıştır. Karışım 121 °C'de 15 dakika otoklav ile sterilize edilmiş ve 50 °C'ye

kadar soğutulmuştur. Besi yeri CAS solüsyonu ile köpük oluşumuna izin verilmeden karıştırılmış ve petri kaplarına 30 ml olacak şekilde dökülmüştür. Bakteriler petrilere inokule edilmiş ve 25 °C'de 5 günlük inkübasyonun ardından koloni çevresindeki portakal renkli alanın meydana gelmesi pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Schwyn ve Neilands, 1987).

3.2.5. Moleküler tanılama testi

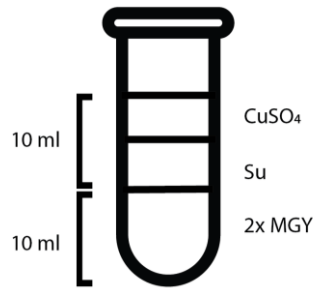
İkili kültür çalışmalarında başarılı bulunan bazı antagonist bakterilerin tanılması 16s rRNA bölgesinin dizi analizi ile yapılmıştır. Bu amaçla spesifik primerler 27F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG -3') ve 1492R (5'- TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACTT 3') Baker vd. (2003) önerdikleri metot doğrultusunda kullanılmıştır. PCR koşulu 35 döngü olacak şekilde; 94 °C de 10 sn, 55 °C de 15 sn ve 72 °C de 20 sn olarak ayarlanmış, ayrıca 94 °C de 1 dk başlangıç denatürasyonu ile 72 °C de 5 dk son uzama adımları programa eklenmiştir. Amplifikasyonun gerçekleşip gerçekleşmediğinin belirlenmesi amacıyla ürünler jel elektroforez yöntemiyle yürütülerek görüntülenmiştir. Elde edilen PCR ürünlerinin saflaştırılması ve gen dizi analizleri Macrogen firmasına yaptırılmıştır. Elde edilen diziler NCBI (The National Center for Biotechnology Information) web sayfasında bulunan veri tabanından BLASTN 2.2.29 algoritması kullanılarak taranmış ve eşleşen olası bakteri türleri belirlenmeye çalışılmıştır (Zhang vd., 2000).

3.2.6. Bakır direnç testi

3.2.6.1. Antagonist bakterilerin bakır direnci (ön çalışma)

İkili kültür testi sonucunda engelleme zonu oluşturan bakterilerin bakıra olan duyarlılıklarını saptamak amacıyla bu test uygulanmıştır. Çalışmalarda Mannitol Glutemat Yeast Eksrat besi yeri, bakır sülfat çözeltisi ve su karıştırılarak 15 mM ve azalan dozlarda (1/2) seyreltilerek 11 petrilik seri hazırlanmıştır. İlk olarak MGY besi yeri bileşenleri 2× dozda olacak şekilde hazırlanmıştır (mannitol 10 g; L - sodium glutamate 2 g; KH₂PO₄ 0,5 g; sodium chloride 0,2 g; MgSO₄ 0,4 g; yeast extract 0,25 g; su 500 ml)

(Keane vd., 1970). Daha sonra besi yerinin pH'sı 1 M NaOH ile 7'ye ayarlanmıştır. Besi yerine 15 g agar ilave edilmiş ve karıştırıcıda homojen bir şekilde karışması sağlanmıştır. MGY besi yeri karışır durumdayken Çizelge 3.1'de verildiği gibi 50 ml'lik tüplere 10'ar ml besi yeri mikropipet yardımıyla paylaştırılmıştır. Daha sonra 1. tüpten 11. tüpe kadar belirlenen oranlarda su ilave edilmiş, tüpler numaralandırılmış ve 121 °C'de 15 dk otoklav edilmiştir. Otoklav işleminden sonra ilk olarak 100 ml steril su içerisine 30 mM'a denk bakır sülfattan 0,7491 g eklenmiştir (30 mM daha sonra tüpte su ve besi yeri ile karıştığında 15 mM'a düşmüştür). Bakır çözeltisi numaralandırılan tüplere Çizelge 3.1'de belirtilen oranlarda paylaştırılmıştır. Şekil 3.3'de her bir petri kabına dökülecek besi yerinde Cu konsantrasyonunun ayarlanması şematize edilmiştir. Tüpler seri bir şekilde vorteks ile homojen şekilde karıştırılmış ve sırasıyla numaralandırılan steril petrilere dökülmüştür. Petriler kuruduktan sonra her petri $3 \times 3 = 9$ eş parçaya ayrılmış ve hazırlanan antagonist bakteri süspansiyonları (29 bakteri) mikropipet ile 5 µl olacak şekilde ekilmiştir. Yirmi beş derecede inkübasyonda 4 gün boyunca gelişimleri gözlemlenmiş, Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MIC) ve Minimum Bakterisidal Konsantrasyonu (MBC) değerleri not edilmiştir.



Şekil 3.3. Her bir petri kabı için besi yerindeki Cu konsantrasyonunun ayarlanması.

Çizelge 3.1 Bakır duyarlılığı ön çalışmasındaki CuSO₄, su ve MGY karışım oranları (Toplam 20 ml).

Karışım no	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Su (ml)	0	5	7,5	8,75	9,37	9,68	9,84	9,92	9,96	9,98	10
CuSO ₄ (30 mM) (ml)	10	5	2,5	1,25	0,63	0,32	0,16	0,08	0,04	0,02	0
MGY (2×) (ml)	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Son CuSO ₄ kons.(mM)	15	7,5	3,75	1,88	0,94	0,47	0,24	0,12	0,06	0,03	0

3.2.6.2. Antagonist bakterilerin bakır direnci

On beş mili molar bakır ön çalışma testine göre 9 bakteri seçilerek teste tabi tutulmuştur. MGY, bakır sülfat, su bileşenlerinden oluşan besi yeri için, ilk olarak MGY besi yeri hazırlanmıştır (mannitol 5 g; L - sodium glutamate 1 g; KH_2PO_4 0,25 g; sodium chlorid 0,1 g; MgSO_2 0,2 g; yeast extract 0,125 g, su 250 ml). Daha sonra besi yerinin pH'sı 1 M NaOH ile 7'ye ayarlanmış ve 7,5 g agar ilave edilmiştir. MGY besi yeri homojen bir şekilde karışır durumdayken 11 adet 50 ml'lik tüplere 10 ml paylaştırılmıştır. Tüplere Çizelge 3.2'de belirtilen oranlarda su eklenerek 121 °C' de 15 dk otoklav edilmiştir. Daha önceden 150 ml saf su içine 7,5 mM'a denk 0,2809 g bakır sülfat tartılarak Cu süspansiyonu oluşturulmuştur (7,5 mM daha sonra besi yeri ilavesiyle 3,75 mM'a düşecektir). Bakır sülfat çözeltisi karıştırıcıda homojen bir şekilde karışır durumdayken numaralandırılan tüplere sırasıyla paylaştırılmış, tüpler vortekste karıştırılmış ve numaralandırılan petrilere dökülmüştür. Çizelge 3.2'de CuSO_4 , su ve MGY karışım oranları verilmiştir. Petriler kuruduktan sonra her petri $3 \times 3 = 9$ eş parçaya ayrılmış ve hazırlanan antagonist bakteri süspansiyonları (9 bakteri) miropipet ile 5 µl olacak şekilde ekilmiştir. Yirmi beş derecede inkübasyonda 4 gün boyunca gelişimleri gözlemlenmiş, Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MIC) ve Minimum Bakterisidal Konsantrasyonu (MBC) değerleri not edilmiştir.

Çizelge 3.2 Bakır duyarlılığı çalışmasındaki CuSO_4 , su ve MGY karışım oranları (Toplam 20 ml).

Karışım no	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Su (ml)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CuSO_4 (7,5 mM) (ml)	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	0
MGY (2×) (ml)	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Son CuSO_4 kons. (mM)	3,75	3,38	3	2,63	2,25	1,88	1,5	1,13	0,75	0,38	0

3.2.7. Patojenisite testi ve uygun inokulum miktarlarının belirlenmesi

Bu aşama mevcut *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (rpt22) izolatu ile yapılmıştır. Uygun inokulum miktarının belirlenmesi için 2 gerçek yapraklı domates bitkilerine 2 günlük bakteri kültürlerinden hazırlanmış 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 CFU/ml süspansiyonları bitki

başına 1,5 ml hesabı ile püskürtülmüştür. Üzeri içi hafif ıslatılmış şeffaf naylon ile örtülerek 24 saat beklemeye bırakılmıştır. Yirmi dört saat sonra poşetler çıkartılmış ve 2 hafta inkübasyona bırakılmıştır. Hastalık belirtilerinin çıkmasıyla birlikte tüm yapraklardaki benekler sayılmıştır. Birbirine çok değmeyen ve beneklerin sayımı mümkün olan yoğunluk belirlenerek diğer çalışmalarda inokulum miktarı olarak kullanılmıştır.

3.2.8. Saksı denemeleri

Bakır direncine bakılan 9 antagonist bakteri içinden, daha önceden yapılan etki mekanizmaları testleri de göz önünde bulundurularak 3 adedi seçilmiştir. Seçilen CBEK3, C2EK6 ve C2NK3 kodlu bakterilerin hastalık etmenine olan biyolojik etkinliği saksı denemeleri ile bitki üzerinde araştırılmıştır. Bunun için biyolojik savaş ajanı, hastalık etmeni ve bakır uygulaması farklı kombinasyonlarda kullanılarak değerlendirilmiştir. Çalışma 26 °C'de 16 saat ışık, 8 saat karanlık fotoperiyotlu iklim odasında yürütülmüş, domates çeşidi olarak H2274 çeşidi kullanılmıştır. Deneme, 4 tekerrürlü ve tesadüf parselleri deneme desenine göre yürütülmüştür. Uygulamalar bitkiler 2 gerçek yapraklı döneme geldiğinde yapılmıştır. Aralarında 1 gün olacak şekilde önce antagonist bakteriler daha sonra bakır uygulaması ve en son olarak hastalık etmeni uygulaması yapılmıştır. Uygulamaya başlamadan önce tekerrürler belirlenmiş ve isimlendirilmiştir. İlk olarak antagonist bakteriler uygulanacağı için 72 saatlik bakteri kültürlerinden 10⁹ CFU/ml yoğunluğunda süspansiyonlar hazırlanmıştır. Antagonist bakteri uygulaması gerektiren tekerrürlerdeki bitkiler yapraklar tamamen ıslanacak şekilde inokülasyonu sağlanmıştır. Ertesi gün bakır oksiklorid etken maddeli ticari preparat olan Mavi Bakır, arazi dozunda 100 ml suya 0,3 g olacak şekilde süspansiyon hazırlanmış ve bitki başına 1,5 ml püskürtme yapılmıştır. Şekil 3.4.'de saksı denemelerinde hastalık inokülasyonu (sol) ve uygulama yapılan karakterlerin üzerinin nemlendirilmiş poşet ile örtülmesi (sağ) verilmiştir. Ertesi gün 48 ml 10⁸ CFU/ml yoğunluğunda rpt22 süspansiyonu hazırlanmış ve bitki başına 1,5 ml püskürtme yapılmıştır. Püskürtme yapıldıktan sonra bitkilerin üzerine içerisi nemli naylon poşetler ile örtülmüş, 24 saat sonra çıkarılmıştır. Daha sonra bitkiler iki hafta gelişime bırakılmıştır. İki haftanın sonunda bitkilerin yapraklarında oluşan benek sayıları 3 günde bir sayılarak not edilmiş, biyolojik etkinliği abbott formülü ile belirlenmiştir. Çıkan değerlere tek yönlü varyans analizi yapılmış ve ortalamalar LSD çoklu karşılaştırma testiyle değerlendirilmiştir. Benek sayımları sonlandırıldığında

bitkiler köklenmiştir ve ilk olarak her bir bitkinin kök ve gövdesinin yaş ağırlığı ölçülmüştür daha sonra bitki kökleri ve gövdeleri kese kağıdına konularak 65 °C’de etüvde 4 gün bekletildikten sonra kuru ağırlıkları ölçülerek not edilmiştir. Antagonist bakterilerin bitki gelişimine etkisi belirlenmiştir. Çizelge 3.3’de iklim odası çalışmalarında uygulanacak antagonist bakteri, hastalık etmeni ve bakır uygulama kombinasyonları verilmiştir.



Resim 3.1. Saksı denemelerinde hastalık inokulasyonu (sol) ve uygulama yapılan karakterlerin üzerinin nemlendirilmiş poşet ile örtülmesi (sağ).

Çizelge 3.3 Saksıda biyolojik etkinlik denemelerinde kullanılan farklı kombinasyonlardaki karakterler.

Uygulama kod	Uygulamalar					Açıklama
	rtp22	Bakır	CBEK3	C2EK6	C2NK3	
Kontrol						Negatif kontrol
rpt22	×					Pozitif kontrol
rpt22_Cu	×	×				Bakırın hastalığa tek başına etmesi
rpt22_CBEK3	×		×			Antagonistin (CBEK3) hastalığa etmesi
rpt22_C2EK6	×			×		Antagonistin (C2EK6) hastalığa etmesi
rpt22_C2NK3	×				×	Antagonistin (C2NK3) hastalığa etmesi
rpt22_CBEK3_Cu	×	×	×			Antagonistin (CBEK3) bakır varlığında hastalığa etmesi
rpt22_C2EK6_Cu	×	×		×		Antagonistin (C2EK6) bakır varlığında hastalığa etmesi
rpt22_C2NK3_Cu	×	×			×	Antagonistin (C2NK3) bakır varlığında hastalığa etmesi
CBEK3			×			Antagonistin (CBEK3) bitki gelişimine etkisi
C2EK6				×		Antagonistin (C2EK6) bitki gelişimine etkisi
C2NK3					×	Antagonistin (C2NK3) bitki gelişimine etkisi
Cu		×				Sadece bakırın bitkiye olan etkisi

Seçilen 3 farklı antagonistin uygulama kombinasyonları; 1- sadece antagonist uygulaması (bitki gelişimine teşviki), 2- antagonist ve hastalık etmeni uygulaması (hastalığa karşı biyolojik etkinlik), 3- antagonist uygulaması + bakır uygulaması + hastalık etmeni

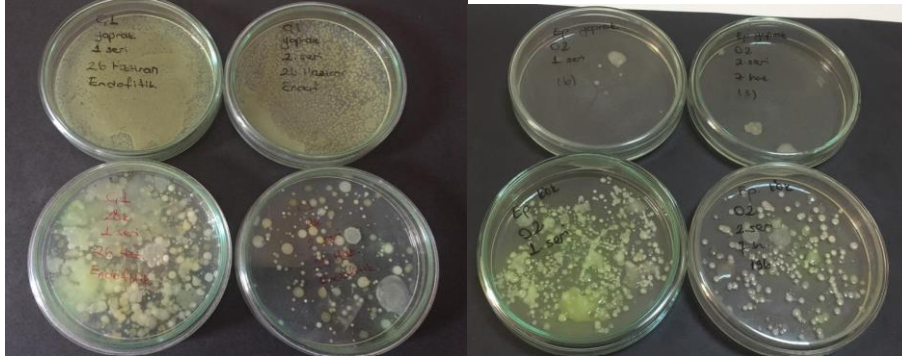
uygulamasý (bakýr varlýğýnda biyolojik etkinlik); 4- ayrıca kontroller: negatif kontrol olarak sadece su uygulamasý, pozitif kontrol olarak sadece hastalık etmeni uygulamasý ve sadece bakýr uygulamasý (bakýr toksisite için) şeklinde yapılmıştır.



4.BULGULAR

4.1. Antagonist Bakteri İzolasyonu

2024 yılı Nisan – Mayıs aylarında Aydın ilinin İncirliova ilçesinden 3, Çine ilçesinden 3, Ortaklar ilçesinden 3 (Ortaklar'dan getirilen örnekler seradan alınmıştır), Koçarlı ilçesinden 1 örnek getirilerek toplam 10 domates tarlasından toplanan sağlıklı bitkilerden hem kök hem de yapraklardan 1 g bitki dokuları alınarak izolasyonu yapılmış ve seyreltme serileri hazırlanarak bakteri sayımları yapılmıştır. Endofitik bakteri izolasyonunda 2 seyreltme serisi hazırlanmış ve bu seyreltme serilerinden petrilere 50 µl ekimi yapılarak gelişen bakterilerin sayımları yapılmıştır. Epifitik bakteri izolasyonunda ise 4 seyreltme serisi hazırlanmış ve bu seyreltme serilerinden petrilere 50 µl ekimi yapılarak her bir dört petrideki bakteri sayımı yapılmıştır. Resim 4.1. Antagonist adayı bakterilerin seyreltme serisindeki görünümü verilmiştir. Çizelge 4.1. izolasyonu yapılan bitkilerden alınan parçalardan 1 g yapraktaki bakteri sayıları verilmiştir.



Resim 4.1. Seyreltmelerden ekilen ve besi yerlerinde gelişen bakterilerin genel görünümü.

Çizelge 4.1. İzole edilen bakterilerin bir gram bitki dokusundaki sayıları

Örnek kod	İlçe	Kök		Yaprak	
		Endofitik	Epifitik	Endofitik	Epifitik
ACA1	İncirliova	$2,6 \times 10^6$	$3,1 \times 10^6$	$1,6 \times 10^4$	nd
ACA2	İncirliova	$1,2 \times 10^5$	nd	$9,3 \times 10^2$	nd
ACA3	İncirliova	$1,6 \times 10^5$	$5,8 \times 10^7$	$1,7 \times 10^5$	$1,8 \times 10^6$
Ç1	Çine	$1,8 \times 10^6$	$5,5 \times 10^7$	na	$5,0 \times 10^5$
Ç2	Çine	na	$1,6 \times 10^7$	na	$2,1 \times 10^6$
Ç3	Çine	$2,4 \times 10^6$	$5,3 \times 10^7$	$1,6 \times 10^4$	$2,1 \times 10^6$

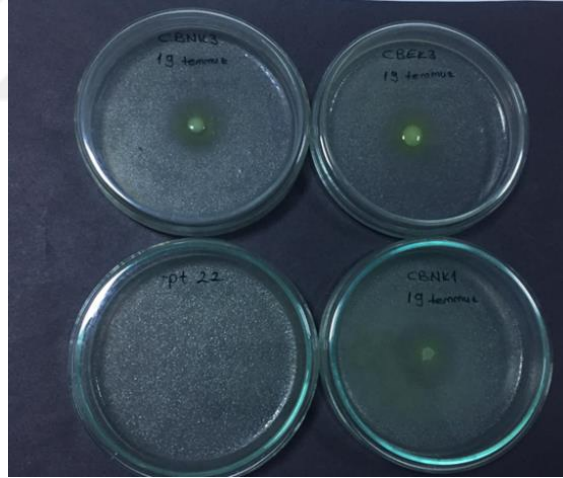
ÇKRB	Koçarlı	$8,6 \times 10^4$	$4,3 \times 10^7$	nd	$4,9 \times 10^5$
O1	Ortaklar	$1,9 \times 10^5$	$3,9 \times 10^7$	nd	$3,4 \times 10^5$
O2	Ortaklar	$1,4 \times 10^5$	$3,7 \times 10^7$	$3,2 \times 10^4$	$6,4 \times 10^5$
O3	Ortaklar	$9,7 \times 10^4$	$9,8 \times 10^7$	$4,2 \times 10^4$	$3,2 \times 10^5$

na: Sayılamayacak kadar çok bakteriden dolayı uygulanabilir değil.

nd: Bakteri gelişimi olmadığı için sayılamamıştır.

4.2. Antagonist Bakterilerin Etkinliğinin İkili Kültür ile Saptanması

Yapılan izolasyon çalışmaları sonunda Acarlar'dan 30, Ortaklar'dan 21, Çine'den 28 ve Koçarlı'dan da 8 olmak üzere 87 adet antagonist adayı bakteri elde edilmiştir. Bu bakterilerin etkinliğinin saptanması amacıyla laboratuvarında rpt22 izolatu ile ikili kültür testi yapılmıştır. Resim 4.2'de antagonist adayı bakterilerin engelleme zonlarındaki görünümü verilmiştir. İkili kültür sonucunda hastalık etmenine karşı 29 adet antagonist bakteri etkili bulunmuştur. Çizelge 4.2. elde edilen antagonist bakterilerin ikili kültür etkinlikleri verilmiştir.



Resim. 4.2. Antagonist adayı bakterilerin engelleme zonları.

Çizelge 4.2.'de verildiği gibi antagonist bakterilerin rpt22'ye olan ikili kültür etkinlikleri mm cinsinden verilmiştir. Engelleme zonu aralıkları 24,71 mm ile 2,32 mm arasında değişmektedir. A3NK4 bakterisi 24,71 mm oranla en fazla engelleme zonu oluştururken C2NK3 bakterisi 2,32 mm ile en düşük engelleme zonu oluşturmuştur.

Çizelge 4.2 İzole edilen bakterilerin ikili kültür etkinlikleri.

İzolat	Engelleme zonu (mm)	İlçe	Örnek No	Yaprak/Kök	Epifitik/Endofitik
A3NK4	24,71 a	İncirliova	3	Kök	Endofitik
O3EK1	20,50 b	Ortaklar	3	Kök	Epifitik
A1NK4	18,06 c	İncirliova	1	Kök	Endofitik
O3NK2	17,94 c	Ortaklar	3	Kök	Endofitik
CBNK1	16,83 c	Koçarlı	1	Kök	Endofitik
C1NK3	15,22 d	Çine	1	Kök	Endofitik
A1EK2	15,15 d	İncirliova	1	Kök	Epifitik
O3NK3	14,62 de	Ortaklar	3	Kök	Endofitik
C1NK4	12,44 ef	Çine	1	Kök	Endofitik
C3EK11	11,83 fg	Çine	3	Kök	Epifitik
CBEK3	11,23 fgh	Koçarlı	1	Kök	Epifitik
C3NK2	10,73 fghi	Çine	3	Kök	Endofitik
CBNK3	10,64 fghi	Koçarlı	1	Kök	Endofitik
A1NK1	9,74 ghi	İncirliova	1	Kök	Endofitik
A2NK1	9,72 ghi	İncirliova	2	Kök	Endofitik
A1NY3	9,42 hij	İncirliova	1	Yaprak	Endofitik
C3NY1	9,14 hijk	Çine	3	Yaprak	Endofitik
O1EK1	8,91 ijkl	Ortaklar	3	Kök	Epifitik
A3NK3	8,58 ijkl	İncirliova	3	Kök	Endofitik
O2EK2	7,42 jklm	Ortaklar	2	Kök	Epifitik
O2EK1	6,94 klm	Ortaklar	2	Kök	Epifitik
C2EK8	6,75 lmn	Çine	2	Kök	Epifitik
O1EK2	5,67 mno	Ortaklar	1	Kök	Epifitik
C2EK6	4,54 nop	Çine	2	Kök	Epifitik
C2NY3	3,72 op	Çine	2	Yaprak	Endofitik
C1EK1	3,55 op	Çine	1	Kök	Epifitik
C3EY10	3,01 p	Çine	3	Yaprak	Epifitik
O2EY1	2,65 p	Ortaklar	2	Yaprak	Epifitik
C2NK3	2,32 p	Çine	2	Kök	Endofitik

4.3. Antagonist Bakterilerin Ön Tanılama Testleri

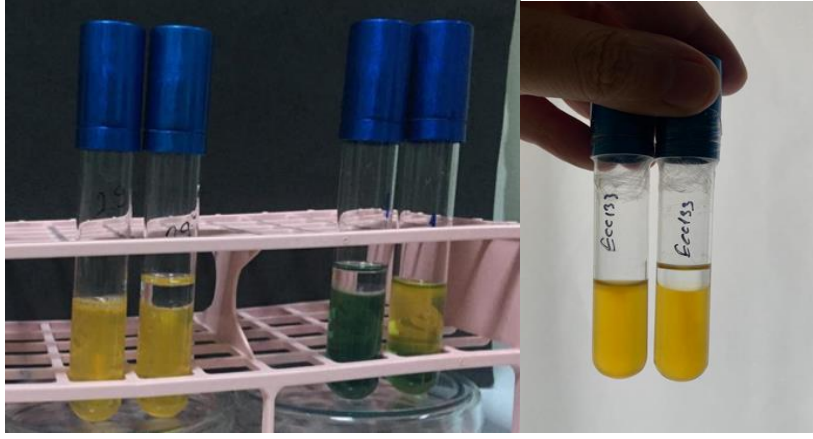
İkili kültür testlerinde etkili sonuç veren antagonist 29 bakteriye ön tanılama testleri uygulanmıştır. Test sonuçları aşağıda Çizelge 4.3.' de verilmiştir. Çizelge 4.3.'te verilen O/F test sonuçlarına göre izole edilen antagonist bakterilerden 9 bakteri glikozu hem oksidatif hem de fermentatif olarak kullanmıştır (+/+).

Çizelge 4.3 Antagonist bakterilerin ön tanılama test sonuçları

İzolat	Gram boyama	Floresan pigment oluşumu	O/F	Oksidaz	Patates yumuşak çürüklük	37 °C'de gelişim	Tütünde aşırı duyarlılık	Endospor
A3NK4	-/çubuk	Y	+/-	+	-	-	-	-
O3EK1	-/çubuk	M	+/-	+	-	+	-	-
A1NK4	-/çubuk	M	+/-	+	-	-	-	-
O3NK2	-/çubuk	M	+/-	+	-	+	-	-
CBNK1	-/çubuk	M	+/-	+	-	+	-	-
C1NK3	-/çubuk	Y	+/-	+	-	++	-	-
A1EK2	-/çubuk	M	+/-	+	-	+	-	-
O3NK3	-/çubuk	M	+/-	+	-	++	-	-
C1NK4	-/çubuk	M	+/-	+	-	+	-	-
C3EK11	-/çubuk	Y	+/-	+	-	-	-	-
CBEK3	-/çubuk	-	-/-	-	-	+	-	-
C3NK2	-/çubuk	Y	+/-	+	-	-	-	-
CBNK3	-/çubuk	Y	+/-	+	-	-	-	-
A1NK1	+/çubuk	-	+/-	-	-	-	-	-
A2NK1	+/çubuk	-	+/+	-	-	++	-	-
A1NY3	+/çubuk	-	+/-	+	-	+	-	-
C3NY1	-/çubuk	Y	+/-	+	-	-	-	-
O1EK1	-/çubuk	Y	+/-	+	-	++	-	-
A3NK3	+/çubuk	-	+/+	+	+	+++	-	+
O2EK2	+/çubuk	-	+/+	-	+	+	-	+
O2EK1	-/çubuk	Y	+/-	+	-	++	-	-
C2EK8	+/çubuk	-	+/+	-	-	+++	-	+
O1EK2	+/çubuk	-	-/-	+	-	++	-	-
C2EK6	-/çubuk	Y	+/-	-	-	++	-	-
C2NY3	+/çubuk	-	+/+	+	-	+++	-	+
C1EK1	-/çubuk	Y	+/-	+	-	+	-	-
C3EY10	+/çubuk	-	+/+	-	-	++	-	+
O2EY1	+/çubuk	-	+/+	+	-	+++	-	+
C2NK3	+/çubuk	-	+/+	-	-	+	-	-
Ecc133	-/çubuk	nt	+/+	nt	+	+	nt	-
HRO-C48	-/çubuk	nt	nt	nt	nt	-	nt	-
U1	-/çubuk	nt				-	nt	-
U26	-/çubuk	nt					nt	-
rpt 22	nt	nt					+	nt

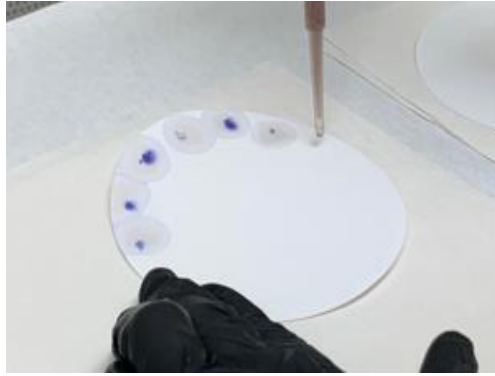
-: negatif, +:pozitif. M: mavi, Y: yeşil, nt: test edilmedi, Ecc133: *Pectobacterium carotovorum*, HRO-C48: *Serratia plymuthica*, rpt22: *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. 37 °C'de gelişim testi için: +++: fazla gelişmiş, ++: eşit gelişmiş, +: az gelişmiş, -: hiç gelişmemiş. +/-: glikozu sadece oksidatif olarak kullanan bakteriler, +/+ : glikozu hem fermentatif hem oksidatif olarak kullanan bakteriler, -/-: glikozu kullanmayan bakteri

18 bakteri glikozu sadece oksidatif olarak kullanmıştır (+/-). Pozitif kontrol olarak kullanılan Ecc133 bakterisi ise glikozu hem oksidatif hem de fermentatif olarak tamamen kullanmıştır. Şekil 4.3'te O/F testindeki sadece mineral yağ uygulaması, O/F testi pozitif olan C2NK3, oksidatif reaksiyonu pozitif ancak fermentatif reaksiyonu negatif olan A3NK4 ve pozitif kontrol olan Ecc133 bakterisi görseli verilmiştir.



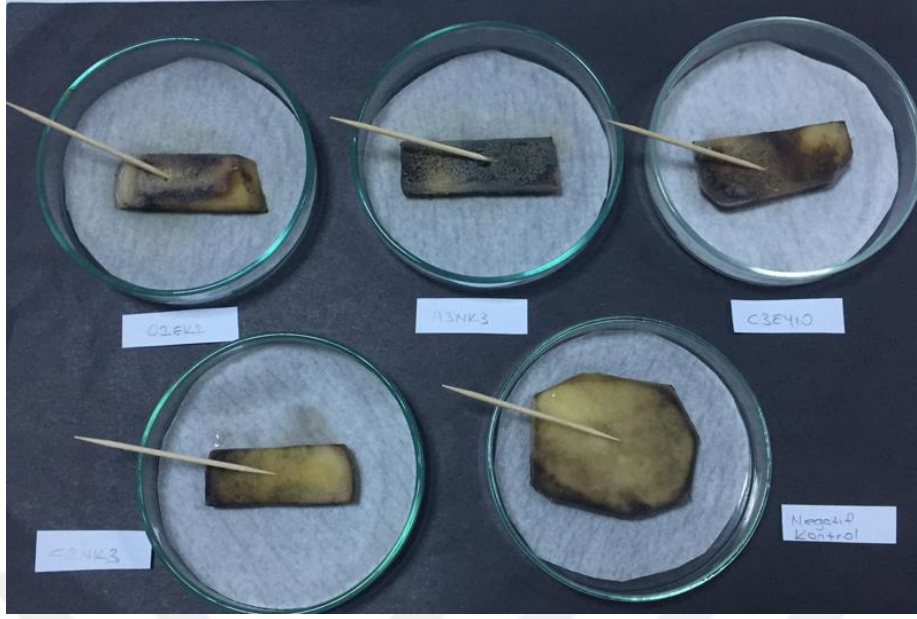
Resim 4.3. O/F testi pozitif olan C2NK3 (sol), oksidatif reaksiyonu pozitif ancak fermentatif reaksiyonu negatif olan A3NK4 (orta) ve pozitif kontrol olan Ecc133 bakterisi (sağ).

Oksidaz testine tabi tutulan antagonist bakteriler steril kürdan ile alınarak Whatman no:1 kağıdına dairesel şekilde sıvanmış ardından üzerine test solüsyonu damlatılmıştır. 10 saniye içerisinde mor renk değişimi gözlenen bakteriler pozitif sonuç göstermiş, renk vermeyenler ise negatif sonuç göstermiştir. Teste göre CBEK3, A1NK1, A2NK1, O2EK2, C2EK8, C2EK6, C3EY10, C2NK3 bakterileri negatif sonuç vermiş diğerleri pozitif sonuç vermiştir. Resim 4.4.'te mor renkte pozitif sonuç veren bakterilerin görünümü verilmiştir.



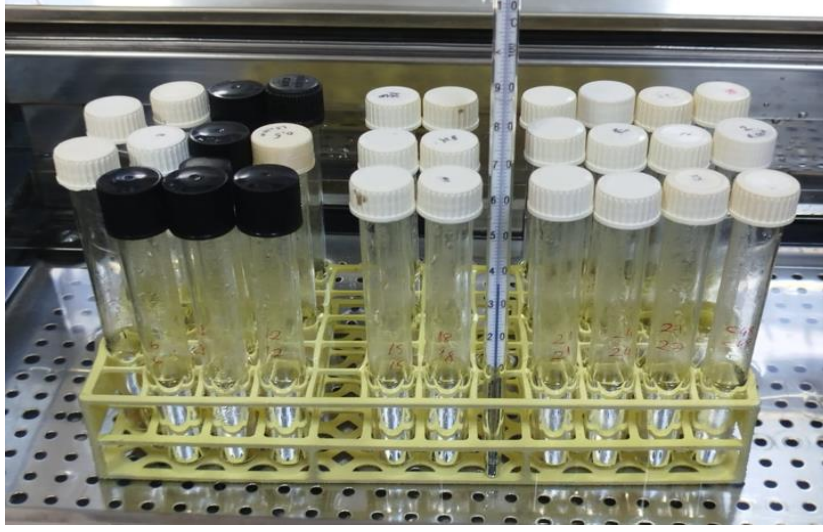
Resim 4.4. Oksidaz testi sonucu, mor renk pozitif sonuç.

Çizelge 4.3.'e bakıldığında patates yumuşak çürüklük testine göre sadece A3NK3 ve O2EK2 bakterileri pozitif sonuç vermiş diğer bakteriler ise negatif sonuç vermiştir. Resim 4.5.'te bakteri uygulaması ile yumuşak çürüklük testi pozitif sonuç veren, negatif sonuç veren ve negatif kontrol bakterileri verilmiştir.



Resim 4.5. Patates yumuşak çürüklük testi negatif sonuç veren C2NK3, pozitif sonuç veren O2EK2, A3NK3, C3EY10 ve negatif kontrol.

Bakterilerin 37 °C’de gelişim test sonuçlarına göre A3NK3, C2EK8, C2NY3, O2NY1 bakterileri 25 °C’de gelişen bakterilere göre kıyasla fazla gelişim göstermiştir. C1NK3, O3NK3, A2NK1, O1EK1, O2EK1, O1EK2, C2EK6, C3EY10 bakterileri ise 25 °C’de gelişen bakteriler ile eşit oranda gelişmiştir. O3EK1, O3NK2, CBNK1, A1EK2, C1NK4, CBEK3, A1NY3, O2EK2, C1EK1, C2NK3 bakterileri ve teste tabi tutulan Ecc133 bakterisi 25 °C’de gelişim gösteren bakterilere göre az gelişmiştir. A3NK4, A1NK4, C3EK11, C3NK2, CBNK3, A1NK1, C3NY1 bakterileri ve teste tabi tutulan HRO-C48 ve U1 bakterileri 37 °C’de hiç gelişmemiştir. Resim 4.6.’da 37 °C’de gelişimin değerlendirildiği su banyosu içindeki tüpler gösterilmiştir.



Resim 4.6. 37 °C'de gelişim için benmaride sıcaklık testi uygulaması.

Tütünde aşırı duyarlılık testine göre antagonist bakterilerin tümü negatif reaksiyon göstermiş pozitif kontrol olarak bırakılan rpt22 bakterisi ise pozitif reaksiyon göstermiştir. Resim 4.7.'de tütün bitkisinde aşırı duyarlılık testi için bakteri inokulasyonu sonucu pozitif reaksiyon veren rpt22 bakterisi ve negatif sonuç veren antagonist bakteriler görülmektedir.



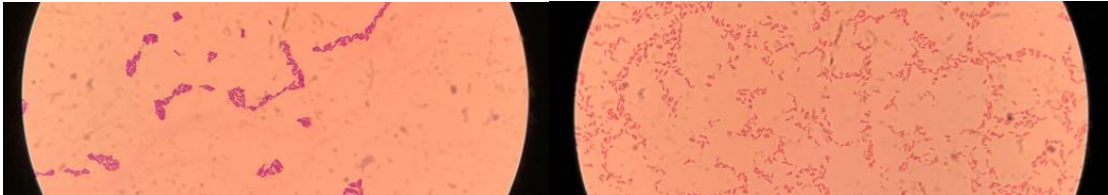
Resim 4.7. Tütünde aşırı duyarlılık testi negatif sonuçlar (sol) ve pozitif kontrol (rpt22, sağ).

Çizelge 4.3.'e göre endospor ısı testine tabi tutulan antagonist bakterilerden A3NK3, O2EK2, C2EK8, C2NY3, C3EY10, O2EY1 bakterileri 80 °C'deki sıcaklığa dayanabilmişlerdir. Resim 4.8.'de endospor testi için 80 °C'de su banyosu uygulaması görünümü verilmiştir.



Resim 4.8. Endospor testi için 80 °C’de sıcak su uygulaması.

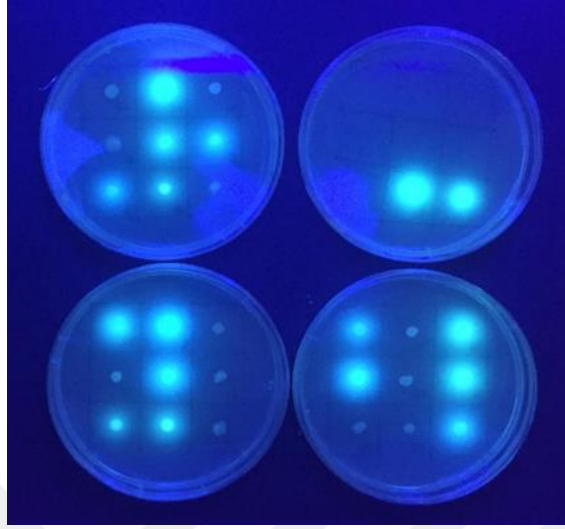
Gram boyama testine göre antagonist bakteriler ve ayrıca teste tabi tutulan U1, U26, HRO-C48, Ecc133 bakterilerin hepsi mikroskop incelemesine göre çubuk şekilli olup, A1NK1, A2NK1, A1NY3, A3NK3, O2EK2, C2EK8, O1EK2, C2NY3, C2NK3, O2EY1, C3EY10 bakterilerinin gram reaksiyonu pozitif sonuç vermiş, diğer bakteriler ise gram negatif olarak belirlenmiştir. Resim 4.9’da Gram reaksiyonu pozitif ve mor renk veren C3EY10 ile gram reaksiyonu negatif ve pembe renk veren O3NK2 izolatları verilmiştir.



Resim 4.9. Gram reaksiyonu pozitif ve mor renk veren C3EY10 ve gram reaksiyonu negatif ve pembe renk veren O3NK2 izolatları.

Antagonist bakterilerin UV ışık altında ışıma yapıp yapmadığını saptamak adına floresan pigment testi uygulanmıştır. Bu teste göre A3NK4, C1NK3, C3EK11, C3NK2, CBNK3, C3NY1, O1EK1, O2EK1, C2EK6, C1EK1 bakterileri yeşil pigment oluştururken, O3EK1, A1NK4, O3NK2, CBNK1, A1EK2, O3NK3, C1NK4 bakterileri mavi pigment oluşturmuştur. Hiçbir pigment oluşturmayan bakteriler ise CBEK3, A1NK1, A2NK1, A1NY3, A3NK3, O2EK2, C2EK8, O1EK2, C2NY3, C3EY10,

O2EY1, C2NK3 bakterileri olmuştur. Resim 4.10.'da antagonist bakterilerin uv ışık altındaki parlamaları verilmiştir.



Resim 4.10. King B besi yerindeki antagonist bakterilerin UV ışık altındaki ışımaları.

4.4. Antagonist Bakterilerin Etki Mekanizması Testleri

İkili kültür testlerinde etkili sonuç veren antagonist 29 bakteriye etki mekanizması testleri uygulanmıştır. Test sonuçları aşağıda Çizelge 4.4.' de verilmiştir.

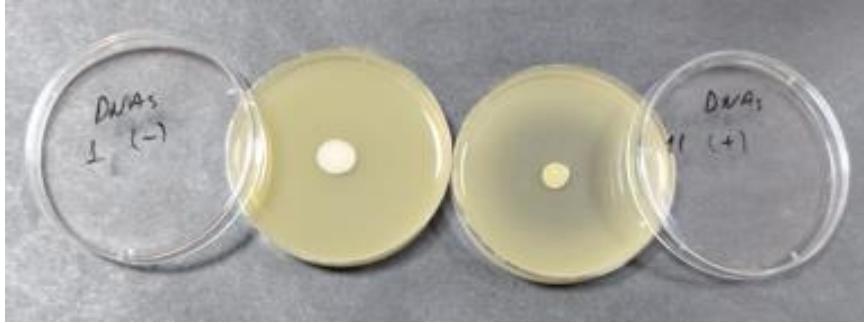
Çizelge 4.4 Antagonist bakterilerin etki mekanizması test sonuçları

İzolat	DNAz testi	Kitinaz testi	Proteaz testi	Siderofor testi
A3NK4	-	-	+	++
O3EK1	-	-	-	-
A1NK4	-	-	+	+
O3NK2	-	-	-	-
CBNK1	-	-	-	-
C1NK3	-	-	-	+
A1EK2	-	-	+	+
O3NK3	-	-	-	+
C1NK4	+	-	+	+
C3EK11	++	-	-	+
CBEK3	+++	+	+	+
C3NK2	-	-	+	+
CBNK3	-	-	+	+
A1NK1	-	-	-	-
A2NK1	++	-	+	-
A1NY3	-	-	-	-

C3NY1	-	-	+	+
O1EK1	-	-	-	+
A3NK3	+	-	+	-
O2EK2	++	-	+	-
O2EK1	-	-	-	+
C2EK8	+	-	+	-
O1EK2	-	-	+	-
C2EK6	-	-	+	+++
C2NY3	+	-	+	-
C1EK1	-	-	-	-
C3EY10	+	-	+	-
O2EY1	+	-	+	++
C2NK3	-	-	-	-
Ecc133	-	-	+	nt
HRO-C48	+++	++	+	nt

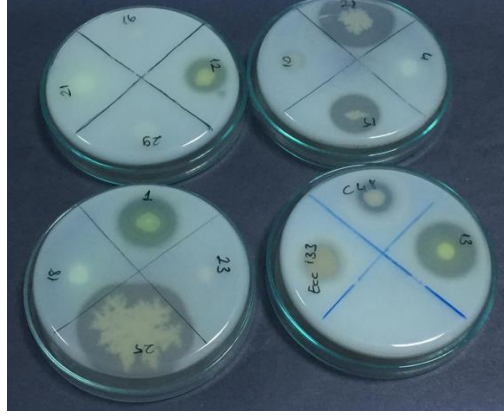
+: az zon oluşumu, ++: orta derece zon oluşumu, +++: fazla zon oluşumu, -: negatif veya zon oluşumu yok.

DNAz testine göre C1NK4, C3EK11, CBEK3, A2NK1, O2EK2, A3NK3, C2EK8, C2NY3, C3EY10, O2EY1 bakterileri pozitif sonuç vermiş olup DNA'yı parçalayabilen bakteriler olarak saptanmıştır. Resim 4.11.'de DNaz testi negatif ve pozitif sonuç veren bakterilerin görünümü verilmiştir



Resim 4.11. DNaz testi negatif sonuç (sol) ve pozitif sonuç veren bakteriler (sağ).

Proteaz testine göre antagonist bakterilerin proteaz enzimine sahip olan bakteriler besi yeri üzerinde açık zon oluşturmuşlardır. Teste göre; O3EK1, O3NK2, CBNK1, C1NK3, O3NK3, C3EK11, A1NK1, A1NY3, O1EK1, O2EK1, O1EK2, C1EK1, C2NK3 bakterileri negatif, diğerleri pozitifdir. Resim 4.12.'de proteaz pozitif sonuç veren bakterilerin engelleme zonlarının görünümü verilmiştir.



Resim 4.12. Proteaz testi engelleme zonları.

Antagonist bakterilerin kitini parçalayan enzim üretme potansiyeline bakıldığında CBEK3 bakterisinin kitini parçaladığı tespit edilmiş olup diğerlerin negatif değer almıştır. Resim 4.13.' te kitinaz testi pozitif olan HRO-C48 ve CBEK3 izolatının oluşturduğu engelleme zonu görünümü verilmiştir.



Resim 4.13. Kitinaz testi pozitif HRO-C48 (sol) ve CBEK3 (sağ) bakterileri.

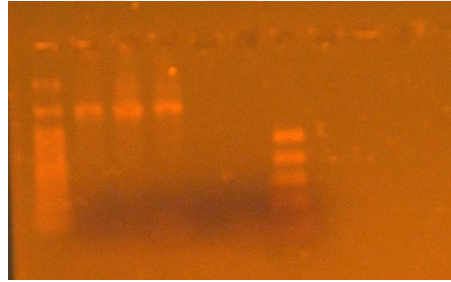
Antagonist bakterilerin siderofor üretilip üretilmediğini saptamak adına bu test uygulanmıştır. Test sonuçlarına göre O3EK1, O3NK2, CBNK1, A1NK1, A2NK1, A1NY3, A3NK3, O2EK2, C2EK8, O1EK2, C2NY3, C1EK1, C3EY10, C2NK3 bakterileri negatif sonuç vermiş diğer bakteriler pozitif sonuç vermiştir. Resim 4.14.'de siderofor testi pozitif sonuç veren bakterilerin görünümü verilmiştir.



Resim 4.14. Siderofor testi pozitif sonuç veren bakteri (sol üst).

4.5. Moleküler Tanılama Testleri

Yapılan ön değerlendirme testleri ile CBEK3, C2EK6 ve C2NK3 antagonist bakterilerinin saksı çalışmalarında kullanılmasına karar verilmiş ve saksı çalışmaları bu antagonistler ile yürütülmüştür. Saksı çalışmalarından sonra moleküler tanılama çalışmaları tamamlanmıştır. 16s rRNA sekans analizi şeklinde yürütülen çalışmalarda oluşan PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüleri Resim 4.15.'te verilmiştir.



Resim 4.15. Sekan çalışması için yapılan PCR'da oluşan ürünlerin jel elektroforez görüntüsü.

Macrogen firmasına yaptırılan sekans sonucunda, gelen gen dizilerine NCBI (National Center for Biotechnology Information) gen bankasında tarama yapıldığında Çizelge 4.5.'de gösterildiği üzere C2EK6 *Pseudomonas aeruginosa*, C2NK3 *Citrobacter freundii* ve CBEK3 *Stenotrophomonas maltophilia* olarak tanılanmıştır.

Çizelge 4.5 Antagonistlerin tür düzeyinde moleküler teşhis sonuçları

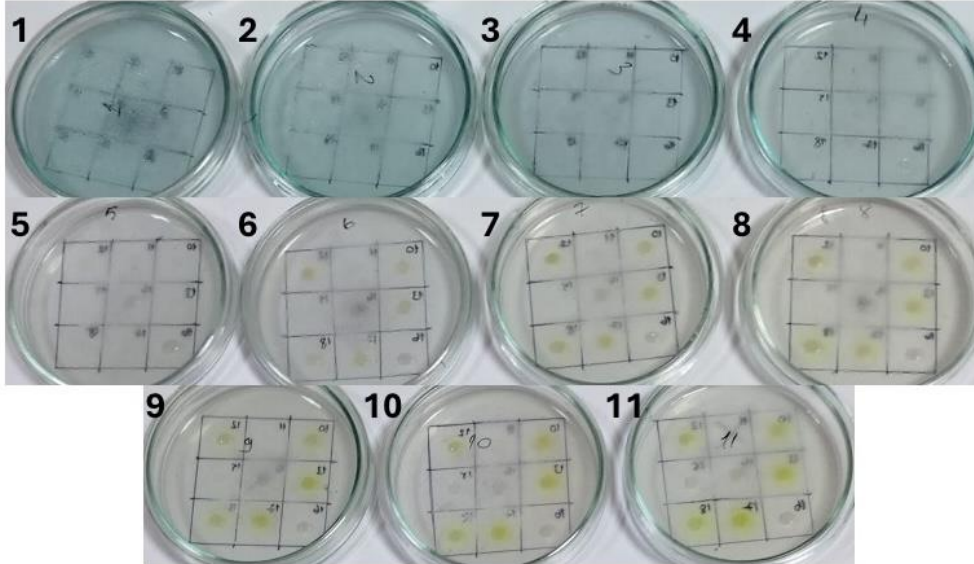
İzolat	Query Cover (%)	Percent ident (%)	Lenght (base)	Gaps (base)	Tür
C2EK6	100	100	976/976	0	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

C2NK3	100	99	433/438	0	<i>Citrobacter freundii</i>
CBEK3	100	99	906/907	1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>

4.6. Bakır Direnç Testi

4.6.1. Antagonist bakterilerin bakır direnç testi (ön çalışma)

İkili kültürde etkili bulunan antagonist bakterilerin bakıra olan duyarlılıkları bakır direnç testi ile değerlendirilmiştir. 15 mM'dan başlayarak alt dozları (1/2) şeklinde azalan dozlardaki petrilerde ilk gelişim geriliği gözlemlenen bakterinin bulunduğu petrideki konsantrasyon o bakterinin minimum inhibisyon değeri olarak ölçülmüştür. Gelişimin tamamen durduğu petrideki konsantrasyon ise minimum bakterisidal konsantrasyon olarak değerlendirilmiştir. Resim 4.16'da antagonist bakterilerin bakır direnci ön çalışması seyreltme serisinin petrilerdeki görünümü verilmiştir. Besi yerindeki gelişen bakterilerin MIC ve MBC değerleri Çizelge 4.6.'da verilmiştir.



Resim 4.16. Antagonist bakterilerin bakır direnci ön çalışması (Temsili seçilmiş 9 bakteri izolatu için [her petride aynı izolatlar], bakır konsantrasyonu 15 mM'dan [1] – 0 mM'a [11] kadar 1/2 doz azaltılmış).

Bakır direnci ön çalışmasında, Çizelge 4.6'ya bakıldığında; 8 izolat 0,94 – 1,88 mM arasında MIC değerine sahip olurken, bu izolatların MBC değerlerine bakıldığında 1,88 – 3,75 mM arasında olduğu bulunmuştur. Beş izolat 0,47 – 0,94 mM arasında MIC değerine sahip olurken, bunlardan 4 tanesinin MBC değeri 1,88 – 3,75 mM, diğerinin 0,94 – 1,88 arasında olduğu saptanmıştır. On iki izolat için 0,24 – 0,47 mM arasında MIC değerine sahip olurken, bunlardan birinin MBC değeri 3,75 – 7,50 mM, 7 izolatın MBC değeri 1,88 – 3,75 mM, 2 izolatın MBC değeri 0,94 – 1,88 mM, diğer 2 izolatın MBC değeri 0,47 – 0,94 mM, arasında olduğu saptanmıştır. Üç izolat 0,12 – 0,24 mM arasında MIC değerine sahip olurken, bunların MBC değerleri 0,47 – 0,94 mM arasında olduğu saptanmıştır. Bir izolat 0,60 – 0,12 mM MIC değerine sahip olurken, MBC değeri 0,94 – 1,88 mM olduğu belirlenmiştir. rpt 22 bakterisinin MIC değeri 0,94 – 1,88 arasında olurken, MBC değeri 1,88 – 3,75 mM arasında saptanmıştır.

Çizelge 4.6 15 mM Cu ve alt dozlarında gelişen bakterilerin MIC ve MBC değerleri.

Cu konsantrasyonu aralıkları (mM)												
	15,00 >	7,50 - 15,00	3,75 - 7,50	1,88 - 3,75	0,94 - 1,88	0,47 - 0,94	0,24 - 0,47	0,12 - 0,24	0,06 - 0,12	0,03 - 0,06	0,00 - 0,03	
rpt22												
A1NK1												
A1NY3												
C2EK6												
CBEK3												
O2EK1												
O3EK1												
O3NK2												
O3NK3												
A1EK2												
C1NK4												
CBNK1												
O1EK2												
C2NY3												
C2NK3												
A1NK4												
A3NK4												
C1NK3												
C3EK11												

Çizelge 4.7. 3,75 mM Cu ve alt dozlarında gelişen bakterilerin MIC ve MBC değerleri.

Cu konsantrasyonu aralıkları (mM)		3,75 >	3,38 - 3,75	3,00 - 3,38	2,63 - 3,00	2,25 - 2,63	1,88 - 2,25	1,50 - 1,88	1,13 - 1,50	0,75 - 1,13	0,38 - 0,75	0,00 - 0,38
rpt22												
O3EK1												
A1NK1												
A1NY3												
C2EK6												
CBEK3												
O2EK1												
O3NK3												
O3NK2												
A3NK4												
C3EK11												
C2NK3												

 MIC
 MBC

Bakır direnç testine göre 1 izolat 1,50 – 1,88 mM arasında MIC değerine sahip olurken, bu bakterinin MBC değeri 1,88 – 2,25 mM arasındadır. Beş izolat için MIC değeri 1,13 – 1,50 mM arasında belirlenirken, bu bakterilerin MBC değerleri 1,88 – 2,25 mM arasında saptanmıştır. İki izolat 0,75 – 1,13 mM arasında MIC değeri belirlenirken 1 tanesinin MBC değeri 2,25 – 2,63 mM arasında, diğerinin MBC değeri ise 1,88 – 2,25 mM arasında belirlenmiştir. Üç izolatın MIC değeri 0,38 – 0,75 mM arasında olurken, bunlardan ikisinin MBC değeri 1,50 – 1,88 mM, 1 izolatın MBC değeri 3,38 – 3,75 mM arasında belirlenmiştir. rpt22 bakterisinin MIC değeri 1,50 – 1,88 mM arasındayken MBC değeri 1,88 – 2,25 mM arasında belirlenmiştir.

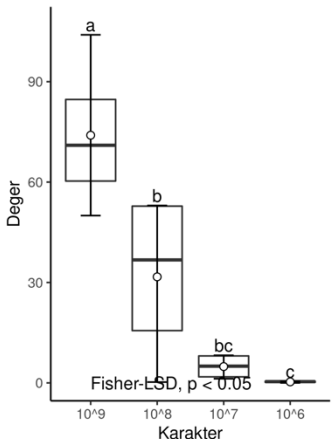
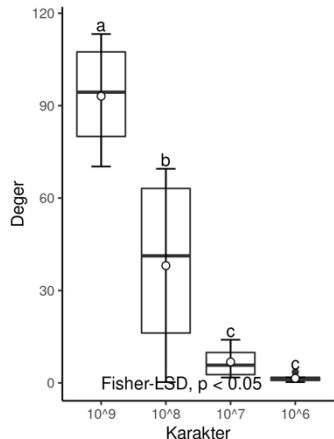
Buna göre bu 9 bakterinin içerisinde CBEK3 yapılan etki mekanizması testlerinde çoğunlukla pozitif sonuç vermesi, C2EK6 siderofor etkinliğinin yüksek olması, C2NK3 MBC ve MIC değerlerinin yüksek olmasından dolayı seçimi yapılmıştır.

4.7. Patojenisite Testi ve Uygun İnokulum Miktarlarının Belirlenmesi

Patojenisite ve uygun inokulum miktarının belirlenmesine yönelik çalışmalarda inokulasyondan 14 gün ve 17 gün sonraki benek sayımları sonucunda elde edilen sonuçlara göre 10^9 yoğunluğundaki inokulum miktarına göre benekler çok fazla ve iç içe geçmiş olmasından dolayı seçimi yapılmazken, 10^6 ve 10^7 yoğunluğundaki inokulum miktarlarında ise belirtilerin az olmasından dolayı seçimi yapılmamıştır. 10^8 yoğunluğundaki inokulum miktarı ideal benek sayısından dolayı en uygun inokulum miktarı olarak belirlenmiştir. Çizelge 4.8.'de farklı inokulum miktarlarında oluşan benek sayıları iki ayrı gün sayımları ile birlikte verilmiştir.

Çizelge 4.8 Farklı inokulum miktarlarındaki benek sayıları.

Inokulum	Inokulasyondan 14 gün sonra*	Inokulasyondan 17 gün sonra*
10^9	74,0 a	93,1 a
10^8	31,7 b	38,1 b
10^7	4,9 bc	6,81 c
10^6	0,3 c	1,5 c

	
---	--

4.8. Saksı Denemeleri

Başta bakır direnç testleri olmak üzere yapılan ikili kültür testleri ve biyokimyasal testler göz önünde bulundurularak saksı denemeleri için seçilen CBEK3, C2EK6, C2NK3

bakterileri hastalık etmenine karşı bakır varlığında ve yokluğunda hastalığa olan etkisinin belirlenmesi için inokulasyondan 2 hafta sonra üç günde bir sayımları yapılarak 4 tekerrürün yaprak başına düşen benek sayıları not edilmiştir. Bir tekerrürde 3., 4., 5. ve 6. yapraklardaki benek sayılarının ortalaması alınarak hesaplama yapılmıştır. Biyolojik olarak yüzde etkinlikleri abbott formülü ile hesaplanmıştır. Çizelge 4.9.'da saksı denemesindeki uygulamadan 24 gün sonra yaprak başına düşen benek sayıları ve pozitif kontrole göre yüzde etkisi verilmiştir. Çizelge 4.10.'da ise uygulanan karakterlerin bitki gelişimi üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir.

Çizelge 4.9 Saksı denemelerinde uygulamadan 24 gün sonra yaprak başına düşen benek sayıları ve pozitif kontrole göre yüzde etkisi.

Karakter	Benek sayısı*	Yüzde etki	
rpt22	28,0625 a		
rpt22_CBEK3	16,8750 b	%39	
rpt22_C2EK6	9,2500 c	%67	
rpt22_C2NK3	7,8125 c	%72	
rpt22_C2NK3_Cu	6,6875 c	%76	
rpt22_CBEK3_Cu	5,8750 c	%79	
rpt22_C2EK6_Cu	4,5675 c	%83	
rpt22_Cu	4,3175 c	%84	

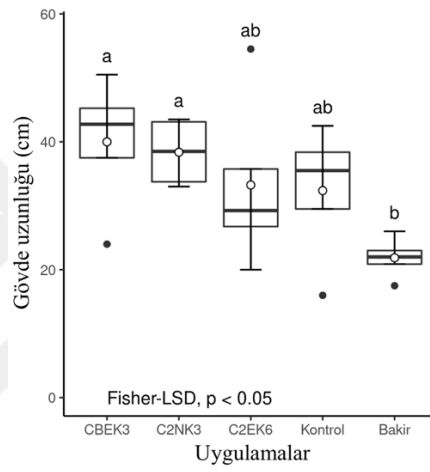
* 4 tekerrürün ortalamasıdır (bir tekerrürde 3., 4., 5. ve 6. yapraklardaki benek sayılarının ortalaması kullanılmıştır). Aynı harfle gösterilen değerler arasında istatistiki olarak fark yoktur, tek yönlü varyans analizi, LSD, $p < 0,05$.

Uygulamadaki kombinasyonlara bakıldığında bakırlı preparat olarak seçilen bakır oksiklorid %84 oranında bir etki gösterirken bakır varlığında hastalık etmenine en çok etki gösteren %83 oranında C2EK6 bakterisi daha sonra %79 oranında CBEK3 bakterisi daha sonra ise C2NK3 bakterisi etki göstermiştir. Bakır yokluğunda ise en fazla C2NK3 bakterisi %72 oranında, C2EK6 bakterisi %67 oranında ve CBEK3 bakterisi %39 oranında hastalık etmenine en az etki göstermiştir. Saksı denemesindeki uygulamadan 24 gün sonra yaprak başına düşen benek sayıları ve pozitif kontrole göre yüzde etkisi Çizelge 4.9.'da verilmiştir.

Çizelge 4.10 Antagonist bakterilerin bitki gelişimine etkisi.

	Uzunluk gövde (cm)*	Uzunluk kök (cm)	Yaş ağırlık gövde (g)	Yaş ağırlık kök (g)	Kuru ağırlık gövde (g)	Kuru ağırlık kök (g)*
CBEK3	40,00 a	17,38	15,97	0,36	1,77	0,22 ab
C2NK3	38,38 a	18,25	12,73	0,32	1,38	0,25 a
C2EK6	33,25 ab	11,50	9,76	0,16	0,96	0,10 ab
Kontrol	32,38 ab	12,63	8,91	0,20	0,74	0,08 ab
Bakır	21,88 b	13,13	9,67	0,07	1,00	0,04 b

* 4 tekrerrün ortalamasıdır, sütunlarda aynı harfle gösterilen değerler arasında istatistiki olarak fark yoktur, tek yönlü varyans analizi, LSD, $p < 0,05$.



Şekil 4.1. Antagonist bakterilerin bitki boyuna etkileri.

Çizelge 4.10.'da ve Şekil 4.1.'de antagonist bakterilerin bitki gelişimine etkisi verilmiştir. Hastalık ve bakır uygulamaları hariç tutulduğunda ve sadece antagonist bakteri uygulamaları değerlendirildiğinde; gövde uzunluğuna en fazla etki eden antagonist bakteri CBEK3 bakterisi, kök uzunluğuna en fazla etki eden bakteri C2NK3 bakterisi, gövde ve kök yaş ağırlığı ile gövde kuru ağırlığı en fazla etki eden bakteri CBEK3 bakterisi olmuştur. Kök kuru ağırlıkta en fazla etki gösteren bakteri C2NK3 bakterisi olmuştur.

5. TARTIŞMA

Bu çalışma *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* etmenine karşı kullanılan bakırlı preparatların zaman içerisinde etkisiz kalmasından dolayı kimyasal mücadeleye alternatif olarak bakıra toleranslı antagonist bakteriler ile hastalık gelişimini engelleme amacıyla yapılmıştır.

Çalışmadaki antagonist bakterilerin izolasyonu amacıyla Aydın ilinin 4 farklı ilçesinden, sağlıklı bitki örnekleri getirilerek laboratuvarda hem kök hem de yapraklardan 1 g bitki dokusundan endofitik ve epifitik bakteri izolasyonu yapılmıştır. Ardından ikili kültür testleri yapılarak etkinlikleri değerlendirilmiştir. Göldoğan vd. (2022) domates bakteriyel benek hastalığına yönelik biyolojik mücadele konulu çalışmasında laboratuvar stoklarında bulunan hastalık etmenine karşı Mersin ili Erdemli ve Toroslar ilçelerinde 18 domates tarlasından 36 adet bitkiden hem kök hem de kök bölgesi toprağından aldıkları örneklerden 10 g tartılarak antagonist bakteri izolasyonu yapmışlardır. İzolasyon sonucu 323 adet atagonist adayı bakteri izole etmişlerdir. Ayrıca laboratuvar stoklarında bulunan *Xanthomonas* cinsine ait antagonist bakteriler ile ikili kültür testleri uygulamışlardır. Bunun sonucunda 323 bakteriden 12 adet etkili antagonist bakterinin antimikrobiyal etkisi olduğunu saptamışlardır. Çalışmamda izole ettiğim bakterilerden ikili kültür sonucunda 87 adet antagonist adayı bakteri içerisinde 29 adet bakterinin antimikrobiyal etkinliği saptanmıştır.

Benlioğlu ve Benlioğlu (1998) domateste bakteriyel benek hastalığı etmeni *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* izolatlarının bakıra duyarlılıklarını ve dayanıklı olarak saptadıkları izolatlar karşı alternatif preparat belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada Ege Bölgesi'nin farklı illerinden bakteriyel benek hastalığı saptanan tarlalardan bitki örnekleri toplayarak 35 adet hastalık etmeni izolatu elde etmişlerdir. Bakıra duyarlılıkları için 0,4 – 2,8 mM aralıklı doz serilerinde bakırlı preparatlara, bazı fungusitlere ve bakır + fungusit uygulamalarında duyarlılıklarını MIC değeri ile saptamışlardır. Elde ettikleri sonuçlara göre 35 izolattan sadece 5 tanesi < 0,4 mM ile bakıra duyarlı olduğu saptanırken 25 tanesi değişen oranlarda bakıra duyarlı olduğunu saptamışlardır. Arasında pt22 izolatında bulunduğu diğer 5 izolat ise >2,8 mM ile yüksek derecede dayanıklı olduğunu saptamışlardır. Çalışmamda elde edilen 29 adet antagonist bakterinin ve rpt22

bakterisinin bakır sülfata olan duyarlılıklarını saptamak için ön çalışma olarak 15 mM ve alt dozlarında azalan bakır konsantrasyonunda test yapılmış ve içlerinden 9 bakteri belirlenmiştir. Daha sonra bu 9 bakteri ile 3,75 mM alt dozlarında 9:1 oranında azalan bakır direnç testi uygulanmıştır. Bakıra olan duyarlılıkları minimum inhibisyon konsantrasyonu (MIC) ve minimum bakterisidal konsantrasyonu (MBC) belirlenmiştir. Bakıra direnç gösteren antagonist bakteriler ile hastalık etmeni karşılaştırması saksı çalışmasında değerlendirilmiştir. Benzer olarak Cooksey vd. (1993) yaptıkları araştırmada *Phytophthora* kök çürüklüğü görülen ve yoğun bakır uygulaması yapılan bir narenciye bahçesinin toprağından izole ettikleri antagonist *Pseudomonas fluorescens* bakterisinin bakırlı preparatlara direncini saptamak için yaptıkları bakır direnç testinde MIC değerini 1,6 mM saptamışlardır. *Pseudomonas fluorescens* bakterisinin bakır uygulaması yapılan alanlarda bakıra direnç gösteriyor olması *Phytophthora* biyokontrolünde önemli olduklarını vurgulamışlardır. Yine Eğerci vd. (2021) yaptıkları çalışmada bitki patojeni bakterilerin oluşturduğu hastalıklara karşı yoğun olarak kullanılan bakırlı preparatların giderek etkisiz kalması nedeniyle, laboratuvar stoklarında bulunan 33 bakteri izolatının farklı bakırlı preparatlara duyarlılıklarının tespiti için bir çalışma yapmışlardır. İlk olarak bakır sülfata duyarlılıkları belirlenen bakterilerin ED₅₀ değerleri 0,55 µg/ml ile 1,3 µg/ml ve MIC değerleri 0,7 mM ile 2 mM saptanan 6 izolat farklı bakırlı preparatlarla test edilmiştir. ED₅₀ ve MIC değerlerine bakıldığında sıvı bakır sülfat ve nano bakır preparatlarına karşı izolatların duyarlı olduğu saptanmışlardır.

Saksı denemesi için seçilen 3 antagonist bakterinin moleküler tanılaması sonucunda CBK3 bakterisi *Stenotrophomonas maltophilia*, C2NK3 bakterisi *Citrobacter freundii*, C2EK6 bakterisi *Pseudomonas aeruginosa* olarak belirlenmiştir. Berg vd. (1999) ile Denton vd. (1998) *Stenotrophomonas maltophilia* bakterisini doğal çevreden, su kaynaklarından ve hastane ortamından izole edilebilecek bitki kökü ile ilişkili bir bakteri olarak nitelendirmişlerdir. Literatürde yulaf, buğday, salatalık, mısır ve patatesin rizosferinden elde edildiği bildirilmiş ve tarımda bitki fungal patojenlere karşı biyokontrol ajanı olarak kullanıldığı bildirilmiştir. Yine *Stenotrophomonas maltophilia* ile ilgili Tunçel (2018) yaptığı çalışmasında bu bakterinin doğada yaygın olarak bulunduğunu böcek ve hayvan patojeni olabileceğini, bitkilerde bitki gelişimini teşvik ettiğini bitki iyileştirmede ve biyokontrolde rol oynadığını vurgulamıştır. Araujo vd. (2001) endofitik bakterilerin bitki gelişimine etkisini ve biyolojik mücadele etmeni olarak yaptıkları çalışmasında limon ağacı köklerinden izole ettikleri ve içlerinde insan patojeni

olan *Citrobacter freundii*'nin ve *Pseudomonas aeruginosa*'nında bulunduğu çeşitli endofit antagonist bakterinin izolasyonu yapılmış ve bazı kök patojenlerine karşı biyolojik mücadele etmeni görevi üstlendiğini bildirmiştir. Silva Vasconcellos vd. (2014)'te yaptıkları çalışmasında *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*'ye karşı *Pseudomonas aeruginosa* tarafından üretilen metabolitlerin antibiyotik aktivitesi laboratuvar ve sera koşullarında test edilmiş ve bu patojenin mücadelesinde kullanılabileceğini bildirmişlerdir. Bu literatürlere bakıldığında izole edilen bakteriler her ne kadar insan patojeni de olsa doğrudan ya da dolaylı olarak bitki gelişimini etkiledikleri ya da bitki hastalıklarını engellemede etkili olduğu görülmektedir.

Saksı çalışmaları için seçilen CBEK3, C2EK6 ve C2NK3 bakterileri, bakır ve hastalık etmeni ile kombinasyonu yapılarak bakır varlığında hastalık etmenine etkisi, bakır yokluğunda hastalık etmenine etkisi ve sadece bakır sülfatın hastalık etmenine etkisi değerlendirilmiştir. Bu çalışmaya benzer olarak Cooksey (1988) yaptığı çalışmasında domates bakteriyel benek hastalığının kontrolünde kullanılan bakırlı preparatların etkisiz kaldığını bu doğrultuda domates tarlarından izole ettiği bakıra duyarlı PT12 bakterisi ve bakıra orta dereceli duyarlı olan PT23.200 ve PT23.201 antagonist bakterileri ile birlikte bakır hidroksit etkili maddeli bir bakırlı preparatı kombine ederek bir çalışma yapmış ve sonuç olarak domates bitkisinde hastalık şiddetini önemli derecede azalttığını saptamış ve bu saptanan biyolojik etkinin bakırlı prepatlarla entegre edilerek geliştirilmesi gerektiğini bildirmiştir.

Antagonist bakterilerin bitki gelişimini etkisini değerlendirdiğimizde negatif kontrole göre bitkileri pozitif yönde etkilediğini görmekteyiz. Bitkilere uygulanan bakır uygulaması ise bitkinin gelişimini pozitif yönde katkısı olmadığını yapılan testlerde gözlemlenmiştir. Uğur ve Eser (2000), domates bitkisinde bitki gelişimi yönünden yaptıkları bir çalışmada fide gelişimini baskılayan ve aralarında bakır sülfatında bulunduğu birkaç bitki gelişim düzenleyicisi ile birlikte bir uygulama yapmıştır. Sonuç olarak bakır sülfat uygulamasının fide gelişiminde baskılayıcı etkisini saptamışlardır.

6. SONUÇ

Çalışmada, Aydın ilinin 4 farklı ilçelerinden, toplam 10 adet sağlıklı bitki örneği toplanarak, bitkilerin hem kök hem de yapraklarından 87 adet antagonist adayı bakteri izole edilmiştir. Bu antagonist adaylarının 30 tanesi İncirliova'dan, 21 tanesi Ortaklar'dan, 28 tanesi Çine'den ve 8 tanesi de Koçarlı'dan getirilen bitkilerden elde edilmiştir.

Elde edilen 87 antagonist adayı bakteriye rpt22 bakterisi ile ikili kültür testi uygulanarak antimikrobiyal etkisi oluşturdıkları engelleme zonları ile ölçülmüştür. En fazla engelleme zonu oluşturan bakteri 24,71 mm ile A3NK4 bakterisi olurken en az engelleme zonu oluşturan bakteri 2,32 mm ile C2NK3 bakterisi olmuştur.

Etkili bulunan 29 adet antagonist bakteriye ön tanımlama ve etki mekanizması testleri uygulanmıştır. Gram boyamada bütün bakteriler çubuk şekilli olmakla birlikte, 11 tanesi Gram pozitif olarak bulunmuştur. King B besi yerinde UV ışık altında floresan pigment testinde 17 adet bakteri ışığa verirken, patates yumuşak çürüklük testinde 2 adet bakteri çürümeye neden olmuştur. Tütünde aşırı duyarlılık testinde hiçbir bakteri pozitif reaksiyon vermemiştir. Endospor testinde 6 adet bakteri endospor oluşturmıştır. DNaz testinde 10, proteaz testinde 16, kitinaz testinde 1, siderofor testinde 15 adet bakteri pozitif reaksiyon vermiştir.

Bakır direnç testi ön çalışma ile antagonist bakterilerin bakıra olan duyarlılıkları 15 mM'dan başlayarak alt dozları 1/2 olacak şekilde azalan dozları değerlendirilerek MIC ve MBC değerleri belirlenmiştir. Burada diğerlerine göre yüksek bakır dayanıklılığı gösteren 9 antagonist bakterinin nihayi MIC ve MBC değerlerinin saptanması için yapılan çalışma sonucunda; bir izolat 1,50 – 1,88 mM arasında MIC değerine sahip olurken, bu bakterinin MBC değeri 1,88 – 2,25 mM arasında bulunmuştur. Beş izolat için MIC değeri 1,13 – 1,50 mM arasında belirlenirken, bu bakterilerin MBC değerleri 1,88 – 2,25 mM arasında saptanmıştır. İki izolat 0,75 – 1,13 mM arasında MIC değeri belirlenirken, bir tanesinin MBC değeri 2,25 – 2,63 mM arasında, diğer bakterinin MBC değeri ise 1,88 – 2,25 mM arasında belirlenmiştir. Üç izolatın MIC değeri 0,38 – 0,75 mM arasında olurken, 2 izolatın MBC değeri 1,50 – 1,88 mM, bir izolatın MBC değeri 3,38 – 3,75 mM arasında belirlenmiştir. rpt22 bakterisinin MIC değeri 1,50 – 1,88 mM arasındayken MBC değeri 1,88 – 2,25 mM arasında belirlenmiştir. Çalışma planında saksı denemeleri

aşamasında 3 etkili antagonist ile deneme yapılacağından dolayı bakır çalışmalarında bakteri seçimi sınırlandırılarak 3 bakteri seçilmiştir. Buna göre CBEK3 yapılan etki mekanizması testlerinde çoğunlukla pozitif sonuç vermesi, C2EK6 siderofor etkinliğinin yüksek olması, C2NK3 bakterisinin MBC değerinin yüksek olmasından dolayı seçilmiştir.

Saksı denemeleri için seçilen CBEK3, C2EK6, C2NK3 bakterileri hastalık etmenine karşı bakır varlığında ve yokluğunda hastalığa olan etkisinin belirlenmesi için yapılan uygulamadaki kombinasyonlara bakıldığında bakırlı preparat olarak seçilen bakır oksiklorid %84 oranında bir etki gösterirken, bakır varlığında hastalık etmenine en çok etki gösteren %83 oranında C2EK6 bakterisi, daha sonra %79 oranında CBEK3 bakterisi daha sonra ise C2NK3 bakterisi etki göstermiştir. Sadece antagonist bakterilerin hastalık etmenine olan etkisi değerlendirildiğinde ise C2NK3 bakterisi %72 oranında, C2EK6 bakterisi %67 oranında ve CBEK3 bakterisi %39 oranında hastalık etmenine en az etki göstermiştir.

Hastalık ve bakır uygulamaları hariç tutulduğunda ve sadece antagonist bakteri uygulamalarının bitki gelişimine olan etkileri değerlendirildiğinde; gövde uzunluğuna en fazla etki eden antagonist bakteri CBEK3 bakterisi, kök uzunluğuna en fazla etki eden bakteri C2NK3 bakterisi, gövde ve kök yaş ağırlığı ile gövde kuru ağırlığı en fazla etki eden bakteri CBEK3 bakterisi olmuştur. Kök kuru ağırlıkta en fazla etki gösteren bakteri C2NK3 bakterisi olmuştur.

Çalışmada, bitkilerin hem kök hem de yapraklarından izole edilen antagonist bakterilerin; ikili kültür testlerinde etkili engelleme zonları oluşturdıkları, etki mekanizması testlerinde dikkate değer özellikler sergiledikleri ve çalışmanın asıl amacını oluşturan bakır direnç testleri sonucunda da bakıra dirençli oldukları belirlenmiştir.

Elde edilen antagonistler içerisinde seçilen üç bakterinin saksı çalışmasında iyi sonuçlar verdiği görülmüştür. Moleküler tanılaması ile her ne kadar insan patojenleri içinde anılıyor olsalar da, bitki gelişimi üzerindeki ve bitki hastalıklarını engellemedeki etkisi yapılan literatürlerde yerini almıştır. Ancak insanlar için risk faktörü olarak değerlendirilen bu antagonistleri doğrudan tarımda kullanmak yerine dolaylı olarak fayda sağlanabilir. Bu bağlamda elde edilen bakterilerin biyoteknoloji çalışmalarıyla desteklenerek tarımda fayda sağlayan bakteriler olarak kullanılabilme potansiyelleri vardır.

KAYNAKLAR

- Anonim, (2025). <https://bku.tarimorman.gov.tr/Kullanim/TavsiyeArama>
- Agrios, G. N. (1997). Plant pathology. Fourth edition Academiz press, London.
- Al-Remi, F. (2018). Domates bitkisi ve in vitro çoğaltımı (Tomato Plant and Its In Vitro Micropropagation). *Journal of Engineering Technology and Applied Sciences*, 3(1), 55-73.
- Andersen, G. L., Menk İssoglou, O. ve Lindow, S. E. (1991). Occurrence and properties of copper-tolerant strains of *Pseudomonas syringae* isolated from fruit trees in california. *Ecology and Epidemiology*, 81(6), 648-656.
- Araujo, W. L., Maccheroni, W., Jr., Aguilar Vildoso, C. I., Barroso, P. A. V., Saridakis, H. O., and Azevedo, J. L. (2001). Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. *Journal of Microbiology*, 47, 229-236.
- Araujo, P., Lemos, M., Mergulhão, F., Melo, L., Simões, M. (2011). Antimicrobial resistance to disinfectants in biofilms. *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*, Edited by A. Mendez Vilas, Formatex Research Center, Badajoz.
- Arvas, Y.E. (2017), *Genetiği Değiştirilmiş Bitkiler ve Tanısı.* , Düsseldorf, Germany: Lambert Yayınevi.
- Baker, G. C., Smith, J. J. ve Cowan, D. A. (2003). Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *Journal of Microbiological Methods*, 55, 541- 555.
- Benlioğlu, K., Benlioğlu, S. (1998). *Pseudomonas syringae* pv *tomato* ' ya karşı bakır dayanıklılığı üzerinde çalışmalar. 8. *Türkiye Fitopatoloji Kongresi*, 52.
- Berg, G. (1996). Rhizobacteria of oilseed rape antagonistic to *Verticillium dahliae* ver. *longisporum* STRAK. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, 103(1), 20-30.

- Berg, G., Nicolle, R. ve Smalla, K. (1999). Genotypic and phenotypic relationships between clinical and enviromental isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(3), 594-600.
- Berg, G., Frankowski, J., and Bahl, H. (2000). Interactions between *Serratia plymuthica* and the soil borne pathogen *Verticillium longisporum*. In *Advances in Verticillium Research and Didease Management*. Tjamos, E. C., C. Rowe, J.B. Heale, D.R. Fravel (eds). St Paul, MN, USA: *American Phytopathological Society Press*, 269-273.
- Bonnet, R. (2004). Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(1), 1- 14.
- Bradbury, J.F. (1970). Isolation and preliminary study of bacteria from plants. *Plant Pathology*, 49, 213–218.
- Bridier, A., Briandet, R., Thomas, V., Brissonnet, F.D. (2011). Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review. *Biofouling*, 27(9), 1017-1032.
- Bruins, M. R., Kapil, S. ve Oehme, F. W. (2000). Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 45, 198-207.
- Cazorla, F.M., Arrebola, E., Sesma, A., Perez-Garcia, A., Codina, J.C., Murillo, J., Vicente, A. (2002). Copper resistance in *pseudomonas syringae* strains isolated from mango is encoded mainly by plasmids. *Phytopathology*, 98(8), 909. doi:10.1094/PHYTO.2002.92.8.909.
- Cooksey, D.A., Bender, C. L. (1986). Indigenous plasmids in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*: conjugative transfer and role in copper resistance. *Journal of Bacteriology*, 165(2), 534-541.
- Cooksey, D. A. (1988). Reduction of Infection by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* Using a Nonpathogenic, Copper-Resistant Strain Combined with a Copper Bactericide. *Phytopathology*, 78(5), 601-603.
- Cooksey, D.A. (1990). Genetics of bactericide resistance in plant pathogenic bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, 28, 201-219.
- Cooksey, D.A. (1993). Copper uptake and resistance in bacteria. *Molecular Microbiology*, 7(1), 1–5.

- Cox, C.D. (1994). Deferration of laboratory media and assays for ferric and ferrous ions. *Methods Enzymology*, 235, 315-372.
- Denton, M., Todd, N.J., Kerr, K.G., Hawkey, P.M., Littlewood, J.M. (1998). Molecular epidemiology of *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from patients with cystic fibrosis and associated environmental samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(195), 3-8.
- Dönmez, A. E., Kalay, M., Özkan, F., Koyuncu, C.E. (2006). FMC ve malahat yeşili sağaltım dozlarının *Oreochromis niloticus*'un bazı kan parametrelerinde meydana getirdiği değişimler. *Ege Üniversitesi, Su Ürünleri Dergisi*, 23, 61-64.
- Ehrlich, H. L. (1997). Microbes and Metals. *Applied Microbiology and Biotechnolog*, 48, 687- 692.
- Eğerci, K., Özaktan, H., Aysan, Y. (2021). Bazı bitki patojeni ve saprofitik bakterilerin bakırlı bileşiklere karşı duyarlılık düzeylerinin araştırılması. *The Journal of Turkish Phytopathology*, 50(1), 1-7.
- Favier, A. (1998). Is zinc a cellular mediator in the regulation of apoptosis. *Metal Ions in Biology and Medicine*, 5, 164.
- FAO, (2023). Food and Agriculture Organization of the United Nations. <https://www.fao.org/faostat>.
- Griffin, K.L. (2018). *Copper tolerance in Pseudomonas syringae pv. tomato isolates from tomato crops in eastern australia*. [Doctoral Thesis, Central Queensland University Australia].
- Gülcan, S. (2006). *Çeşitli Kaynaklardan İzole Edilen Pseudomonas Cinsi Bakterilerin Ağır Metal ve Naftalin Toleransı*. [Yüksek lisans tezi, Pamukkale Üniversitesi Denizli].
- Güldoğan, Ö., Aktepe, B.P., Aysan, Y. (2022). Domates bakteriyel benek hastalığının biyolojik mücadelesinde farklı *Bacillus* türlerinin kullanımı. *Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 19(4), 829-839.
- Jeffries, C. D., Holtmann, D. F., Guse, D. G. (1957). Rapid method for determining the activity of microorganisms on nucleic acid. *Journal of Bacteriology*, 590-591

- Kaya, N., Karnez, E., Aktepe, B. P., Aysan, Y. (2022). Domates öz nekrozu hastalığına vermikompost, mikoriza ve potasyum gübrelemesinin etkinliğinin belirlenmesi. *Mustafa Kemal Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 27(2), 299 – 308. <https://doi.org/10.37908/mkutbd.1087472>
- Keane, P. J., Kerr, A. ve New, P. B. (1970). Crown gall of stone fruit. II Identification and nomenclature of *Agrobacterium* isolates. *Australian Journal Biological Sciences*, 23, 585-595.
- Kiracı, S., Karataş, A. (2015). Organik domates yetiştiriciliğinde bitki aktivatörü uygulamalarının verim ve kalite üzerine etkisi. *Adnan Menderes Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 12(1), 17-22.
- Kiaune, L., Singhasemanon, N. (2011). Pesticidal copper (I) oxide: environmental fate and aquatic toxicity. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 213, 1-26.
- King, E.O., Ward, M.K., Raney, D.E. (1954). Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 44, 301– 307.
- Klement, Z. (1968). Pathogenicity factors in regard to relationships of phytopathogenic bacteria. *Phytopathology*, 58, 1218–1222.
- Kovacs, N. (1956). Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. *Nature*, 178, 703.
- Kurze, S., Bahl, H., Dahl, R., and Berg, G. (2001). Biological control of fungal strawberry disease by *Serratia plymuthica* HRO-C48. *Plant Disease*. 85,529-534.
- Krechel, A., Faupel, A., Hallmann, J., Ulrich, A., ve Berg, G. (2002). Potato-associated bacteria and their antagonistic potential towards plant-pathogenic fungi and the plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood. *Canadian Journal Of Microbiology*, 48(9), 772-786. <https://doi.org/10.1139/W02-071>
- Langsrud, S., Sidhua, M.S., Heir, E., Holck, A.L. (2003). Bacterial disinfectant resistance a challenge for the food industry. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 51, 283-290.

- Lambert, P.A. (2005). Bacterial resistance to antibiotics: modified target sites. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57(10), 71-85.
- Loh, Y. T., Martin, G. B. (1995). The disease resistance gene Pto and the fenthion-sensitivity gene Fen encode closely related functional protein kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92, 4181-4184.
- Marco, G. M., Stall, R. E. (1983). Control of bacterial spot of pepper initiated by strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* that differ in sensitivity to copper. *Plant Disease*, 67, 779-781.
- Mirik, M., Aysan, Y., Özden, Ç. (2007). Copper resistans strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (Doidge) Dye in the eastern Mediterranean region of Turkey. *Journal Of Plant Pathology*, 98(1), 153-154.
- Munita, J.M., Arias, C.A. (2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology Spectrum*. 4(2), doi:10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015.
- Nikaido, H. (1994). Prevention of drug access to bacterial targets: Permeability barriers and active efflux. *Science*, 264(5157), 382-8.
- Özyılmaz, Ü. (2007). *Aydın ilinde çilek kök hastalıklarına karşı antagonist bakterilerle biyolojik savaş*. [Doktora tezi, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü].
- Özbey, E. (2014). *Deinococcus radiodurans ve Rekombinantlarının Uv-C, Ağır Metal Dirençliliği ve Biyosorpsiyon Yeteneği*. [Doktora tezi, İnönü Üniversitesi].
- Özbolat, G., Tuli, A. (2016). Ağır metal toksisitesinin insan sağlığına etkileri. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 25(4), 502-521.
- Rajendran, P., Muthukrishnan, J. And Gunasekaran, P. (2003). Microbes in heavy metal remediation. *Indian Journal of Experimental Biology*, 41, 935-944.
- Ramirez, M.G., Avelizapa, L.I.R., Avelizapa, N.G.R., and Camarillo, R.C. (2004). Colloidal chitin stained with Remazol Brilliant Blue, a useful substrate to select chitinolytic microorganisms and to evaluate chitinases. *Journal of Microbiological Methods* 56, 213-219.

- Reid, J.D. ve Ogrydziaka, D.M. (1981). Chitinase-Overproducing Mutant of *Serratiamarcescens*. *Applied And Environmental Microbiology*, 41(3), 664-669.
- Trevors, J.T. (1987). Copper resistance in bacteria. *Microbiology Society*, 4(1), 29-31.
- Tunçel, T. (2018). *Stenotrophomonas maltophilia*'nın neden olduğu bakteriyemilerde tedavi ve prognostik faktörlerin retrospektif olarak analizi. [Doktora tezi, Uludağ Üniversitesi].
- TÜİK, (2024). Türkiye İstatistik Kurumu. <https://www.tuik.gov.tr>
- Uğur, A. ve Eser, B. (2000). Domates fidelerinde büyümenin kontrolü. *III. Sebze Tarımı Sempozyumu, Bildiri Kitabı*, Süleyman Demirel Üniversitesi Basım Evi, Isparta, s.61-63.
- Verraes, C., Boxstael S.V., Meervenne, E.V., Coillie, E.V., Butaye, P., Catry, B., Schaetzen, M.A., Huffel, X.V., Imberechts, H., Dierick, K., Daube, G., Saegerman, C., Block, J.D., Dewulf, J., Herman, L. (2013). Antimicrobial resistance in the food chain: a review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10, 2643-2669.
- Sandrin, T. R. and Maler, R. M. (2003). Impact of metals on the biodegradation of organic pollutants. *Environment Health Perspectives*, 111(8), 1093-1101.
- Saygılı, H., Şahin, F., Aysan, Y. (2006). *Fitobakteriyoloji*. pp 148, İzmir,
- Saygılı, H., Sahin, F., Aysan, Y. (2008). *Bitki bakteri hastalıkları* Meta press pp. 123-126.
- Schwyn, B., and Neilands, J.B. (1987). Universal Chemical Assay for the Detection and Determination of Siderophores. *Analytical Biochemistry*, 160, 47-56.
- Silva Vasconcellos, F. A., de Oliveira, L., Lopes-Santos, A., Oliveira Beranger, M., Torres Cely, A., Simionato, J., Pistori, F., Spago, J., de Mello, J., San Martin, C., Jesus Andrade, Andrade, G. (2014). Evaluation of antibiotic activity produced by *Pseudomonas aeruginosa* LV strain against *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*. *Agricultural Sciences*, 5, 71-76.
- Silver, S. (1998). Genes for all metals – a bacterial view of the periodictable the thom award lecture. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 20, 1-12.

- Sundin, G.W., Jones, A.L., Fulbright, D.W. (1989). Copper resistance in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* from cherry orchards and its associated transfer in vitro and in planta with a plasmid. *Phytopathology*, 79(8), 861–865.
- Yüksek, A. (2018). *İslam Hukukuna Göre Helal Gıda ve GDO'lu Ürünler*. (Genetiği Değiştirilmiş Organizmalar). Bişkek: İz Basma.
- Zhang, Z, Schwartz, S., Wagner, L., ve Miller, W. (2000). A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational Biology*, 7(1-2), 203-14.
- Zhang, S., Fu, Y., Mersha, Z., Pernezny, K., (2017). Assessment of copper resistance in *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, the pathogen of halo blight on snap bean. *Crop Protection*, 98, 8–15.

ÖZGEÇMİŞ

Soyadı, Adı : SAKAL Yeliz

Yabancı Dil : İngilizce

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet tarihi(Yıl)
Lisans	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Ziraat Fakültesi/Bitki Koruma	2021

İŞ DENEYİMİ

Yıl	Yer/Kurum	Ünvan
2025-	Tire/İzmir /AgroTeira Zirai İlaç Tohum Gübre Bayisi	Ziraat Mühendisi

AKADEMİK ÇALIŞMALAR

BİLDİRİLER

Uluslararası Kongrelerde Yapılan Bildiriler

Sakal Y ve Özyılmaz Ü. (2025). Biological control of bacterial speck of tomato (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) using copper-tolerant antagonist bacteria. *ISPEC 17th International Conference on Agriculture, Animal Sciences and Rural Development*, April 25-27, 2025 / Kırşehir, Türkiye.