



T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ENDOFİT ve EPİFİT BAKTERİLERİN TURUNÇGİLLERDE SORUN
OLAN BAZI FUNGAL PATOJENLERE KARŞI *in vitro* BİYOKONTROL
ETKİNLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

YUSUF GÜMÜŞ

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**HATAY
ARALIK-2022**



T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ENDOFİT ve EPIFİT BAKTERİLERİN TURUNÇGİLLERDE SORUN
OLAN BAZI FUNGAL PATOJENLERE KARŞI *in vitro* BİYOKONTROL
ETKİNLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

YUSUF GÜMÜŞ
ORCID:0000-0001-7818-1831

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Danışman
Prof. Dr. EMİNE MİNE SOYLU
ORCID:0000-0001-5961-0848

HATAY
ARALIK-2022

02/12/2022

TEZ BİLDİRİMİ

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

Yusuf GÜMÜŞ

ÖZET

ENDOFİT ve EPIFİT BAKTERİLERİN TURUNÇGİLLERDE SORUN OLAN BAZI FUNGAL PATOJENLERE KARŞI *in vitro* BİYOKONTROL ETKİNLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Ülkemiz için stratejik bir ürün olan turunçgil (*Citrus* spp.) türleri, ekonomik ihracat değerleri ve yaygın yerel tüketimleri nedeniyle Türkiye’ de önemli bir meyve olarak kabul edilmektedir. Antraknoz (*Colletotrichum* spp.), *Fusarium* solgunluğu ve kuru kök çürüklüğü (*Fusarium* spp.) ve ekşi çürüklük (*Geotrichum citri-aurantii*) gibi fungal hastalıklar turunçgillerde ciddi verim ve kalite kayıplarına neden olur. Bu tür hastalıklarla mücadelede güvenilir ve çevre dostu yöntem olarak büyük potansiyel kontrol stratejilerinden biri de antagonist ve bitki gelişimini teşvik eden bakteriyel izolatların kullanıldığı biyolojik mücadeledir. Bu çalışmada, sağlıklı turunçgil ağaçlarından elde edilen endofit ve epifit bakteri izolatların izolasyonu, tanılanması ve *G. citri-aurantii*, *C. gloeosporioides* ve *F. solani*’ye karşı *in vitro* antagonistik potansiyellerinin belirlenmesinin yanı sıra bitki gelişimini teşvik etmede ve antagonistik etkinlikte rol oynayan olası mekanizmalarının karakterize edilmesi amaçlanmıştır.

Sağlıklı ağaçların toprak altı ve üstü bölgelerinden elde edilen 48 izolat MALDI-TOF MS ile tanılanmıştır. İkili kültür testlerinde *Bacillus vallismortis* YGL73ep, *Bacillus cereus* YGK25en ve *Pseudomonas chlororapsis* YGM82ep izolatları *G. citri-aurantii*’nin misel gelişimini %73.3-77.2 oranlarında; *Bacillus thuringiensis* YGT22en, *Bacillus vallismortis* YGL73ep, *Bacillus cereus* YGK25en ve *Pseudomonas chlororaphis* YGM82ep izolatları *C. gloeosporioides*’in misel gelişimini %65.5-72.7 oranlarında; *Bacillus subtilis* YGS5en, *Bacillus cereus* YGK25en, ve *Pseudomonas chlororapsis* YGM82ep izolatları *F. solani*’nin misel gelişimini %71.1-66.1 oranlarında engelleyen en güçlü antagonist izolatlar olarak belirlenmiştir. Etkili antagonist bakteri izolatlarından olan *Pseudomonas chlororapsis* YGM82ep, *Bacillus vallismortis* 73YGep, *Bacillus thuringiensis* 22YGen ve *Bacillus cererus* 25YGen tarafından üretilen uçucu organik bileşiklerin (VOC’s) *in vitro* ikili kültür testlerinde test edilen hastalık etmenlerinin misel gelişimlerini önemli ölçüde engellediği gözlenmiştir.

Test edilen 25 bakteri izolatın, 20 tanesi siderofor, 24 tanesi amonyak, 19 tanesi protease, 5 tanesi ise HCN üretiminde pozitif olarak kayıt edilmiştir. Test edilen 25 bakteri izolatının 21’i 1.84-69.68 µg/ml konsantrasyon aralığında değişen miktarda IAA üretmiş olup, 7 izolat fosforu çözebilme yeteneğinde olduğu belirlenmiştir. İzolatlar arasında *Pseudomonas koreensis* YGL72ep, *Pseudomonas chlororaphis* YGM82ep ve *Bacillus simplex* YGS12ep en fazla IAA üreten, *Rahnella aquatilis* YGP63ep, *Raoultella ornithinolytica* YGP64en ve *Pseudomonas koreensis* YGL72ep ise en fazla fosforu çözen izolatlar olarak belirlenmiştir.

Sonuç olarak güçlü antagonistik ve PGP etkinlikleri gösteren, özellikle *Bacillus* spp. ve *Pseudomonas chlororaphis* izolatların *Geotrichum citri-aurantii*, *Colletotrichum gloeosporioides* ve *Fusarium solani* tarafından neden olunan hastalıkların baskılanmasında biyolojik mücadele etmeni olarak geliştirilebilmesinin yanısıra biyogübre olarakta kullanılma potansiyeline sahip olabileceği belirlenmiştir.

2022, 93 sayfa

Anahtar Kelimeler: Antraknoz, ekşi çürüklük, Solgunluk, biyolojik mücadele, PGPB

ABSTRACT

DETERMINATION of *in vitro* BIOCONTROL EFFICIENCIES of ENDOPHYTIC and EPIPHYTIC BACTERIA AGAINST SOME CITRUS FUNGAL PATHOGENS

Citrus (*Citrus* spp.) species, as a strategic crop, are considered an important fruit due to the economic value of exports and local consumption in Turkey. Fungal diseases such as anthracnose (*Colletotrichum* spp.), Fusarium wilt and dry root rot (*Fusarium* spp.) and sour rot (*Geotrichum citri-aurantii*) cause serious yield and quality losses during cultivation and storage periods. In recent years, priority has been given to researching alternative methods to chemical pesticides with diseases. One of the promising control strategies that show great potential as a reliable environmentally friendly method in the management of such diseases is biological control using antagonist and plant growth promoting bacterial biocontrol agents. Multiple aims of this study were to isolate and identify of endophytic and epiphytic bacterial isolates obtained from healthy citrus trees, to determine their *in vitro* antagonistic activities against *Geotrichum citri-aurantii*, *Colletotrichum gloeosporioides* and *Fusarium solani* as well as to characterize mechanisms potentially involved in promoting plant growth and antagonistic activities.

Total of 48 bacterial isolates were obtained from the rhizosphere and endosphere of healthy trees and identified by MALDI-TOF MS analysis. In dual culture assay, *Bacillus vallismortis* YGL73ep, *Bacillus cereus* YGK25en and *Pseudomonas chlororaphis* YGM82ep isolates were found as the most effective antagonistic bacterial isolates against *Geotrichum citri-aurantii* (73.33-77.22% inhibition); *Bacillus thuringiensis* YGT22en, *Bacillus vallismortis* YGL73ep, *Bacillus cereus* YGK25en and *Pseudomonas chlororaphis* YGM82ep against *Colletotrichum gloeosporioides* (65.56-72.78% inhibition); *Bacillus subtilis* YGS5en, *Bacillus cereus* YGK25en and *Pseudomonas chlororaphis* YGM82ep against *Fusarium solani* (71.11-66.11% inhibition). Volatile organic compounds (VOCs), produced by the efficient isolates such as *Pseudomonas chlororaphis* YGM82ep, *Bacillus vallismortis* 73YGep, *Bacillus thuringiensis* 22YGen and *Bacillus cereus* 25YGen, significantly inhibited mycelial growth of tested fungal disease agents *in vitro* dual culture tests.

Among the tested 25 bacterial isolates, 20 isolates were positive for siderophore production, 24 isolates for ammonium production, 19 isolates for protease and 5 isolates for HCN production. Of the 25 bacterial isolates tested, 21 isolates produced varying amounts of IAA in the concentration range of 1.84-69.68 µg/ml, and 7 isolates were found to be capable of solubilising phosphorus. Among the isolates, *Pseudomonas koreensis* YGL72ep, *Pseudomonas chlororaphis* YGM82ep and *Bacillus simplex* YGS12ep produced a relatively large amount of IAA and *Rahnella aquatilis* YGP63ep, *Raoultella ornithinolytica* YGP64en ve *Pseudomonas koreensis* YGL72ep solubilised phosphate.

In conclusion, the strong antagonistic and PGP traits displayed by effective isolates of *Bacillus* spp. and *Pseudomonas chlororaphis* may be developed as biological control agent in the suppression disease caused by *Geotrichum citri-aurantii*, *Colletotrichum gloeosporioides* and *Fusarium solani* as well as their potentials as a biofertilizer.

2022, 93 pages

Keywords: Anthracnose, sour rot, wilt, biological control, PGPB

TEŞEKKÜR

Mesleki ve akademik hayatımda önemli kararlar almam gerektiğinde sürekli yanımda olan ve varlığı ile benim için önemli bir rol model oluşturan, gerek tez konumun belirlenmesi, planlanması, yürütülmesi, laboratuvar çalışmaları gerekse yazım aşamasında değerli bilgilerini ve tecrübelerini esirgemeyen; eğitim sürecimde her türlü desteği sağlayan, etik davranma ve düzenli çalışmayı felsefe edinmeme vesile olan, kendisiyle çalışmaktan çok mutlu olduğum kıymetli danışman hocam Prof. Dr.Emine Mine SOYLU'ya, sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Tez konusunun belirlenmesi ve çalışmaların takibinde profesyonel yaklaşımları ve öngörülleri ile yüksek lisans çalışmalarımı zenginleştiren, yardımlarını esirgemeyen, deneyimlerini paylaşan değerli hocalarım Prof. Dr. Soner SOYLU, Prof. Dr. Şener KURT ve Prof. Dr. Yeşim AYSAN'a, tez çalışmalarım sırasında tüm bölüm imkânlarından yararlanmamı sağlayan Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi (HMKÜ) Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölüm Başkanlığı'na, projenin yürütülmesine maddi destek veren HMKÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne (Proje No: 20.YL.022) BİSAK Müdürlüğü ve HMKÜ FBE Enstitüsü Müdürlüğü çalışanlarına teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım süresince, tüm laboratuvar çalışmalarımda, bakteri ve fungus izolatlarımın izolasyonu, tanılanmaları, *in vitro* biyoetkinlik ve etki mekanizmalarının belirlenmeleri aşamasında yardımcı olan Dr. Öğr. Üyesi Merve KARA ve Öğr. Gör. Dr. Aysun UYSAL'a teşekkür ederim.

Yüksek lisans hayatım boyunca bana yol arkadaşı olup benden desteklerini esirgemeyen değerli arkadaşlarım Zir. Yük. Müh. Firdevs DEMİRKOL, Zir. Yük. Müh. Kübra GÜLOĞLU ve Zir. Yük. Müh. Nudem KUŞTOĞAN'a çok teşekkür ederim.

Beni her zaman en iyisini yapabileceğime inandıran, bu günlere gelmemi sağlayan, maddi ve manevi her türlü desteklerini esirgemeyen ve hep yanımda olan aileme sonsuz minnet ve şükranlarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER	IV
ÇİZELGELER DİZİNİ	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VII
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	IX
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	10
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	27
3.1. Materyal.....	27
3.2. Yöntem	28
3.2.1. Sağlıklı Turunçgil Ağaçlarının Farklı Dokularından Endofit ve Epifit ve Bakterilerin İzolasyonu ve Tanılanması.....	28
3.2.1.1. Endofit ve Epifit Bakterilerin İzolasyonu	29
3.2.1.2. Endofit ve Epifit Bakteri İzolatlarının Seçimi	30
3.2.1.3. Aday Endofit ve Epifit Bakteri İzolatlarının Tanılanması	32
3.2.2. Fungal Hastalık Etmenlerine Karşı Aday Antagonist Bakteri İzolatlarının <i>in vitro</i> Antagonistik Etkinliğinin Belirlenmesi	33
3.2.2.1. Antagonist Bakteri İzolatları Tarafından Oluşturulan Engelleme Bölgelerin Fungisidal ve Fungistatik Özelliklerinin Belirlenmesi	35
3.2.2.2. Bakteri İzolatlarının Uçucu Bileşen(ler)inin <i>in vitro</i> Antagonistik Etkinliğinin Belirlenmesi.....	35
3.2.2.3. Bakteri İzolatlarının Fungal Etmenleri Engellemede Kullandıkları Antagonistik ve Bitki Gelişimini Teşvik Eden Mekanizmalarının Belirlenmesi	36
3.2.2.4. Hastalık Etmeninin Gelişimini Engellemede Bakteri İzolatlarının Kullandıkları Antagonistik Etki Mekanizmaları.....	36
3.2.2.5. Bakteri İzolatlarının Bitki Gelişimini Teşvik Etmede Kullandıkları Etki Mekanizmaların Belirlenmesi.....	39
3.2.3. Deneme Deseni ve İstatistik Analizler	41
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA	42
4.1. Sağlıklı Turunçgil Ağaçlarının Farklı Bitki Kısımlarından Aday Endofit ve Epifit Bakteri İzolatlarının İzolasyonu ve Tanılanması.....	42
4.2. Endofit ve Epifit Bakterilerin Turunçgil Fungal Patojenlerinin Misel Gelişiminin Engellenmesi Üzerine Antagonistik Etkinlikleri.....	46
4.2.1. Endofit ve Epifit Bakteri İzolatlarının <i>G. citri-aurantii</i> Misel Gelişiminin Engellenmesi üzerine <i>in vitro</i> Antagonistik Etkinlikleri.....	46
4.2.2. Endofit ve Epifit Bakteri İzolatlarının <i>C. gloeosporioides</i> 'in Misel Gelişiminin Engellenmesi üzerine <i>in vitro</i> Antagonistik Etkinliği	49
4.2.3. Endofit ve Epifit Bakteri İzolatlarının <i>F. solani</i> Misel Gelişiminin Engellenmesi üzerine <i>in vitro</i> Antagonistik Etkinliği	51
4.3. Fungal Etmenlerin Misel Gelişimini Engellemede Bakteri İzolatlarının Kullandıkları Biyokontrol Etki Mekanizmaları.....	63
4.4. Bakteri İzolatlarının Bitki Büyüme Gelişimini Teşvik Eden Mekanizmalarının Belirlenmesi.....	69

4.5. Fungal Etmenlerin Misel Gelişiminin Engellendiği Bölgelerinin Fungisidal ve Fungistatik Özellikleri	73
4.6. Antagonist Bakteri İzolatları Tarafından Üretilen Uçucu Organik Bileşen(ler)in Antagonistik Etkinliği.....	75
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	78
KAYNAKLAR	81
ÖZGEÇMİŞ	92
EKLER.....	93



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. Farklı turunçgil türlerinden izole edilen endofit ve epifit bakteri izolatların tanılama sonuçları	44
Çizelge 4.2. Farklı turunçgil türlerinde elde edilen epifit endofit ve antagonist bakteri izolatların <i>in vitro</i> ikili kültür testlerinde <i>G. citri-aurantii</i> 'nin misel gelişimini engelleme potansiyelleri.....	47
Çizelge 4.3. Farklı turunçgil türlerinde elde edilen epifit endofit ve antagonist bakteri izolatların <i>in vitro</i> ikili kültür testlerinde <i>C. gloeosporioides</i> 'in misel gelişimini engelleme potansiyelleri.....	50
Çizelge 4.4. Farklı turunçgil türlerinde elde edilen epifit endofit ve antagonist bakteri izolatların <i>in vitro</i> ikili kültür testlerinde <i>F. solani</i> 'nin misel gelişimini engelleme potansiyelleri.....	53
Çizelge 4.5. Farklı turunçgil türlerinde elde edilen epifit endofit ve antagonist bakteri izolatların <i>in vitro</i> ikili kültür testlerinde 3 farklı fungal etmene karşı antagonistik etkinliklerinin karşılaştırılması.....	55
Çizelge 4.6. Seçilmiş antagonist bakteri izolatların fungal etmenlere karşı gösterdikleri olası biyokontrol etkinlik mekanizmaların belirlenmesi ^a	63
Çizelge 4.7. Seçilmiş bakteri izolatların bitki büyümesini teşvik eden IAA ve fosforu çözme potansiyelleri a	71
Çizelge 4.8. Antagonist etkinliği yüksek bazı bakteri izolatları tarafından üretilen uçucu organik bileşenlerinin <i>in vitro</i> ikili kültür testlerinde fungal etmenlerin misel gelişimi ve engellenmesi üzerine etkinliği	76

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Dünyanın farklı ülkelerinde 2019 yılında gerçekleşen Turunçgil üretimi.....	2
Şekil 1.2. Hatay ili turunçgil üretimi yapılan alanlardaki ağaçların sürgün, yaprak ve meyvelerde antraknoz (A, B), ekşi çürüklük (C) ve solgunluk (D) hastalık etmenleri tarafından oluşturulan tipik hastalık belirtileri (ok)	6
Şekil 3.1. Denemelerde kullanılan <i>Geotrichum citri-aurantii</i> (A), <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (B) ve <i>Fusarium solani</i> (C) izolatlarının tek spor kültürleri	28
Şekil 3.2. (A-C) Sağlıklı turunçgil ağaçlarının farklı bitki kısımlarından epifit ve endofit bakteri izolatların besi yeri üzerine izolasyonu (D-E) ve saflaştırılması (F)29	
Şekil 3.3. (A) tütün yapraklarında aşırı duyarlılık testi (HR), (B) patates dilimleri üzerinde yumuşak çürüklük testi. İnokulasyon noktalarında (*) patojen tarafından oluşturulan tipik HR (ok) ve yumuşak çürüklük (ok) belirtileri	32
Şekil 3.4. Epifit veya endofit bakterilerin <i>in vitro</i> ikili kültür testleri ile fungal hastalık etmeninin misel gelişiminin engellemesi (ok) üzerine etkilerinin belirlenmesi	34
Şekil 3.5. Epifit veya endofit bakterilerin uçucu bileşenlerinin <i>in vitro</i> ikili kültür testleri ile fungal hastalık etmeninin misel gelişiminin engellemesi üzerine etkilerinin belirlenmesi. Üst kapağa (sol) bakteri izolatı alt kapağa (sağ) ise fungal izolat inokule edilmiştir.....	36
Şekil 3.6. Epifit ve endofit bakterilerin (A) siderofor, (B) proteaz enzimi (proteolitik), (C) hidrojen siyanür (HCN) ve (D) amonyak üretme (ok) potansiyellerinin belirlenmesi	38
Şekil 3.7. Endofit ve epifit bakteri izolatların IAA üretme ve fosforu çözme potansiyelleri. (A) Bakteriyel izolatlar tarafından besi yeri içinde üretilen IAA'nın renk değişimi ile belirlenmesi. (B) <i>Pseudomonas koreensis</i> YGL72ep izolatı tarafından üretilen IAA 535 nm dalga boyundaki absorpsiyon spektrumu (C) Bakteri izolatları tarafından besi yerinde fosforu çözme (ok) potansiyelleri büyüklüğü bakteri koloni çapına (*) kıyaslanarak suretiyle kantitatif olarak hesaplanmıştır.....	40
Şekil 4.1. Farklı türlere ait endofit ve epifit bakteri izolatlarının ikili kültür testlemelerinde fungal etmen <i>G. citri-aurantii</i> 'nin misel gelişiminin engellenmesi üzerine olan antagonistik etkinlikleri	49
Şekil 4.2. Farklı türlere ait endofit ve epifit bakteri izolatlarının ikili kültür testlemelerinde fungal etmen <i>C. gloeosporioides</i> 'in misel gelişiminin engellenmesi üzerine olan antagonistik etkinlikleri	50
Şekil 4.3. Farklı türlere ait endofit ve epifit bakteri izolatlarının ikili kültür testlemelerinde fungal etmen <i>F. solani</i> 'nin misel gelişiminin engellenmesi üzerine olan antagonistik etkinlikleri.....	52
Şekil 4.4. Antagonist bakterilerin CAS Agar üzerinde siderofor üretme potansiyelleri. Aynı petride <i>Pseudomonas koreensis</i> YGL72ep (ok) tarafından geniş engelleme bölgesi oluşturulurken, <i>Bacillus thuringiensis</i> YGT22en (*) izolatı engelleme bölgesi oluşturamamıştır.....	64
Şekil 4.5. (A ve B) Farklı turunçgil türlerinden elde edilen antagonist bakteri izolatlarının protease enzim üretme potansiyellerinin SMLBA besi yeri üzerinde belirlenmesi. (A) <i>Bacillus cereus</i> YGK3en izolatı tarafından üretilen protease	

- besi yeri üzerinde engelleme bölgesi (ok) oluştururken, (B) *Acinetobacter johnsonii* YGM76en izolatu (*) engelleme bölgesi oluşturmamıştır..... 66
- Şekil 4.6. Farklı turuncgil türlerinden elde edilen antagonist bakteri izolatlarının amonyak üretim potansiyellerinin PW besiyeri içerisinde belirlenmesi. Besi yeri içerisinde oluşturulan tüplerdeki besi yeri renginin açık sarıdan (*) koyu sarı-kahverengine dönüşmesiyle (ok) belirlenmiştir 67
- Şekil 4.7. Farklı turuncgil türlerinden izole edilen antagonist bakteri izolatlarının hidrojen siyanür (HCN) üretim potansiyellerinin Glycine içeren TSA besi yerinde belirlenmesi. Besi yeri içerisinde uçucu HCN birikimi sonucunda petri kapağındaki filtre kâğıdının açık sarı renkten (*) kırmızı-turuncu renge (ok) dönüşmüştür 68
- Şekil 4.8. Antagonist bakterilerin L-tryptophane içeren LB besi yerinde IAA üretme potansiyellerin belirlenmesi. (A) Farklı bakteri izolatu tarafından üretilen IAA sonucu besi yerinin kırmızı-pembe renge (ok) dönüşmüştür. (B) Farklı türlere ait bakteri izolatları tarafından üretilen ve bitki büyümesini teşvik eden IAA konsantrasyonlarına bağlı renk (sarı renkten koyu kırmızı-pembe) değişimleri 70
- Şekil 4.9. Farklı turuncgil türlerinden elde edilen bakteri izolatlarının PVK besi yerinde fosforu çözme etkinliğinin belirlenmesi. *Pseudomonas koreensis* YGL72ep izolatu (ok) besi yerinde engelleme bölgesi (ok) oluşturmak suretiyle fosforu çözerken, *Bacillus cereus* YGP1en ve *Bacillus megaterium* YGT18ep izolatları (*) etkinlik göstermemiştir..... 72
- Şekil 4.10. Engelleme bölgesindeki bileşik(ler)in fungusidal etkinliğinin belirlenmesi potansiyellerinin belirlenmesi. Engelleme bölgesine yerleştirilen sağlıklı fungus disklerinde (*) gelişme görülmemesi bu bölgede üretilen bileşik(ler)in fungusidal etkinliğini göstermektedir..... 74
- Şekil 4.11. (A-B) engelleme bölgesine yakın yerdeki yapısal bozukluğun olduğu misel diski (*) PDA besi yerine aktarıldığında sınırlı gelişim gösterirken, (C-D) engelleme bölgesinden uzak noktadan alınan misel diski normal gelişim göstermiştir..... 74
- Şekil 4.12. Antagonist bakteri izolatları tarafından üretilen uçucu bileşenlerin fungal etmenlerin misel gelişimi üzerine antagonistik etkinlikleri. (A) Kapalı ikili kültür testinde üst petri kapağında bakteri, (B) alt kapaktaki besiyerinde uçucu bileşenlere maruz kalmış fungal etmenlerin gelişimi 77

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

SİMGELER

°C	: Celsius (derece)
da	: Dekar
ha	: Hektar
µg	: Mikrogram
mg	: Miligram
mM	: Milimolar
gr	: Gram
kg	: kilogram
µl	: Microlitre
ml	: Mililitre
L	: Litre
µm	: Mikrometre
mm	: Milimetre
dak	: Dakika
rpm	: Rotation per minute (dakikada dönme sayısı)

KISALTMALAR

TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu
FAO	: Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (Food and Agriculture Organisation of The United Nations)
PW	: Pepton Water
HCN	: Hydrogen Cyanide (Hidrojen Siyanür)
CAS	: Chrom Azurol-S Agar Besi yeri
SMLBA	: SM Luria Broth Agar Besi yeri
LB	: Luria Bertani Agar Besi yeri
NA	: Nutrient Agar Besi yeri
PDA	: Patates Dekstroz Agar Besi yeri
TSA	: Trypic Soybean Agar Besi Yeri
HR	: Hypersensitive Test (Tütün aşırı duyarlılık testi)
MALDI-TOF	: Matriks Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry
IAA	: Indol Asetik Asit
PVK	: Pikovskaya Agar Besi yeri
MG	: Mycelial Growth (Misel Gelişimi)
MGI	: Mycelial Growth Inhibition (Misel Gelişimin Engellenmesi)
PCR	: Polimeraz Chain Reaction
PGPB	: Plant Growth Promoting Bacteria (Bitki Gelişimini Teşvik eden Bakteri)
YEA	: Yeast Extract Agar (Maya Bazlı Agar)
VOC	: Volatile Organic Compounds (Uçucu Organik Bileşikler)
SPSS	: Statistical Package for the Social Sciences

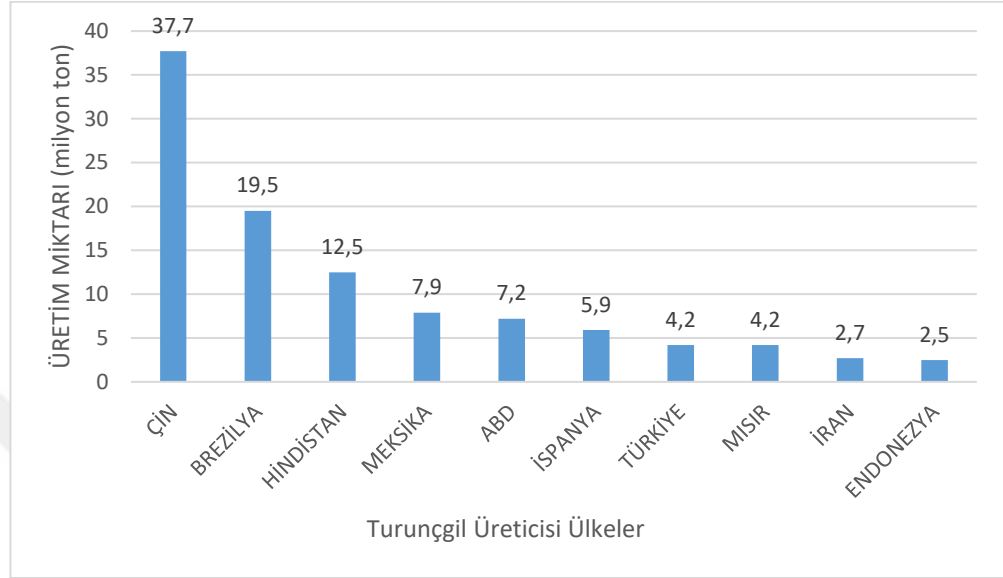
1. GİRİŞ

Rutaceae familyasında yer alan ve bünyesinde portakal (*Citrus sinensis*), limon (*Citrus limon*), şadok (*Citrus maxim*), greyfurt (*Citrus paradisi*), ağaç kavunu (*Citrus medica*), bergamot (*Citrus bergamia*), mandarin (*Citrus reticulata*), turunç (*Citrus aurantium*) ve kamkat (*Fortunella japonica*) gibi farklı türleri barındıran turunçgillerin ana vatanı Çin, Güneydoğu Asya ve Hindistan olup, günümüzde subtropik iklime sahip hemen hemen tüm ülkelerde yetiştiriciliği yapılmaktadır. Turunçgiller altıntop, limon, laym (yeşil ekşi limon), mandarin ve portakal gibi yetiştiriciliği yaygın ve ekonomik değeri olan türlerin dışında şadok, ağaç kavunu, bergamot gibi diğer türleri de içerisinde bulunduran bir bitki topluluğudur. İngilizcede turuncu renge de adını veren sarımsı renkteki turunçgil meyveleri, yiyecek, parfüm esansı veya doğal temizlik malzemesi olarak da işlev kazanır. İnsan sağlığına önemli yararları bulunan turunçgiller, sofralık, taze tüketimin yanında reçel, marmelat ve meyve suyu olarak değerlendirilmekte bunun yanında kozmetik sektöründe de ham madde olarak kullanılmaktadır (Uysal ve Polatöz, 2017). Turunçgillerin faydaları arasında yoğun kalsiyum içerikleri ilk sırada sayılabilir. Turunçgiller bu sayede kemikleri güçlendirir. Turunçgiller vitamini yüksek gıdalardır. Özellikle yüksek oranda sahip olduğu C vitamini soğuk algınlığına karşı koruyucu etki gösterdiği gibi, böbrek taşı oluşumunun engellenmesine ve atılmasına yardımcı olur, cildin genç ve güzel görünmesini sağlar. Aynı zamanda doğal ateş düşürücü olan turunçgiller metabolizmayı hızlandırır, yüksek lifli içeriği sayesinde tok tutmaya yardımcı olur. Turunçgiller arasında özellikle limon tansiyonun düşürülmesine neden olurken, konsantrasyon toplanması ve enerji vermesi gibi etkinliklere de sahip olduğu bildirilmiştir (Anonim,2019)

Dünya turunçgil pazarları incelendiğinde ağırlıklı ticaret hacmi ve rekabetin sofralık turunçgillerde olduğu görülmektedir. Bu çerçevede özellikle subtropik koşullarda üretim yapan ülke ya da havzaların sofralık üretime yönelmelerinden dolayı rekabeti de belirleyici olduklarını tespit etmek mümkündür.

Dünya genelinde 2019 yılı itibarıyla en çok üretilen ve tüketilen meyve grupları arasında yer alan turunçgillerin üretimi 9 milyon 750 bin ha alanda 138 milyon ton olarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 1). Turunçgil üretiminde ilk sırada 37.7 milyon ton ile Çin yer alırken, bu ülkeyi sırasıyla 19.5 milyon ton ile Brezilya, 12.5 milyon ton ile Hindistan,

7.9 milyon ton ile Meksika, 7.2 milyon ton ile A.B.D, 5.9 milyon ton ile İspanya takip etmiştir. Ülkemiz turunçgil üretiminde 4.2 milyon ton üretim ile dünya genelinde yedinci sırada yer almıştır (FAO, 2019).



Şekil 1.1. Dünyanın farklı ülkelerinde 2019 yılında gerçekleşen Turunçgil üretimi

Tarım ve kırsal kalkınma planlarında stratejik ürün olarak değerlendirilen turunçgil (*Citrus spp.*) türleri, ekonomik ihracat değerleri ve yerel tüketimleri nedeniyle Türkiye’de önemli bir meyve olarak kabul edilmektedir. Türkiyede yetiştirilen turunçgil üretiminin türlere göre dağılımına bakıldığında, toplam üretimin %47’si portakal, %28’i mandarin, %19’u limon ve %6’sı altıntop (greyfurt) şeklinde gerçekleşmiştir. Ürün esaslı değerlendirmede ülkemiz 2019 yılı itibarı ile dünya genelinde turunçgil yetiştiren ülkeler arasında, mandarin üretiminde 4., altıntop ve limonda 8. ve portakalda ise 10. sırada yer almıştır.

Türkiye’de 2021 yılı itibarı ile turunçgil üretiminin, 1 milyon 742 bin ton portakal, 1 milyon 819 bin ton mandarin, 1 milyon 550 bin ton limon, 249 bin ton altıntop ve 2 bin 61 ton turunç olmak üzere toplam 5 milyon 362 bin ton olarak gerçekleşmiştir (TÜİK, 2021). Ülkemizde yetiştirilen turunçgilleri bölgeler itibarıyla değerlendirdiğimizde, üretimin %82’si Akdeniz, %17’si ise Ege Bölgesi’nden karşılanmıştır. Akdeniz Bölgesi’nde 2021 yılı itibarı ile turunçgil üretiminin, 1 milyon 467 bin ton portakal, 1 milyon 681 bin ton mandarin, 1 milyon 445 bin ton limon, 241 bin ton altıntop ve bin 851

ton turunç olmak üzere toplam yaklaşık 4 milyon 835 bin ton olarak gerçekleştirildiği bildirilmiştir (TK, 2021).

Akdeniz bölgesinde yer alan iller açısından bakıldığında Antalya, Adana, Mersin ve Hatay illeri üretim %96'sını karşılamıştır. Hatay ilinde 2021 yılı itibari ile turunil üretiminin, 354 bin ton portakal, yaklaşık 717 bin ton mandarin, yaklaşık 146 bin ton limon, 11 bin ton altıntop ve 213 ton turunç olmak üzere toplam yaklaşık 1 milyon 230 bin ton olarak gerçekleştirildiği kaydedilmiştir (TK, 2021).

Turunçgiller yetiştirme süresince olduğu kadar depolanma koşulları sırasında da birçok toprak ve hava kökenli fungal hastalıklar tarafından etkilenir. Ülkemizde ve dünyanın önde gelen turunil üretim alanlarında turunil bahçelerinde karşılaşılan önemli fungal hastalıkların başında antraknoz (*Colletotrichum* spp.), *Fusarium* solgunluğu ve kök rklğ (*Fusarium* spp.), turunil meyvelerinde kahverengi rklk ve gövde zamklanması [*Phytophthora citrophthora* (Smith ve Smith) Leonian)], ukurutan [*Plenodomus tracheiphilus* (Petri) L.A. Gruyter, Aveskamp&Verkley (Syn. *Phoma tracheiphila* (Petri) L.A. Kantsch.-Gik.], *Alternaria* kahverengi leke hastalığı (*Alternaria citri* Ell.Pierce) gelir. Bahçe şartlarında görülen bu hastalıkların yanı sıra, bahçe koşullarında olduğu kadar depolanma sırasında ortaya çıkan ekşi rklk (*Geotrichum citri-aurantii*), yeşil kf (*Penicillium digitatum*) ve mavi kf (*Penicillium italicum*) hastalıkları turunçgillerde önemli ekonomik kayıplara neden olan bir diğer önemli hastalıklardır (Uysal ve ark., 2016; Guarnacia ve ark., 2017; Uysal ve Kurt, 2019a).

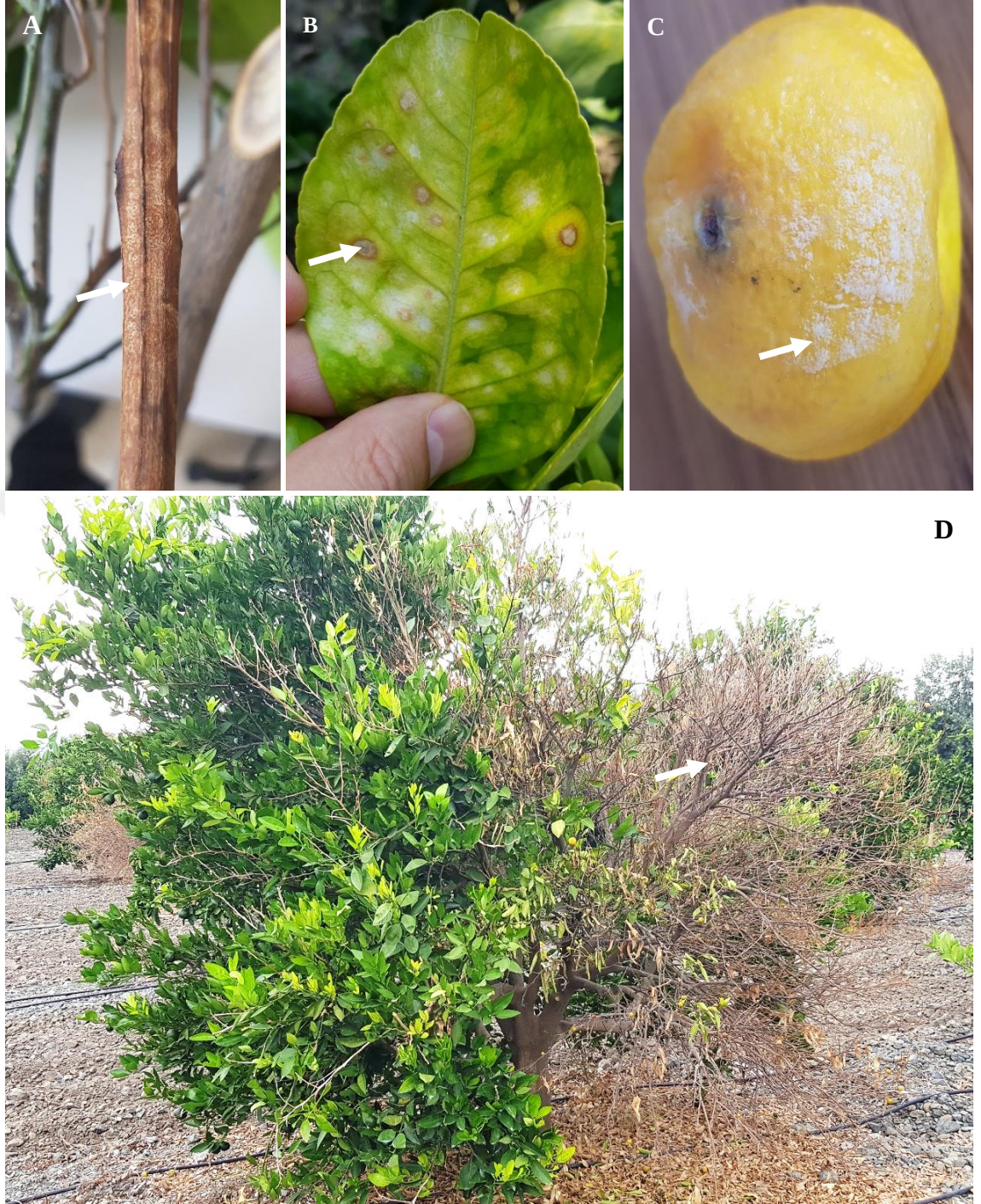
Genellikle antraknoz hastalığına neden olan *Colletotrichum* türleri, fungus alemi, Ascomycota şubesi, Sordariomycetes sınıfı Phyllachorales takımı ve Phyllachoraceae familyası içerisinde yer almaktadır. *Colletotrichum* türleri *Glomerella* cinsine bağlı türlerin anamorf evresi olarak bilinmektedir. Dünya çapında birçok bitkiyi tahrip eden *Colletotrichum* cinsinin, yaklaşık 600 türü bulunmaktadır. Günümüzde bitki patolojisinde *Colletotrichum* cinsine bağlı türler, *C. gloeosporioides*, *C. acutatum*, *C. boninense* ve *C. truncatum* tür komplekslerinin yeleri olarak kabul edilmektedir (Shivas ve ark., 2016). Antraknoz, Yunanca'da kömür anlamına gelen bir kelimeden türetilmiş olup, spor içeren koyu, çökük lezyonlar şeklinde karakterize edilen bitki hastalıklarının genel adı olarak ifade edilmektedir. Turunçgillerin tüm türlerinde (limon, mandarin, portakal, altıntop, lime, şadok vb.) görülmekle beraber, en fazla limon ve mandarin türlerinde

rastlanmaktadır. Antraknoz hastalığı turunçgillerin sürgünlerinde geriye doğru kuruma, yapraklarda leke, erken dönem yaprak ve meyve dökülmeleri, meyvelerde antraknoz belirtileri şeklinde ortaya çıkmaktadır. Hastalık belirtilerine bitkilerin tüm vegetatif ve generatif organlarında rastlanmaktadır. Ölmekte olan yapraklar ve dallarda, patojenin koyu spor yatakları olan aservuluslar yer alır. Yapraklarda bariz mor bir hat ile sınırlı açık ten rengi, az ya da çok yuvarlak, düz bir alan şeklinde oluşur ve bu alanlar üzerinde hastalığın ilerleyen evrelerin siyah noktalar şeklinde aservuluslar gözlenir. Meyvelerde antraknoz belirtileri genellikle güneş yanığı, kimyasal yanık, böcek zararı, morarma veya uzun süreli depolama dönemleri gibi diğer etmenler tarafından oluşturulan yaralı meyvelerde meydana gelir. Lezyonlar, 1.5 mm veya daha büyük çapta siyah renkte olup, ıslak veya sisli havalarda, antraknoz sporları veya meyve üzerine ulaşır, kabukları enfekte ederler. Olgunlaşmamış meyvelerde ise donuk, kırmızımsı-yeşil çizgiler ve olgun meyvelerde kahverengi-siyah çizgiler (gözyaşı lekeleri) oluştururlar (Wang ve ark., 2021). Çürüme genellikle sert ve kuru olmakla birlikte, yeterince derin olursa meyveyi yumuşatabilir. Nemli koşullarda bekletildiğinde, spor kütleleri somon rengine benzer pembe renkte, kuru olduğunda ise sporlar siyah-kahverengi bir renk alır. Ayrıca etilen uygulaması fungusun çoğalmasına yardımcı olur. Etilen salınımı fazla olması durumunda hastalık şiddeti artmakta ve hastalık depolama koşullarında da enfeksiyonunu sürdürmektedir. Antraknoz etmeni *Colletotrichum* fungusu kışı bitki artıklarında peritesyum halinde geçirdikten sonra, uygun iklim koşulları oluştuğunda olgunlaşan peritesyumlardan açığa çıkan askuslarda bulunan askosporlar aracılığı ile ilk enfeksiyon oluşur. Enfeksiyon sonrası bitki dokusunun kuşatılması ile dokular ölür, yaprak ve meyveler üzerinde çökük alanlar oluşur, sürgünlerde ise geriye doğru ölüm belirtileri meydana gelir. Enfekteli alan üzerinde, fungusun eşeysiz üreme yapısı olan aservuluslar ortaya çıkar. Burada oluşan konidilerin etrafa yayılması ile ikincil enfeksiyonlar gelişir.

Ülkemizde ve dünyada turunçgil üretim süresince derim sırasında ve sonrasında meyvelerde ortaya çıkan en büyük kayıplar, fungal kaynaklı organizmalar tarafından oluşturulan çürüklükler şeklinde gerçekleşmektedir. *Geotrichum citri-aurantii* 'nin neden olduğu ekşi çürüklük hastalığı yağışın fazla olduğu mevsimlerde önemli düzeylerde verim kayıplarına yol açabilmektedir. Bu hastalık, turunçgil türlerinin yetiştirildiği pek çok alanda kaydedilmiştir. Olgun veya aşırı olgun meyveler, bu hastalığa karşı, yeşil ve olgunlaşmamış meyvelere göre daha duyarlıdır. Hastalık, nemli dönemlerin uzun sürdüğü

bölgelerde ve uzun süre depolanan meyvelerde oldukça önemli problemlere neden olmaktadır.

Ülkemizde turunçgil üretim alanlarında son zamanlarda sıklıkla görülmeye başlayan farklı kök çürüklükleri ve solgunluk belirtileri, turunçgil tarımının geleceği açısından bazı endişeleri de beraberinde getirmektedir. Son yıllarda gerek yeni tesis edilen bahçelerde gerekse yetişkin ağaçlardan oluşan bahçelerde yoğun kurumalara ve solgunluklara rastlanmakta, ileri düzeyde bu tür hastalıklardan dolayı ağaçların sökülmesi ile sonuçlanan kayıplar ortaya çıkmaktadır (Kurt ve ark., 2020). *Fusarium solani* ile enfekteli olan turunçgil ağaçlarında ilk belirtiler, açık mor renkli, içsel iletim demeti renklenmesidir. Hastalıklı ağaçların ipliksi kökleri, daha kalın kök dokuları, toprak seviyesinde ve altında gövdede kuru çürüklük belirtileri gösterir. Görünüşe göre sağlıklı ağaçlar, aniden solar ve ölür. Ayrıca, kökler siyahlaşır ve anacın gövde dokuları içinde kahverengi, iletim demeti kahverengileşmesi ile çürümeler meydana gelir. Daha sonra hastalık, solgunluk, sararma, nekrozlaşma ve yaprakların dökümü ile birlikte enfekteli ağaçların hızla ölümüne neden olur. *F. solani* enfeksiyonu, çoğunlukla kök boğazı ve ana kökleri üzerinde çürümelere yol açar. Ağaçların taç büyüklüğündeki azalma, solgunluk, yaprak dökümü ve geriye doğru ölüm ile bağlantılı iğliksi kök çürüklükleri, kök dokularının korteks dokusunun soyulup dökülmesi ve sulanmış belirtilerin ortaya çıkmasına yol açar. *F. solani* toprakta birkaç yıl canlı kalabildiği gibi, alet-ekipmanlar, yer altı ve üstü sulama suları ve rüzgar ile etrafa yayılabilirler. Patojen, konukçu bitkilerde solgunluk ve meyve çürümesi gibi farklı türde yıkıcı hastalıklara neden olur (Leslie ve Summerell, 2006; Yaseen ve D'Onghia, 2012; Al-Sadi ve ark., 2014; Bueno ve ark., 2014). *F. solani* turunçgiller dışında sebzeler, süs bitkileri ve tarla bitkilerinde geniş bir ekonomik değere sahip kültür bitkilerinde ortaya çıkabilmektedir. *F. solani*, fırsatçı bir patojen olarak bilinir ve insanlarda ve hayvanlarda hastalıklara neden olabilirler. Hastalığın enfeksiyon şekli ve oluşturduğu belirtiler, *Phytophthora citrophthora*, böcek zararı vb. faktörlerden kaynaklanan kök çürüklükleri ile karıştırılabilmektedir.



Şekil 1.2. Hatay ili turunçgil üretimi yapılan alanlardaki ağaçların sürgün, yaprak ve meyvelerde antraknoz (A, B), ekşi çürüklük (C) ve solgunluk (D) hastalık etmenleri tarafından oluşturulan tipik hastalık belirtileri (ok)

Çevresel faktörler hastalık epidemilerinin gelişiminde büyük rol oynar. Yağış miktarı ve süresi, ürün geometrisi, inokulum yaygınlığı arasındaki ilişkiler hastalık şiddetinin seviyesinde farklılıklara yol açar. Sıcaklığın etkileri çoğunlukla yaprak ıslaklık

süresi, nem, ışık ve rekabetçi mikrobiyota gibi faktörlerle ilişkilidir. Yaprak ıslaklık süresi, konukçu üzerinde patojenin çimlenmesini, enfeksiyonunu ve gelişimini doğrudan etkiler. Genellikle enfeksiyon sıcak ve nemli havalarda oluşur. Sıcaklığın, 27°C civarında olması ve yüksek nem (%80), antraknoz hastalığının gelişimi için en uygun koşullardır (Wang ve ark., 2021). *Colletotrichum*'un türleri, konukçu dokularını enfekte ederken hücre içinde hemibiyotrof ve kütikula altında nekrotrofik yaşam tarzını kullanırlar. Ayrıca *Colletotrichum*'un türleri arasında penetrasyon sırasında da farklılıklar gözlenir. Kimyasal mücadelede hasat ve budama işlemlerinden sonra, Bordo bulamacı (%1.5) ve Bakırlı preparatlar ile koruyucu ilaçlama yapılmalıdır.

G. citri-aurantii, limon, mandarin, portakal ve altıntop meyvelerinde yüksek düzeyde derim sonrası kayıplara yol açmaktadır (Liu ve ark., 2009). Günümüzde turuncgil meyvelerinde derim sonrası görülen *Penicillium* çürüklüklerine karşı ruhsatlı olarak kullanılan fungusitlerin hiçbiri, ekşi çürüklük hastalığına karşı etkili ve ruhsatlı değildir. Sodium-orto-phenylphenate (SOPP), ekşi çürüklük hastalığını kısmen kontrol altına alabilen tek ticari fungusit olmakla birlikte, uygulandığı meyvelerin yüzeylerinde meydana getirdiği yüksek oleosellozis oluşumu ve kabukta siyahlaşma gibi zararlarından dolayı çok sınırlı düzeydedir (Ladaniya, 2008). Turuncgil ekşi çürüklük hastalığına karşı, dünyanın değişik ülkelerinde en etkili fungusit olarak guanidine grubundan olan “guazatine” kimyasalı ruhsatlandırılmış ve halen kullanılmaktadır. Buna karşılık, ABD gibi bazı ülkelerde bu fungusit, çok fazla etken madde içerdiği için ve uygulama sonrası meyve üzerindeki ilaç kalıntısını analiz edebilecek yöntem bulunmadığından uygulamadan kaldırılma aşamasına gelmiştir (McKay ve ark., 2012). Ülkemizde Ege ve Akdeniz bölgelerindeki turuncgil paketleme evlerinden toplanan *G. citri-aurantii* izolatlarının tümü, imazalil ve thiabendazole'e karşı dirençli bulunmuştur. (Horuz ve Kınay, 2009).

Günümüzde derim sonrası hastalıkların mücadelesinde mayalar, biyolojik mücadele elemanı olarak önem kazanmış olup çok geniş bir ürün yelpazesinde kullanılmaktadır. Limondan izole edilen ve diğer turuncgillerin derim sonrası hastalıklarına karşı da başarı ile kullanılan *Candida oleiphila* Montrocher, paketleme evlerinde “Aspire” adı altında ticari adıyla kullanılan ilk biyopreparattır (Katz ve ark., 1995). Bunun yanında *Pichia guilliermondi* Wickerham, birçok *Candida* spp. (*C. sake*, *C. saitoana*, *C. oleiphila*), *Rhodotorula* spp. ve *Cryptococcus* spp. (*C. infirmo-miniatus*)

ile yapılan çalışmalar, mayaların derim sonrası biyolojik savaşta etkili şekilde kullanılabileceğine göstermektedir (Roberts, 1990; Arras, 1996; Wisniewski ve ark., 1990). Son olarak, *Metschnikowia fructicola* Kurtzman & Droby, sp. nov., mayası içeren “Shemer (Bayer Crop Sci.)” isimli bir preparat hasat sonrasında ruhsatlandırılmıştır (Kurtzman ve ark., 2001). Diğer depo hastalıklarını yeterince kontrol edebilen, imazalil, thiabendazol, pyrimethanil veya fludioxonil gibi fungusitler *Geotrichum citri-aurantii* zerinde yeterli etkiyi gösteremezler (Liu ve ark., 2009, Zhou ve ark., 2014).

Fusarium türlerinin turunçgillerde neden olduğu kök rklğ hastalığı, dünyanın belirli ülkelerinde önemli bir sorun olarak göze çarpmaktadır. Mısır’da kök rklğ hastalığı mandarin ağaçlarının %11.6’sını etkiler ve tahmini meyve verimi %39.6’dır. *Fusarium solani* dünya çapında turunçgiller, sebzeler gibi ekonomik yönden önemli ekinlerin üretkenlik üzerinde büyük bir etkisi olan kök rmesine neden olabilir (Spina ve ark., 2008). *F. solani* fırsatçı bir patojendir ve ayrıca insanlarda ve hayvanlarda yüzeysel mikozlara neden olabilir (O’Donnell ve ark., 2015; Tuxbury ve ark., 2014). Patojen fungus, yeni kurulmuş olan alanlarda yetiştirilen özellikle ‘Okitsu’ Satsuma mandarin ağaçlarında daha sıklıkla enfeksiyona yol açmaktadır. Akdeniz Bölgesinde turunç anacı üzerine aşılı olan 4-20 yaşlı turunçgil bahçelerinde melez mandarin Qrtanique, portakal ve limon türlerinde daha fazla görülmektedir. Turunçgil kuru kök rklğ, Avrupa’da Yunanistan ve İtalya başta olmak üzere Umman, BAE, Florida, California, Güney Afrika, Pakistan, Tunus, Mısır, ve ABD gibi birçok ülkeden limon, laym, tanjeninler, Navel portakal, *Troyer sitranjı* ve altıntop fidanlık ve bahçelerinden bildirilmiştir (Kurt ve ark., 2020)

Dünya da turunçgil üretiminde önemli bir yere sahip olan ülkemiz üretimde hızla ilerlemektedir. Toprak kökenli patojenlere karşı bazı fungusitlerin ya tamamen etkisiz ya da yetersiz kaldığı görülmektedir. Bazı patojenlere karşıda hiç ruhsatlı fungusit bulunmamaktadır. Bu sebeple bilim dünyası son yıllarda biyolojik mücadele etmenlerinin devreye girmesini hedeflemeleri nedeniyle bu konu üzerinde çalışmalara yoğunlaşmaktadır (Soliman ve Badeaa, 2002).

Bitkilerde sorun olan fungal ve bakteriyel kökenli hastalıklarla kimyasal mücadeleye alternatif yollardan biri de sağlıklı bitki veya yetiştirdikleri topraklardan izole edilen antagonist ve bitki gelişimini teşvik eden bakteriyel (Plant Growth Promoting Bacteria, PGPB) biyokontrol etmenlerinin kullanıldığı biyolojik mücadeledir.

Yapılan bu çalışmada, bölge ve ülkemiz ekonomisine önemli düzeyde katkısı olan farklı turunçgil türlerine ait sağlıklı ağaçların farklı kısımlarından **(i)** endofit ve epifit bakteri izolatların izolasyonu, tanılanması; **(ii)** turunçgillerde sorun olan fungal hastalık etmenlerinden *Geotrichum citri-aurantii*, *Colletotrichum gloeosporioides* ve *Fusarium solani*'nin misel gelişimleri üzerinde *in vitro* biyokontrol etkinliklerinin belirlenmesi; **(iii)** fungal etmenlerin misel gelişiminin engellenmesinde ve bitki büyümesinin gelişiminde rol oynayan olası etki mekanizmalarının karakterize edilmesi amaçlanmıştır.



2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Ülkemizde ekonomik öneme sahip yetiştiriciliği yapılan turuncgil ağaçlarında tez çalışmalarımıza konu olan *Geotrichum citri-aurantii*, *Colletotrichum gloeosporioides* ve *Fusarium solani* hastalık etmenleri ülkemizde olduğu kadar dünyanın birçok ülkesinde ciddi ekonomik kayıplara neden olduğu bildirilmiştir. Bu fungal hastalıkların yaygınlığı üzerine oldukça fazla çalışma yapılmış olmakla birlikte, hastalık etmenleri ile biyolojik mücadele olanaklarının araştırıldığı oldukça kısıtlı sayıda çalışma bulunmaktadır.

Koomen ve Jeffries (1993) tarafından yapılan çalışmada *Colletotrichum gloeosporioides*'un potansiyel mikrobiyal antagonistleri mango ağacının çiçeklerinden izole edilmiştir. Mango yaprakları ve meyveleri bir dizi deney tekniği kullanılarak taranmıştır. Yapılan izolasyonlar sonucunda toplam 648 fungal, bakteriyel ve maya izolatu elde edilmiş ve tüm izolatların antagonistik etkinliği malt özütü agar üzerinde *C. gloeosporioides* 'e karşı test edilmiştir. Yapılan *in vitro* antagonistik etkinlik testlerinde 121 organizma fungal etmenin misel gelişimini ve konidial çimlenmesini engellenme yetenekleri açısından ayrıca test edilmiştir. Bu izolatlardan 45 bakteri ve maya izolatu spor çimlenmesini engellemiştir. Bu izolatlar yapay olarak *C. gloeosporioides* ile enfekte olmuş mango meyvelerinde antraknoz lezyonlarının gelişimini engelleme potansiyelleri açısından değerlendirilmiştir. Filipinler'de taze hasat edilmiş meyvelerle yapılan bir denemede kullanılmak üzere yedi izolat seçilmiştir. Bu son tarama prosedürüyle sonraki denemeler için iki potansiyel bakteri izolatu *Bacillus cereus* ve *Pseudomonas fluorescens* olarak belirlenmiştir. Her iki izolat ticari koşullar altında hasat sonrası denemelerde, yayıcı yapıştırıcı, pepton, meyve mumu veya sukroz polyester ilavesi dahil olmak üzere farklı uygulama yöntemleriyle kombinasyon halinde test edilmiştir. *Bacillus cereus* izolatu ile uygulanan meyvelerde hastalık gelişimi azaltılmazken, *Pseudomonas fluorescens* izolatının uygulandığı meyvelerde antraknoz gelişimi önemli ölçüde azaltılmıştır. Bakterileri yayıcı yapıştırıcı, pepton, meyve mumu veya sukroz polyester içine dahil ederek yapılan uygulamalarda hastalık çıkışının engellenmesi açısından ek bir fayda elde edilmemiştir.

Korsten ve ark. (1995) Fuerte çeşidi avokado yaprağından ve meyve yüzeylerinden izole edilen bakterileri, fungal hastalık etmeni *Dothiorella aromatica* 'ya karşı *in vitro* antagonistik etkinliklerini araştırdıkları çalışmalarında, 33 farklı bakteri izolatını

Colletotrichum gloeosporioides, *Thyronectria pseudotrichia*, *Phomopsis perseae*, *Pestalotiopsis versicolor* ve *Fusarium solani* 'ye karşı antibiyosis için test etmişler, en yüksek düzeyde antibiyosisiz sergileyen izolatu *Bacillus subtilis* (B246) olduğunu belirlemişlerdir. *Bacillus subtilis* in farklı konsantrasyonlarının meyvelerde ticari Tag-wax'a eklendiği durumda *Dothiorella* / *Colletotrichum* hastalık kompleksi tarafından neden olunan antraknoz, meyve çürüklüğü kompleksi ve gövde ucu çürüklüğü gibi hastalıkları önemli ölçüde azalttığını gözlemlemişlerdir. Elde edilen sonuçlarda tüm *Bacillus subtilis* konsantrasyonları derim sonrası hastalıkların kontrolünde eşit derecede iyi performans sergilemiştir.

Stirling ve ark. (1998) avokadoda antraknoz hastalık etmeni olan *Colletotrichum gloeosporioides*'e karşı biyogübre uygulamalarının yaprak üzerindeki yararlı mikroorganizma popülasyonu üzerine olan etkinliğini araştırmışlardır. Çalışmalarında, üre uygulamalarının yapraklarda mikroorganizma sayısını çok az etkilerken antagonistik maya türleri *Cryptococcus sp.* ve *Aureobasidium sp.*'in mikrobiyal popülasyon sayılarını 10-100 kat arttırdığını, gübre uygulanan yapraklarda, antagonistik bakterilerin (*Pseudomonas fluorescens*, *Pantoea sp.* ve *Bacillus pumilus*) popülasyonları artmazken, pekmez uygulamasının avokado meyvesinde *C. gloeosporioides*'in saprofitik büyümesini teşvik etmesi nedeniyle muamele edilen meyvelerde daha fazla hastalık gelişimine neden olduğunu bildirmişlerdir.

Yoshida ve ark. (2001) tarafından yapılan çalışmada, dut antraknozu hastalığı etmeni *Colletotrichum dermatium*'a karşı sağlıklı dut yapraklarından *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2 izolatu elde edilmiş ve antagonist bakterinin *in vitro* ve *in vivo* etkinliği araştırılmıştır. Antagonist bakteri izolatu RC-2'nin hücre kültürünün dut yaprakları üzerindeki hastalığı engellediğini, söz konusu engellemenin hücre kültüründe bakteri tarafından üretilen antifungal bileşik(ler)den kaynaklandığını göstermiştir. Dut yaprakları üzerinde dut antraknoz hastalık gelişimi, sadece hücre kültürü bitkiye fungal etmen inokule etmeden önce uygulandığında etkili olurken, fungal etmenin inokule ettikten sonra uygulama hastalık çıkışını engellemede başarılı olamamıştır. Bu sonuçlar, bakteri hücre kültüründe antifungal bileşiklerin hastalık üzerinde önleyici bir etki sergilediğini göstermiştir. Pepton, antifungal bileşiklerin üretimini önemli ölçüde arttırmıştır. RC-2'nin hücre kültürü *C. dermatium* dışında *Rosellinia necatrix*, *Pyricularia oryzae*, *Agrobacterium tumefaciens* ve *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* gibi

birkaç farklı fitopatojenik fungal ve bakteriyel etmenin *in vitro* büyümesini de engelleme etkinliği göstermiştir.

Abebanjo ve Bankole (2004) yapmış oldukları çalışmalarında börülce topraküstü aksamalarının yer aldığı bütün aksamlarından elde edilen bazı fungal ve bakteri kökenli biyolojik mücadele etmeni izolatlarının, börülce antraknoz etmeni *Colletotrichum lindemuthianum*'un *in vitro* ve *in vivo* gelişimini engellemedeki etkinliği araştırılmıştır. Antagonist etmenlerden *Aspergillus flavus*, *A. ochraceus*, *Penicillium aurantiogriseum*, *Bacillus subtilis* BS21, *B. subtilis* BS22 ve *B. subtilis* BS23'ün etkileri oluşturulan fungal hastalık etmenin misel gelişimini engelleme bölgeleri ile ortaya konulmuştur. Fungal biyolojik mücadele etmenlerinden *A. niger* ikili kültür testlerinde besiyeri üzerinde engelleme bölgesi oluştururken, *Trichoderma viride* TH14 ve *T. viride* TH31 patojeni fungus miseli üzerinde gelişmek suretiyle hiperparazite ettiği gözlenmiştir. İki *T. viride* izolatu ve test edilen tüm bakteriler ile muamele edilmiş tohumlarla yapılan *in vivo* etkinlik denemelerinde antraknozla enfekte olmuş tohumlardan fide enfeksiyonunu önemli ölçüde baskılandığı belirlenmiştir. Tarlada inokule edilmiş börülce bitkileri üzerine *T. viride*-TH31'in sprey uygulaması, antraknoz hastalığının görülme sıklığını etkili bir şekilde bastırarak ve kontrole göre verimi önemli ölçüde artırmıştır. Antagonistlerin bitkiye haftada iki kez uygulandığında, haftada bir defa yapılan uygulamalara kıyasla daha etkili olduğu belirlenmiştir.

Kim ve ark. (2004) *Colletotrichum gloeosporioides* dahil fitopatojenik fungal etmenlerin biyolojik mücadelesinde kullanılmak üzere etkili bir antagonisti izole etmeyi, ardından antagonist tarafından üretilen biyo-kontrol maddesini saflaştırmayı ve karakterize etmeyi amaçlamışlardır. Biber antraknozuna karşı antifungal aktivite sergileyen bakteriler arasında en güçlü aktiviteyi sergileyen *Bacillus thuringiensis* CMB26 topraktan izole edilmiştir. Antagonist *B. thuringiensis* CMB26 izolatından izole edilip saflaştırılan lipopeptid'in "fengisine" isimli bileşiğe benzer olduğu belirlemişlerdir. Elde edilen lipopeptid bileşiğinin, bir biyolojik mücadele etmeni olarak işlev görebilmesinin yanısıra fungisidal, bakterisidal ve böcek öldürücü aktivite sergilediği de belirlenmiştir. Biyolojik mücadele etmenlerden klasik olarak izole edilen bileşiklerden olan sürfaktin ve iturin ile karşılaştırıldığında, *B. thuringiensis* CMB26'dan elde edilen lipopeptid'in, fitopatojenik etmenlere karşı daha güçlü antifungal aktivite göstermiştir.

Bu lipopeptitin, tarımda patojenlerin biyolojik kontrolü için bir aday olduğunu yapılan araştırmalar neticesinde bildirmişlerdir.

Jayakumar ve ark. (2007) tarafından yapılan çalışmada, bitki ekstraktları ve antagonist mikroorganizmalarının şeker kamışı kırmızı çürüklüğü hastalığının (*Colletotrichum falcatum*) biyo-kontrolü için tek başına ve kombinasyon halinde antifungal etkinliklerini belirlemişlerdir. *Abrus precatorius* ve *Bassia latifolia* yaprak ekstraktları ve *Curcuma longa* rizom özütü, *Colletotrichum falcatum*'un miselyal büyümesini, sırasıyla %80, %58 ve %57 engellemişlerdir. Saksı deneylerinde *Pseudomonas fluorescens* Md1 veya *A. precatorius* ile ayrı ayrı işlenen şeker kamışı ekim alanlarında, kırmızı çürüklük hastalığı %20.1 ve %24.2 rastlama sıklığı ile etkili olurken, bitki özlerinden hiçbirisi tek başına uygulandıkları tarlada hastalık çıkışı üzerinde etkili olmamıştır. Bazı ekstraktların antagonist bakterilerle kombine olarak uygulanması durumunda ise hastalık çıkışında gözle görülebilir düzeyde kontrol sağlandığı gözlemlenmiştir. Sonuçlar incelendiğinde, şeker kamışı kırmızı çürüklük hastalığının bastırılması için antagonistlerle bitki bazlı özlerin kombinasyon halinde çevre dostu bir araç olarak tarlada uygulanabilirliği önerilmiştir.

Kefialew ve Ayalew (2008) yaptıkları çalışmada, Etiyopya'nın farklı ekolojilerinde organik koşullarda yetişen mango ağaçlarından izole edilen antagonistik potansiyele sahip fungal ve bakteri izolatların izolasyonu ve izolatların mango antraknoz hastalığı etmeni *Colletotrichum gloeosporioides*'e karşı antagonist etkinliğini araştırmışlardır. Çalışmada dört bakteri, beş maya ve iki fungus izolatının antagonistik etkinliği *in vitro* koşullarda değerlendirilmiştir. İzolatların hücre süspansiyonları ve kültürleri, *in vitro* olarak *C. gloeosporioides*'in spor çimlenmesini ve misel gelişimini engellediği gözlemlenmiştir. İzolatlar, yapay olarak inokule edilmiş mango meyvesinde antraknozun hastalık şiddetini önemli ölçüde azaltmıştır. *Brevundimonas diminuta* B-62-13, *Stenotrophomonas maltophilia* L-16-12, *Enterobacteriaceae* L-19-13, *Candida membranifaciens* F-58-22 tanılanamayan maya izolatı B-65-23, doğal olarak enfekte olmuş meyveler üzerinde hastalık çıkışının engellenmesi açısından oldukça etkili olmuştur. İzolatların tek bir uygulaması, hasat edilen meyveler üzerinde mango antraknozunun kontrolü için oldukça ümitvar potansiyele sahip olduğunu göstermiştir.

De Costa ve ark. (2008) *Colletotrichum musae*'yi kontrol altına alabilmek için Sri Lanka'da yetiştirilen bir dizi tatlı ve pişirme tipi muz çeşidinin meyve yüzeylerinden antagonist bakteri izolatlarını izole etmişlerdir. Yapılan izolasyonlar sonucunda 44 bakteri, 31 fungus kökenli toplam 75 biyolojik mücadele etmeni mikroorganizma izolatu elde edilmiştir. İzole edilen izolatların %50'den fazlası, *in vitro* koşullarda *C. musae* kolonisinin gelişimini engellemiştir. *In vitro* koşullarda *C. musae*'ye karşı yüksek engelleme gösteren 32 bakteri izolatu arasında 4 farklı bakteri izolatu yapay olarak enfekte olmuş muz meyvelerinin Tween 20 içeren bir antagonist süspansiyona daldırıldığında, muz antraknozu, taç çürümesi ve çiçek burnu çürüklüğü çıkışının *in vivo* koşullarda son derece etkili şekilde engellediği görülmüştür. Kullanılan 4 farklı izolat arasından, *Burkholderia spinosa* ileriye dönük bir biyolojik mücadele etmeni olarak ileri çalışmalar için kullanılmıştır. Yapılan etkinlik çalışmalarında bakteri izolatu taç çürüklüğü hastalık çıkışının engellenmesinde %86-98 gibi yüksek bir etkinliğe sahip olduğunu göstermiştir. Bakteri izolatu *C. musae*'nin yanısıra diğer fungal etmenler olan *Bacillus spinosa*, *C. gloeosporioides*, *Botryodiplodia theobromae* ve *Thielaviopsis paradoxa* izolatlarının *in vitro* koşullarda misel gelişimini %45-73 oranları aralığında engellemiş, *in vivo* çalışmalarda ise avokado, mango ve ananas meyvelerinde antraknoz ve gövde ucu çürüklüğü hastalık çıkışını %14-34 oranında engellediği belirlenmiştir. Bu bulgulara dayanarak, yerli antagonist olan *B. spinosa*'nın, muz meyvelerinde hasat sonrası hastalıklarının biyolojik kontrolünde kullanılmak üzere umut verici bir aday olduğu sonucuna varılmıştır.

Gamagae ve ark. (2003) papaya bitkisinde antraknoza neden olan *Colletotrichum gloeosporioides* ile mücadelede *Candida oleophila* ve sodyum bikarbonat solüsyonlarının biyolojik mücadele etmeni olarak kullanılma potansiyellerini araştırdıkları çalışmalarında, %2'lik sodyum bikarbonat ile işlem yapıldığı zaman biyokontrol etmeninin gelişimini çok etkilemediği, antraknozun kontrolü için %2'lik sodyum bikarbonatın etkisi *C. oleophila* ile birleştğinde arttığı, sonuçta *C. gloeosporioides* hastalık çıkışının doğal olarak enfekte olmuş meyvelerde *C. oleophila*'nın varlığında önemli ölçüde azaldığı belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara istinaden, %2'lik sodyum bikarbonat ile antagonist *C. oleophila*'nın birlikte kullanıldığı durumda depolama sonrasında papaya bitkisindeki antraknoz hastalığının kontrolünde kimyasal kullanımına alternatif bir çözüm yolu olduğu tavsiye edilmiştir.

Kim ve ark. (2009) tarafından yapılan çalışmada, Kore’de bulunan çay tarlalarındaki çay ağaçlarının toprak üstü tüm aksanlarından antagonist bir bakteri olan *Bacillus subtilis* BD0310’u izole etmişler ve bakteri izolatının antagonistik potansiyelini *Colletotrichum theae-sinensis*’e karşı araştırmışlardır. İzole edilen antagonist SC tipi formülasyon tipinde biyofungisit olarak formüle edilmiştir. Sera uygulaması, biyofungisit hastalığı iyileştirici ve koruyuculuğunun etkili olduğunu göstermiştir. Saha denemesi, biyofungisit ve kimyasal fungisit alternatif uygulamalarının, daha az kimyasal kullanımıyla biyofungisit veya kimyasal fungisit tek uygulamasından daha etkili olduğunu göstermiştir. Bu çalışma, *B. subtilis* BD0310’un biyofungisitinin, çay tarlalarında antraknozun biyolojik kontrolü için etkili bir yöntem olduğunu göstermiştir.

Alvindhia ve Natsuaki (2009) *Lasiodiplodia theobromae*’ye karşı muz meyvelerinin yüzeyinden izole edilen, biri kremsi beyaz koloni oluşturan ve diğeri kuru maya benzeri koloni oluşturan iki bakteri izolatını, *in vitro* antagonistik etkinliğini belirlemek amacıyla test etmişlerdir. *Bacillus amyloliquefaciens* olarak tanımlanan her iki izolat, *Lasiodiplodia theobromae* nın yanı sıra kök çürümesine neden olan *Thielaviopsis paradoxa*, *Colletotrichum musae* ve *Fusarium verticillioides*’e karşı antibiyoz açısından ayrıca test edilmiştir. *B. amyloliquefaciens* DGA14 olarak kodlanan remsi beyaz koloni türü, *in vivo* ve *in vitro* çalışmalara tabi tutulmuştur. *B. amyloliquefaciens* DGA14, test edildiği tüm fungal etmenlerin misel gelişimini engelleyen besi yerinde yayılabilir bir antifungal metabolit üretmiştir. Bakteriler ayrıca sıvı besiyeri içerisinde misel gelişimi ve konidyal çimlenmeyi de önemli ölçüde engellemiştir. Muz meyvelerine püskürtme şeklinde uygulanan *B. amyloliquefaciens* DGA14 uygulamadan 2 gün sonra muz meyvelerini kolonize etmiştir. *B. amyloliquefaciens*’in paketlenme evinde hasat sonrası uygulamasının, muz meyvelerinde taç çürümesi çıkışını, fungusle muamele edilmiş veya kontrol meyvelerinde olduğundan önemli ölçüde düşürdüğü görülmüştür.

Ortega-Morales ve ark. (2009) fungal hastalık etmenlerinden *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. fragariae* ve *Fusarium oxysporum*’a karşı *Bacillus mojavensis* (üç izolat) ve *Bacillus firmus* (bir izolat) bakteri izolatlarının antagonistik etkinliklerini patates dekstroza agar (PDA) ve deniz ortamı bazlı maya ekstrakt agar (YEA) üzerinde ikili kültür testleri ile araştırmışlardır. Genel olarak, YEA üzerinde, PDA’dan daha yüksek baskılayıcı aktiviteler kaydedilmiştir. İkili kültür testlerinde *F. oxysporum* en

dirençli etmen olurken, en hassas olan fungal etmen ise *C. gloeosporioides* ATCC 42374 olmuştur. Genel olarak *Bacillus* sp. MC3B-22 izolatı, ticari biyo-kontrol preparat etken izolatı olan *Bacillus subtilis* G03'ten (KodiakA®) daha büyük bir antagonistik etki gösterdiği gözlemlenmiştir.

Zivkovic ve ark. (2010) tarafından yapılan çalışmada, beş biyolojik mücadele etmeninin (*Trichoderma harzianum*, *Gliocladium roseum*, *Bacillus subtilis*, *Streptomyces noursei* ve *Streptomyces natalensis*) antagonistik aktivitelerini, meyvelerde antraknoz patojenleri *Colletotrichum acutatum* ve *Colletotrichum gloeosporioides*'e karşı *in vitro* koşullarda test edilmiştir. Mikrobiyal antagonistler, ikili kültür testinde *Colletotrichum* izolatlarının miseloyal büyümesini ve konidial çimlenmesini önemli düzeylerde engellemiştir. Test edilen izolatlar arasında iki *Streptomyces* türü *C. acutatum* ve *C. gloeosporioides*'e karşı en güçlü antagonistik etkiyi göstermiştir. Bu çalışmanın sonucunda *T. harzianum*, *G. roseum*, *B. subtilis*, *S. natalensis* ve *S. noursei*'nin meyvelerde antraknoz hastalığına karşı ümit verici biyolojik mücadele etmenleri olarak tanımlanmıştır.

Fu ve ark. (2010) tarafından yapılan çalışmada, Çin'deki Nanning şehrinde muz bitkisinin rizosferik toprağından izole edilen ve *Bacillus subtilis* olarak tanımlanan izolatın antagonistik etkinliğini hasat sonrası yaprak leke ve antraknoz hastalığına neden olan fungal etmenler *Pseudocercospora musae* ve *Colletotrichum musae*'ya karşı araştırmışlardır. Sera denemelerine dayalı sonuçlar, antagonist bakterinin yaprak lekesi hastalığını %72.3 oranında engellediğini göstermiştir. Yapılan *in vivo* etkinlik çalışmalarında *Bacillus subtilis*'in, seralarda muz yaprağı lekesi hastalığını %48.3, hasat sonrası aşamasında ise antraknoz hastalığını %48.6 oranlarında engelleme başarısı göstermiştir.

Liu ve ark. (2010) tarafından yapılan çalışmada, iki antagonistik maya izolatının turunçgilde *Geotrichum citri-aurantii*'nin neden olduğu hasat sonrası ekşi çürüklüğü hastalığının engellenmesi üzerine antifungal etkileri ve engellemede rol oynayan olası mekanizmaları değerlendirilmiştir. *Colletotrichum laurentii* tarafından gösterilen antifungal etkinlikte rol oynayan olası mekanizmaların, besin ve alan rekabeti, dayanıklılık mekanizmalarının teşvik edilmesi ve antibiyotik bileşiklerinin salgılanmasından kaynaklandığı belirlenmiştir. Bu tür antagonistlerin kullanımı,

turunçgilde hasat sonrası ekşi çürüklüğü kontrol etmek için sentetik fungusitlere önemli bir alternatif oluşturabileceğini düşündürmüştür.

Peng ve ark. (2012) tarafından Çin'in Guizhou ve Yunnan eyaletlerinde yapılan sörvey çalışmalarında hastalıklı turunçgil yapraklarından 38 *Colletotrichum* türü izole edilmiştir. Morfolojik karakterler ve sekans verilerine göre hastalık etmeni türlerin *C. boninense*, *C. brevispora*, *C. fructicola*, *C. gloeosporioides*, *C. karstii*, *C. simmondsii* ve *C. murrayae* olduğu belirlenmiştir. Güney ilk kez İtalya'daki portakal ağaçlarından izole edilen *Colletotrichum gloeosporioides* hastalık etmenin Çin'deki hastalıklı turunçgil yapraklarındaki en yaygın tür olduğu bildirilmiştir.

Bakthavatchalu ve ark. (2013) tarafından yapılan çalışmada, *Pseudomonas aeruginosa* FP6'daki antagonistik etkinliği ve etkinlikte rol oynayan olası mekanizmalar fungal hastalık etmeni *Rhizoctonia solani* ve *Colletotrichum gloeosporioides*'e karşı araştırılmıştır. Rizosferik topraktan izole edilen FP6 olarak adlandırılan bakteri izolatu 16S rRNA analizine göre *Pseudomonas aeruginosa*'nın bir üyesi olarak tanımlanmıştır. Bu tür tarafından üretilen sekonder bileşikler, *Rhizoctonia solani* ve *Colletotrichum gloeosporioides*'e karşı geniş spektrumlu antifungal aktivite göstermiştir. Yapılan moleküler analizlerde bakteri izolatının antifungal etkinlikten sorumlu bu sekonder metaboliti üreten gene sahip olduğunu ve bu genin bakteri tarafından gösterilen antagonistik aktivitede rol oynadığı bildirilmiştir.

Huang ve ark. (2013) tarafından yapılan çalışmada, Çin'deki turunçgil alanlarında bulunan bitkilerin hastalıklı ve sağlıklı yaprak, sürgün ve meyvelerinden 312 *Colletotrichum* izolatu elde edilmiştir. Bu izolatlarının moleküler tanılamaları sonucunda yaygın fungal türlerin, *Colletotrichum*'un 3 önemli tür kompleksi olan *C. boninense*, *C. acutatum* ve turunçgil türlerinde nadir bulunan *C. truncatum* olduğu belirlenmiştir. Türlerin turunçgiller üzerinde antraknoza neden olma kabiliyetleri inokule edilerek test edilmiştir. Sonuç olarak *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. fructicola* ve *C. truncatum* izolatları turunçgil çeşitlerinde hastalık etmeni olarak belirlenmiştir.

Amarezan ve ark. (2014) tarafından yapılan çalışmada, biber bitkilerinden izole edilen endofitik bakterilerin dört farklı fungal hastalık etmenine (*Sclerotium rolfsii*, *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum capsici* ve *Pythium* sp.) karşı antagonistik potansiyelleri belirlenmiştir. Endofitik bakterilerin çoğunun (%37.8) *Pythium* sp.'ye karşı antagonistik aktivite gösterdiğini, test edilen bakteri izolatlarının %35.1'i *F. oxysporum*

ve *C. capsici*'ye, %21.6 ise *S. rolfsii*'ye karşı değişen oranlarda antagonistik aktivite gösterdiğini belirlemişlerdir. Mikrobiyal Tanımlama Sistemi (Biolog) ile potansiyel bakteri izolatlarının tanımlanması ve izolatların 16S rDNA sekanslanması, 8 bakteri türünün varlığını ortaya çıkarmıştır. Antagonist olarak elde edilen izolatlar arasında *Bacillus* spp. izolatların baskın antagonist türler olduğu belirlenmiştir. İzolatlar arasında *Bacillus* spp. BECS7, BECS4 ve BECL5 izolatları, tarla koşullarında bitki büyümesini teşvik edici etkinliğinin yanı sıra, hastalık oranında azalma ve yüksek verim sergilemiştir. Sonuçlar, test edilen antagonist bakteri izolatlarının çok sayıda biyolojik etkinlik özelliği gösteren ümit verici bitki büyümesini önemli düzeyde teşvik eden izolatlar olduğunu göstermiştir.

Dos Passos ve ark. (2014) yapmış oldukları çalışmalarında, elma yetiştiriciliğinde elma ağaçlarıyla ilişkili bitki büyümesini teşvik eden bakterilerin (PGPB) çeşitliliğini ve bunların antraknoz hastalık etmeni *Colletotrichum gloeosporioides*'e karşı antagonistik etkileri araştırmışlardır. Sağlıklı elma ağaçlarının farklı kısımlarından elde edilen bakteriler, tür düzeyinde PCR-RFLP ve 16S rRNA'nın dizilimi ile tanımlanmıştır. Tanımlanan bakteri türleri arasında en fazla sıklıkla karşılaşılan bakteri cinsi *Enterobacter* (%27.7), *Pseudomonas* (%18.7), *Burkholderia* (%13.7) ve *Rahnella* (%12.3) olarak belirlenmiştir. Test edilen 69 izolat *C. gloeosporioides*'e karşı değişen oranlarda antagonistik aktivite göstermiştir. *In vivo* sera çalışmalarında, *C. gloeosporioides*'e maruz kaldıktan beş gün sonra, *Burkholderia* sp. 89 izolatı ile inoküle edilen bitkilerin yapraklarında hastalık gelişimi ortalama %50-60 engellediği bildirilmiştir.

Hong ve ark. (2014) *Penicillium digitatum*, *P. italicum* ve *Geotrichum citri-aurantii*'nin neden olduğu yeşil küf, mavi küf ve ekşi çürüklük hastalığına karşı antagonistik bir bakteri izolatı olan *Bacillus amyloliquefaciens* HF-01, sodyum bikarbonat (SBC) ve sıcak su (HW) uygulamalarının etkinliği mandarin meyvesinde tekli ve kombinasyon halinde araştırılmıştır. Antagonist popülasyonlarının, %1 veya %2 SBC muamelesinin varlığında stabil olduğu görülmüştür ve PDA' da patojenlerin spor çimlenmesi, 2 dak. boyunca 45°C'lik sıcak su muamelesi ile büyük ölçüde kontrol edilmiştir. Sodyum bikarbonatın düşük oranlarda bireysel olarak ve sıcak su uygulamasının 6°C veya 25°C 4 hafta veya 8 hafta depolamadan sonra hastalık çıkışını azaltmasına rağmen, fungusit tedavisi kadar etkili olmadığı görülmüştür. *B.*

amyloliquefaciens'ı %2 SBC veya / ve HW ile birleştirilmiş tedavi, fungusit tedavisi kadar etkili olduğu ve çürümeyi kontrol ile karşılaştırıldığında %80'in altına düşürdüğü görülmüştür. *B. amyloliquefaciens* HF-01 tekli başına veya %2 SBC veya/ve HW ile kombinasyon halinde, 4 hafta boyunca 25 °C'de veya 8 hafta boyunca 6 °C'de depolamadan sonra meyve kalitesini bozmadan, hasat sonrası çürümeyi önemli ölçüde azaltmıştır. Bu sonuçlar, *B. amyloliquefaciens* HF-01, SBC ve HW kombinasyonunun, hasattan sonra meyve kalitesini korurken turuncgil üzerindeki hasat sonrası çürümenin kontrolü için ümitvar bir yöntem olabileceğini göstermiştir.

Aiello ve ark. (2015) 2010-2013 yılları boyunca Güney İtalya'nın Catania, Siracusa ve Enna eyaletlerinde bulunan altı farklı meyve bahçesinde yetiştirilen farklı portakal çeşitlerinde hasat öncesi hastalık belirtileri kayıt etmişlerdir. Sörvey yapılan bahçelerdeki hastalıklı ağaçlardan yapılan izolasyonlarda 56 fungal izolat elde edilmiş, bu izolatlardan 44'ü *Colletotrichum gloeosporioides*, 12'si ise *C. karstii* olarak teşhis edilmiştir.

Choudhary ve ark. (2015) *Streptomyces violascens* MT7 bakteri izolatının, turuncgil ve papaya'da hasat sonrası sorun olan çeşitli fungal hastalık etmenlerine karşı geniş spektrumlu antifungal bir etkinliğe sahip olduğunu bildirmişlerdir. Söz konusu izolatın orbital çalkayıcıda glikoz ve maya özütü besiyerinde erken gelişme fazında yüksek oranda antifungal metabolitler ürettiğini ve bu metabolitlerin uygulandığı meyvelerde hastalık çıkışının fungusit uygulamalarına eşdeğer seviyelerde etkinliklerin görüldüğü bildirilmiştir.

Ramos ve ark. (2016) Portekiz'de limon ağaçlarının sürgünlerinde geriye doğru ölüm ve kurumalara neden olan olası hastalık etmenlerini araştırdıkları çalışmalarında, izole edilen fungal etmenlerini ileri moleküler teknikler ile *Colletotrichum gloeosporioides* ve daha önceden *C. boninense* tür kompleksinden aktarılmış olan *C. karstii* olarak teşhis etmişlerdir. Söz konusu iki fungal türün farklı turuncgil tür/çeşitlerin hastalıklı sürgün, yaprak, çiçek, meyvelerinden izole edilmişlerdir. Yapılan tanılama sonuçlarına göre ülkede daha önceden yaygın tür olarak bildirilen *C. acutatum*'un yapılan sörveylerde hastalıklı dokularda tespit edilmemiştir. Hastalık etmenlerinden yaygın türün %87 ile *C. gloeosporioides* olduğu, *C. karstii*'nin genelde limonda sürgün ve dallarda kurumalara neden oluken, *C. gloeosporioides* sadece çiçeklerden izole edilmiştir. Yapılan patojenite çalışmalarında *C. karstii* ve *C. gloeosporioides* portakalların yaprak, çiçek ve meyvelerinde hastalık oluştururken, referans *C. acutatum* izolatı test edilen turuncgil

çeşitleri arasında sadece lime limon çeşidinin çiçek ve yapraklarında hastalık oluşturduğunu bildirmişlerdir.

Sawant ve ark. (2016) Hindistan'da yetiştirilen asmalarda *Colletotrichum gloeosporioides* tarafından neden olunan antraknoz hastalığı ile biyolojik mücadelesinin belirlenmesi üzerine bir çalışma yapmışlardır. Yapılan sörveyler sonucunda Hindistan'daki 43 üzüm bağı ekosisteminden 293 bakteri izole edilmiştir. Elde edilen izolatlar arasında 25 bakteri izolatu, *C. gloeosporioides*'in misellerinin gelişimini *in vitro* koşullarda önemli ölçüde engellerken, 18 bakteri izolatu *in vivo* koşullarda hastalık çıkışını önemli ölçüde azalttığını bildirmişlerdir. Etkinliği belirlenen 18 bakteriden *Bacillus* spp. izolatları mildiyö ve külleme hastalıklarını da önemli ölçüde durdurmuştur.

Douanla-Meli ve Unger (2017) tarafından yapılan çalışmada coğrafi olarak farklı 17 ülkeden 9 farklı turuncgil türünün hastalıklı dokularından *Colletotrichum* spp. ait izolatları izole etmişler ve bu izolatların moleküler filogenetik çeşitliliği, kolonizasyonu ve yaygınlığını araştırmışlardır. Elde edilen tanılama çalışmaları önceden bilinen üç türün (*Colletotrichum gloeosporioides*, *C. karstii*, *C. siamense*) yanısıra yeni bir türün tanımlanması ile sonuçlanmıştır. Yapılan moleküler çalışmalara dayanarak, *C. citri-maximae*'nin GAPDH gen bölgesine spesifik sekansındaki farklılıktan dolayı *C. gigasporum* kompleksinde yeni bir tür olarak tanımlanmıştır. *Colletotrichum*'un yaygınlığı turuncgil türleri arasında değişiklik gösterir ve en fazla portakal meyvelerinde görülmüştür. En yaygın tür *C. gloeosporioides* olup, bu türü *C. siamense* izlemiştir. Yeni türler dışında izole edilmiş diğer tüm *Colletotrichum* türleri turuncgil yapraklarını da kolonize eder, ama meyvelerdeki genel çeşitlilik, yapraklarınkinden daha az olabilir.

Montiel ve ark. (2017) tarafından yapılan çalışmada, mango meyvesinde *Colletotrichum gloeosporioides*'in neden olduğu antraknoz hastalığına karşı dört maya (*Debaryomyces hansenii*, *Rhodotorula minuta*, *Cryptococcus laurentii* ve *Cryptococcus diffluens*) ve üç bakteri (*Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis* ve *Stenotrophomonas rhizophila*) izolatın antagonistik potansiyeli araştırılmıştır. Yapılan *in vitro* testlerde *C. gloeosporioides* sporlarının çimlenmesi test edilen tüm bakteri ve maya izolatları tarafından önemli ölçüde engellenmiştir. Mayalar ve bakteriler mango meyvesi üzerinde test edildiğinde, *D. hansenii* 1R11CB ile *S. rhizophila* KM02 türü, sırasıyla %56 ve %89 oranında hastalık çıkışını önemli ölçüde azaltan ve antraknoza karşı en iyi etkinlik gösteren antagonistler olarak belirlenmiştir. *In vitro* ve *in vivo* deneylerden elde edilen

sonuçlar, deniz kökenli maya ve bakteri türlerinin mangoda antraknoz için etkili biyolojik mücadele etmenleri olarak kullanabileceğini göstermiştir.

Riera ve ark. (2017) Huanglongbing (HLB) hastalığından sorumlu bakteriyel hastalık etmeni *Candidatus Liberibacter asiaticus* (Las), kök sistemi dahil turunçgil bitkilerinin floeminde yaşarlar. Yapılan bu çalışmada, *Candidatus Liberibacter asiaticus* ile ilişkili altı farklı yararlı bakteri izolatı öncelikle iki hastalık etmeni bakteri türüne (*Agrobacterium tumefaciens* ve *Sinorhizobium meliloti*) karşı antimikrobiyal etkinliği araştırılmış, daha sonra yapılan çalışmada izolatların antifungal etkinliği  fungal (*Alternaria alternata*, *Colletotrichum acutatum*, *Phyllosticta citricarpa*) iki oomycete (*Phytophthora nicotianae* ve *Phytophthora palmivora*) hastalık etmenine karşı test edilmiştir. Elde edilen 6 izolat arasından 4 izolat (*Burkholderia territorii* A63, *Burkholderia metallica* A53, *Pseudomonas geniculata* 95 ve *Bacillus pumilus* 104)'ın, ikili kültür antagonistik etkinlik çalışmalarında turunçgil kök patojeni *Phytophthora nicotianae*'ye karşı yüksek düzeyde antagonistik etkiye sahip olduğu gözlenmiştir. Fosfor zndrme, siderefor üretimi ile demir alımı, uçucu organik bileşik üretimi, ozmo proteksiyon ve ozmotik tolerans, fitohormon üretimi, antagonizm ve besin rekabeti ile ilgili genlerin teşvik edilmesi hastalık etmenin engellenmesinde rol oynayan olası mekanizmalar olarak tahmin edilmiştir.

Guarnaccia ve ark. (2017) *Colletotrichum* türlerinin geniş bir konukçu dizilimine sahip olan ve konukçu bitkileri üzerinde saprofit ve endofit olarak yaşadığını, turunçgillerde hasat öncesi ve sonrası enfeksiyon oluşturan *Colletotrichum* türünün antraknoz, eklenme sonrası meyve dökümü, meyvede u rklğ gibi bilinen belirtilere neden olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar tarafından yapılan bu çalışmada *Colletotrichum* spp.'nin oluşumu, çeşitliliği ve patojenisitesi araştırılmıştır. Bu kapsamda 2015 ve 2016 yıllarında Yunanistan, İtalya, Portekiz, İşpanya ve Malta'da srveyler yapılmıştır. Yapılan srveyler sonucunda toplamda 174 *Colletotrichum*, enfekteli yaprak, meyve, taç yaprak ve dallardan izole edilmiştir. 7 farklı gen bölgesine (ITS, GAPDH, ACT, CAL, CHS-1, HIS3 ve TUB2) ait moleküler tanılama sonucunda belirlenen izolatların morfolojik karakterlerine göre çok lokuslu bir grup oluşturulmuştur. Bu izolatlar ile turunçgiller üzerinde yapılan patojenisite testleri sonucunda *Colletotrichum* türleri, üç ana complex türün yeleri olarak belirlenmiştir. *C. karstii* ve *C. gloeosporioides* izole edilen *Colletotrichum*'un en baskın türleri olarak belirlenmiştir.

Chaisu (2018) Tayland'da Gros Michel muz hastalığına neden olan mikroorganizma türlerini incelemek ve antagonistik bakteriler kullanarak hasat sonrası muz hastalıklarının engelleme oranını belirlemek için bir çalışma yapmıştır. Elde edilen izolasyon sonuçlarına göre *Curvularia* sp., *Nigrospora* sp., *Fusarium* sp., ve *Colletotrichum circinans* izolatları muz meyvelerinde sorun hastalık etmeni fungal türler olarak belirlenmiştir. Antagonist bakteri izolatları *Bacillus subtilis*, *B. amyloliquefaciens* UN1 ve B23'in *Curvularia* sp.'yi %80 oranında, *Fusarium* spp.'yi ise %66,67 oranında engellediği tespit edilmiştir.

Soto ve ark. (2018) limon meyvelerinde hasat sonrası önemli hastalıklara neden olan fungal etmenlerden *Geotrichum citri-aurantii*, *Penicillium digitatum*, *P. italicum* ve *Phyllosticta citricarpa*'ya karşı sağlıklı meyvelerin yüzeylerinden izole ettikleri faydalı bakteri, maya ve fungal izolatlarını; *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis*, *Paenibacillus polymyxa*, *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas syringae*, *Candida membranifaciens*, *Candida utilis*, *Cryptococcus laurentii*, *Debaryomyces hansenii*, *Kloeckera apiculata*, *Metschnikowia* spp., *Pichia guilliermondii*, *Pichia membranifaciens*, *Rhodosporidium paludigenum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aureobasidium pullulans*, *Nodulisporium* spp. ve *Trichoderma* spp. olarak teşhis etmişlerdir. Araştırmacılar elde ettikleri sonuçlardan yola çıkarak, bakteri, maya ve fungal antagonist izolatların *in vitro* ve *in vivo* etkinliklerine göre limon meyvelerinde hasat sonrası hastalıklara neden olan 3 fungal etmene karşı biyolojik mücadele etmeni olarak kullanılabileceğini önermişlerdir.

Bazioli ve ark. (2019) turunçgil meyvelerinde *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum* ve *Geotrichum citri-aurantii*'nin neden olduğu hasat sonrası çürüklük hastalıklara karşı oldukça savunmasız olduğu bilinmektedir. Bu hastalık etmenleri tarafından limon yetiştiriciliğinde neden olunan ekonomik kayıpların engellenmesinde çoğunlukla kontrol amaçlı olarak kullanılan ve insan sağlığı ve çevre üzerinde zararlı etkileri olabilen imazalil, thiabendazol, pyrimethanil ve fludioxonil gibi sentetik fungisitlerin kullanılmasıyla en aza indirilmiştir. Çeşitli çalışmalar, mikrobiyal antagonistler ve doğal ürünler kullanılarak yapılan biyolojik kontrolün, en çok kullanılan ticari fungisitlerin yanısıra turunçgillerde hasat sonrası hastalıkları kontrol etmede etkili olabileceğini göstermiştir. Bu nedenle, mikrobiyal kökenli biyolojik mücadele etmenleri, sentetik fungusitlere kıyasla önemli ölçüde daha güvenli olmasının yanında düşük

toksositeye neden olması kimyasal mücadeleye en etkili alternatif mücadele yöntemi olduğu bildirilmiştir.

Damasceno ve ark. (2019) muz meyveleri, *Colletotrichum musae*'nin neden olduğu antraknoz gibi önemli hasat sonrası hastalığına en duyarlı gıda ürünlerinden biridir. Etmen, meyveleri hasat öncesi dönemde enfekte ederken genelde hastalık belirtileri hasat sonrası meyve olgunluğunun ileri evresinde ortaya çıkar. Hastalık etmeni ile biyolojik mücadele kapsamında 12 bakteri izolatu seçilmiş, yapılan *in vivo* testlerde *Bacillus velezensis*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescent* ve *Stenotrophomonas maltophilia* izolatları antraknozun kontrolünde oldukça etkili olmuştur. *Bacillus velezensis* hastalık gelişimini engellemede thiabendazole (Tecto SC) fungusitine benzer bir etkinlik göstermiştir. Antagonist bakteri izolatu *Bacillus velezensis* miseliyal gelişimin yanı sıra etmenin muz meyveleri üzerinde sporulasyonunu da yüksek düzeyde engellemiştir. Bu sonuçlardan yola çıkılarak biyolojik mücadele etmeni bakterinin insan patojeni olmaması nedeniyle hastalıkla mücadelede muz meyvelerine püskürtme veya daldırma şeklinde doğrudan uygulanabileceğini tavsiye etmişlerdir.

Daoud ve ark. (2019) Tunus'un kuzey bölgesindeki önemli turuncgil üretim alanlarında dal ve sürgünlerde kurumlara neden olan hastalık etmenlerinin belirlenmesine yönelik 2014-2015 döneminde yapmış oldukları sörvey çalışmalarında farklı turuncgil çeşitlerine ait kurumakta olan hastalıklı bitki örneklerinden 7 farklı tek spor fungal izolatu elde etmişlerdir. Araştırmacıların yaptıkları morfolojik ve moleküler çalışmalar sonucunda 7 izolattan 6 tanesinin *C. gloeosporioides*, 1 tanesininde *C. karstii* olduğu belirlenmiştir. Elde ettikleri sonuca göre *C. karstii* Tunus'da yetişen turuncgillerde hastalığa neden olduğu ilk kez bu çalışma ile ortaya konulmuştur.

Mayorquin ve ark. (2019) Kalifornia vadisinde turuncgil dal, sürgün ve yapraklarında kurumlara neden olan fungal hastalık etmenlerinin araştırdıkları çalışmalarında, kurumlardan sorumlu fungal türlerden birinin *Colletotrichum gloeosporioides*, diğerinin ise daha önce bildirilmemiş bir etmen olduğunu belirlemişlerdir. Araştırmacıların yaptıkları detaylı morfolojik ve moleküler analizler sonucunda Kalifornia vadisinde söz konusu etmenlerin *C. gloeosporioides* ve *C. karstii* olduklarını, etmenlerden *C. karstii*'nin A.B.D için ilk kez bu çalışma ile ortaya konulduğunu bildirmişlerdir.

Reyes-Perez ve ark. (2019) deniz suyundan izole edilen *Stenotrophomonas rhizophila*'nın biyolojik mücadele etmeni olarak mangoda meyve antraknoz hastalığı etmeni *Colletotrichum gloeosporioides*'e karşı *in vitro* ve *in vivo* koşullarda araştırmışlardır. Elde edilen mekanizmalara göre bakteri tarafından fungal etmenin misel gelişiminin ve spor çimlenmesinin engellenmesinde rol oynayan olası antagonistik mekanizmaların bakteri uçucu bileşenleri (VOC) üretimi, besin için rekabet ve bakterinin üretmiş olduğu hücre duvarını yıkan litik enzimlerden kaynaklandığı görülmüştür. Antagonist bakteri meyve yüzeyine 10^8 cfu/ml konsantrasyonu uygulandığında, meyvelerde hastalık çıkışı %95, lezyon çapı ise %85 oranlarında azalmış olup, sonuçta bakteri uygulaması sentetik fungusitten daha fazla koruma sağlamıştır.

Uysal ve Kurt (2019) 2011 yılında yapmış oldukları sörveyler sırasında ülkemizin Akdeniz bölgesinde yetiştiriciliği yapılan limon ve mandarin ağaçlarının sürgün ve yapraklarda kurumalara neden olan hastalık etmenini izole edip, standart morfolojik ve moleküler yöntemler kullanarak etmeni *Colletotrichum karstii* olarak teşhis etmişlerdir.

Ayon ve ark. (2020) Meksika'nın Nayarit eyaletinde yapılan tarçın üretiminde *Pestalotiopsis* sp. ve *Colletotrichum gloeosporioides* kuru çürüklüğe neden olurken, *Lasiodiplodia pseudotheobromae* yumuşak çürüklüğe neden olmuştur. Bu çalışmada, 3 *Streptomyces*, 3 *Trichoderma* ve 3 *Bacillus* türünün *in vitro* fungal etmenlere karşı antagonistik potansiyelleri değerlendirilmiştir. *Trichoderma* türleri, ele alınan patojenlerin gelişimini farklı düzeylerde engellemiştir. *In vitro* koşullarda *C. gloeosporioides*, *Pestalotiopsis* sp. ve *L. pseudotheobromae* etmenlerinin misel gelişimi sırasıyla %60.4, %59.3 ve %57.9 engelleme oranları ile en yüksek düzeyde engelleyen izolatan *Trichoderma longibrachiatum* olduğu, bakteriyel isolatlar arasında *B. methylotrophicus*'in *Pestalotiopsis* sp.'ye karşı %58.2 engelleme oranı ile testlerde en yüksek engelleme kapasitesini gösteren bakteriyel izolat olduğu görülmüştür.

Ferreira ve ark. (2020) topraktan izole edip tanımladıkları farklı *Trichoderma* spp. turuncgil meyvelerinde hasat sonrası önemli çürüme ve kayıplara neden olan fungal hastalık etmenlerinden *Penicillium digitatum*, *Alternaria alternata* ve *Colletotrichum gloeosporioides*'e karşı biyolojik mücadelede kullanım olanaklarını araştırmışlardır. İzolasyonlar sonucunda 7 izolatı *Trichoderma harzianum*, *T. guizhouense*, *T. atroviride* ve *T. koningiopsis* olarak teşhis etmiş olup, bu isolatlardan 5 tanesinin fungal etmenlere karşı *in vitro* antagonistik etkinlik gösterdiklerini belirlemişlerdir. İzolatlar arasında *T.*

harzianum IC-30 izolatının hasatsonu çürümleri %80 oranında engellemek suretiyle en iyi etkinlik gösteren etmen olduğunu belirlemişlerdir. Bu izolatın kitinaz ve glukinaz enzim aktivitesi göstermek suretiyle antagonistik etkinlikte bulunduğu belirlenmiştir.

Guerrero-barajans ve ark. (2020) avakado antraknoz hastalığı etmeni *Colletotrichum gloeosporioides*'e karşı kimyasal mücadeleye alternatif mücadele kapsamında Meksika, Moreles, Ocuituca'da bulunan meyve bahçelerindeki ağaçların kök bölgelerindeki toprak örneklerinden antifungal aktiviteye sahip 136 tane bakteri izole etmişlerdir. *C. gloeosporioides* tür kompleksinin bir üyesine karşı; sadece 3 bakteri izolatının (A1, A2 ve A3) fungal etmenin misel gelişmesini sırasıyla %75, %70 ve %60 oranında azalttığını tespit etmişlerdir. Bu izolatlardan ikisi, 16S rRNA sekans dizi analizleri sonucuna göre *Bacillus mycoides* (A1 ve A2) ve *Bacillus tequilensis* (A3) olarak tanımlanmıştır. *Bacillus mycoides*, avakadodan izole edilen *C. gloeosporioides*'in tür kompleksinin bir üyesinin misel gelişimini %65 oranında azaltırken, *Bacillus tequilensis* inokulasyondan 3 gün sonra %25 oranında azaltmıştır. *Bacillus mycoides* izolatı avakado meyvelerinde antraknoz hastalığını %41.9 oranında azaltmıştır. Elde edilen sonuçlar, *B. mycoides*'i hastalıkla mücadelede potansiyel bir biyolojik mücadele etmeni olarak kullanma olasılığını ortaya koymuştur.

Reyes-Estebanez ve ark. (2020) Güney Meksika'da yetişen mango ağaçlarının yapraklarından izole edilen bakterilerin antagonistik potansiyellerini, mango antaknoz hastalığı etmeni *Colletotrichum gloeosporioides* var. *minor*'e karşı araştırmışlardır. İzolasyonlar sonucu elde edilen 108 farklı izolatın PDA besiyeri üzerinde *in vitro* ikili kültür testlerinde antagonistik etkinlikleri belirlenmiş ve sonuçta 4 izolatın önemli düzeyde antifungal etkinlik gösterdiğini tespit etmişlerdir. Yapılan 16S moleküler tanılama sonucunda en etkili izolatın *Bacillus velezensis* TS3B-45 olduğu belirlenmiştir. Antagonist bakterinin *in vitro* etkinliği kitosan, iki farklı sentetik fungusit (benomyl ve prochloraz), NaHCO₃ ve *B. subtilis* ATCC 55614 izolatının etkinlikleri ile karşılaştırılmıştır. Sonuçlar *B. velezensis* TS3B-45 izolatı, prokoloraz (%82) ve *B. subtilis* ATCC 55614 (%77) ile benzer düzeyde (%80) *in vitro* engelleme etkinliği göstermiştir. *Bacillus velezensis* TS3B-45, izolatının *C. gloeosporioides*'in yanı sıra *Colletotrichum* spp., *Curvularia clavata*, *Pestalotiopsis maculans*, *Fusarium solani* ve *Fusarium nivale* dahil olmak üzere diğer fungal bitki patojenlerine karşıda etkili olduğu gözlenmiştir. *In vivo* testler, *B. velezensis* izolatının, hasat sonrası koşullarda *C. gloeosporioides*'e karşı

etkinliğini teyit etmiştir. Yapılan istatistik analizlerde bakteri izolatının etkinliği ticari mikrobiyal preparat olan Serenade (*B. subtilis*) tarafından sergilenenlerden önemli ölçüde farklılık göstermemiştir. Yapılan pomolojik ve fizyolojik testlerde, *B. velezensis* TS3B-45, 32 günlük saklama işlemi ve raf koşullarından sonra olgunluk indeksi, meyve ağırlığı, indirgenmiş şeker ve mangoların asitliği gibi bir dizi kalite parametresini etkilememiştir.



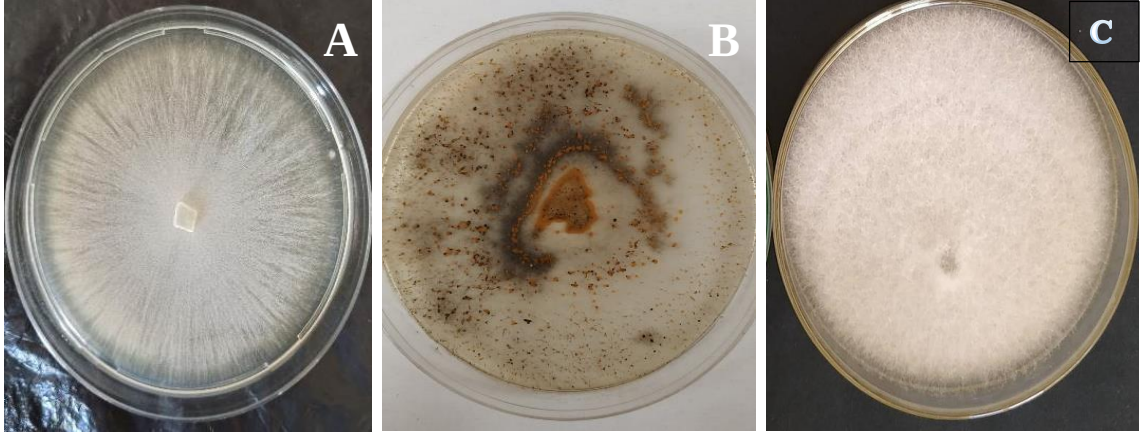
3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

Biyoetkinlik çalışmalarında kullanılan ve çalışmanın ana materyalini oluşturan virulent fungal hastalık etmenleri *Fusarium solani* Cfs8, *Colletotrichum gloeosporioides* LC5 ve *Geotrichum citri-aurantii* MKUGca2 HMKÜ BİSAK Araştırma ve Uygulama Merkezinde bulunan fungal kültür koleksiyonundan temin edilmiştir. Bu patojenler daha önceki çalışmalarda Hatay ilinin önemli turuncgil yetiştiriciliğinin yapıldığı Erzin ilçesinde yetişen tipik hastalık belirtisi gösteren portakal (çeşit Washington Navel), mandarin (çeşit Owari Satsuma) ve limon (çeşit Meyer) ağaçlarının kök, gövde, sürgün, yaprak ve meyvelerinden Patates Dekstroz Agar (**PDA**) besi yeri üzerinde izole edilmiş, morfolojik ve moleküler olarak tanılanmışlardır (Şekil 3.1; Kurt ve ark., 2019; Kurt ve ark., 2020; Kara ve ark., 2020)

Aday antagonist bakteriler ile fungal hastalık etmenlerin izolasyonunda, rutin *in vitro* antifungal etkinlik denemeleri ile bakterilerin etki mekanizmalarının araştırıldığı çalışmalarda Patates Dekstroz Agar (**PDA**), King's B Agar (**KB**), Trypic Soybean Agar (**TSA**), Luria Broth (**LB**) ve Pepton Water (**PW**) gibi ticari olarak temin edilen besi yerlerinin (Merck, Darmstad, Germany), içerikleri Ek-1'de sunulmuştur.

In vitro biyokontrol etkinlik ve mekanizmaların belirlendiği çalışmalarda mikoloji ve bakteriyoloji laboratuvarında rutin olarak kullanılan otoklav, inkübatör, etüv, steril kabin, orbital çalkalayıcı inkübatör, UV Spektrofotometre gibi alet-ekipmanlar, çeşitli cam ve plastik laboratuvar malzemeleri ve kimyasal maddeler kullanılmıştır.

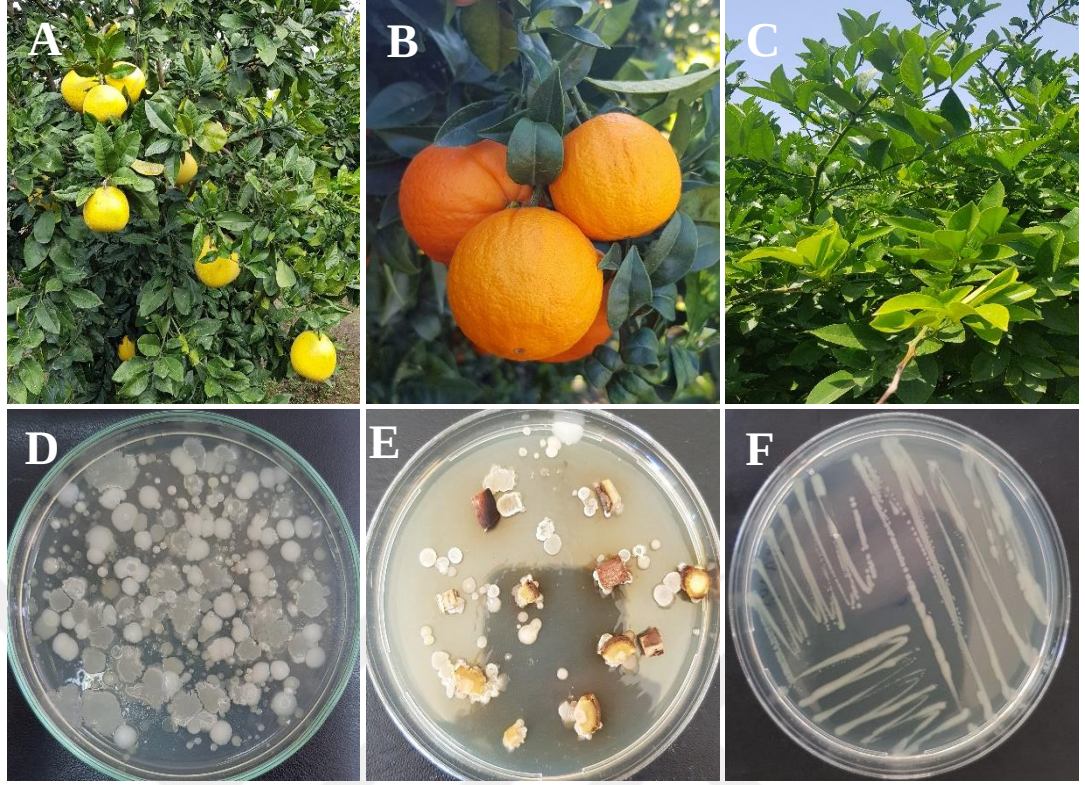


Şekil 3.1. Denemelerde kullanılan *Geotrichum citri-aurantii* (A), *Colletotrichum gloeosporioides* (B) ve *Fusarium solani* (C) izolatlarının tek spor kültürleri

3.2. Yöntem

3.2.1. Sağlıklı Turunçgil Ağaçlarının Farklı Dokularından Endofit ve Epifit ve Bakterilerin İzolasyonu ve Tanılanması

Turunçgillerde sorun olan fungal etmenlere karşı biyokontrol etkinliği araştırılan aday epifit ve endofit antagonist/PGPB karakterli bakteriyel izolatlar sağlıklı turunçgil ağaçların kök, yaprak, sürgün ve meyvelerinden izole edilmiştir (Şekil 3.2). Aday bakteri izolatların izole edildiği dokuların seçiminde, hastalık belirtilerinin gözlemlendiği ağaçların hemen yanındaki hastalığın görülmediği ağaçlardan güdümlü örneklemeler yapılmıştır.



Şekil 3.2. (A-C) Sağlıklı turunçgil ağaçlarının farklı bitki kısımlarından epifit ve endofit bakteri izolatların besi yeri üzerine izolasyonu (D-E) ve saflaştırılması (F)

3.2.1.1. Endofit ve Epifit Bakterilerin İzolasyonu

Farklı turunçgil çeşitlerinden alınan sağlıklı bitki örnekleri bahçeden getirildikten sonra kök, gövde, sürgün, yaprak ve gövde olarak gruplandırılmış ve her gruba ayrı bir kod verilmiştir. Endofit bakteri izolasyonu için, bitki örneklerinin yüzeyleri muhtemel fungal/bakteriyel epifit kontaminantların uzaklaştırılması amacıyla temiz çeşme suyu altında yıkanmış, daha sonra %70'lik etanol (3 dak.) ve %2'lik sodyum hipoklorit solüsyonunda (2 dak.) bekletilmek suretiyle yüzey dezenfeksiyonları tamamlanmıştır. Örneklerden bakteri izolasyonuna geçilmeden hemen önce 5 kez steril saf su ile yıkanarak yüzeyden çamaşır suyu/alkol uzaklaştırılmış, böylece örneklerin yüzey dezenfeksiyonları tamamlanmıştır. Yüzey dezenfeksiyonu tamamlanan sağlıklı bitki dokuları 0.05 mM $MgCl_2$ tampon çözeltisi içinde steril havan içerisinde iyice ezildikten sonra 5 dak. bekletilmiştir. Buradan alınan bakteri süspansiyonu 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 ve 10^6 olacak şekilde seri olarak sulandırılmış ve seçici KB besi yeri üzerine bagetle yayılmak suretiyle ekimleri yapılmıştır. Meyve ve taze sürgün/gövde içerisinden yapılan endofit

izolasyonlarında imprint (baskılama) yöntemi kullanılarak doğrudan bitki dokularından izolasyonlar yapılmıştır (Atay, 2019). Bu yöntemde, yüzey dezenfeksiyonu yapılmış meyve ve taze sürgün/gövdeler aseptik olarak steril bistürü ile ortadan ikiye kesilmiş, dokuların iç yüzeyleri doğrudan KB besi yeri yüzeyine sürülerek izolasyonları gerçekleştirilmiştir.

Aday epifit bakterilerin izolasyonunda sağlıklı bitki kısımlarına ön dezenfeksiyon amaçlı herhangi işlem yapılmamıştır. Sağlıklı bitki dokuları 1-2 cm boyunda kesildikten sonra bitki dokuları veya toprak-kök karışımı (5 gr) doğrudan steril 0.05 mM $MgCl_2$ tampon çözeltisi (yaklaşık 50 ml) içine konulup, 30 dak. 200 rpm orbita çalkalayıcı içerisinde çalkalamaya bırakılmış, daha sonra buradan alınan süspansiyonlar seri olarak sulandırıldıktan (10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 ve 10^6) sonra KB besi içeren petri kaplarına bagetle yayılmıştır. Bazı petriler içerisindeki besiyerleri üzerine sağlıklı kök dokuları doğrudan konularak kök yüzeyinden bakterilerin izolasyonları gerçekleştirilmiştir.

Bakteri ekimlerinin yapıldığı tüm petriler gelişimleri için 26 °C’de 24-48 saat inkübatör içerisinde inkübasyona bırakıldıktan sonra, seçici besi yerlerinde gelişen morfolojik olarak birbirinden farklı görünüşteki bakteri izolatlarından bitki örneğini/bölgeyi temsil edecek sayıda tek bakteri kolonilerden gerek teşhis, gerekse biyoetkinlik çalışmalarında kullanılmak üzere TSA besi yerleri üzerinde saflaştırmaları yapılmıştır. Bölgeyi/örneği temsilen seçilmiş her bir izolat, rutin çalışmalar için uygun besi yeri içeren petri kabında (6 cm) veya eğik Agarda +4 °C de kısa süreli veya %40 lık steril Gliserol içeren Cryo Eppendorf tüpler içerisinde -80 °C de saklanmıştır.

3.2.1.2. Endofit ve Epifit Bakteri İzolatlarının Seçimi

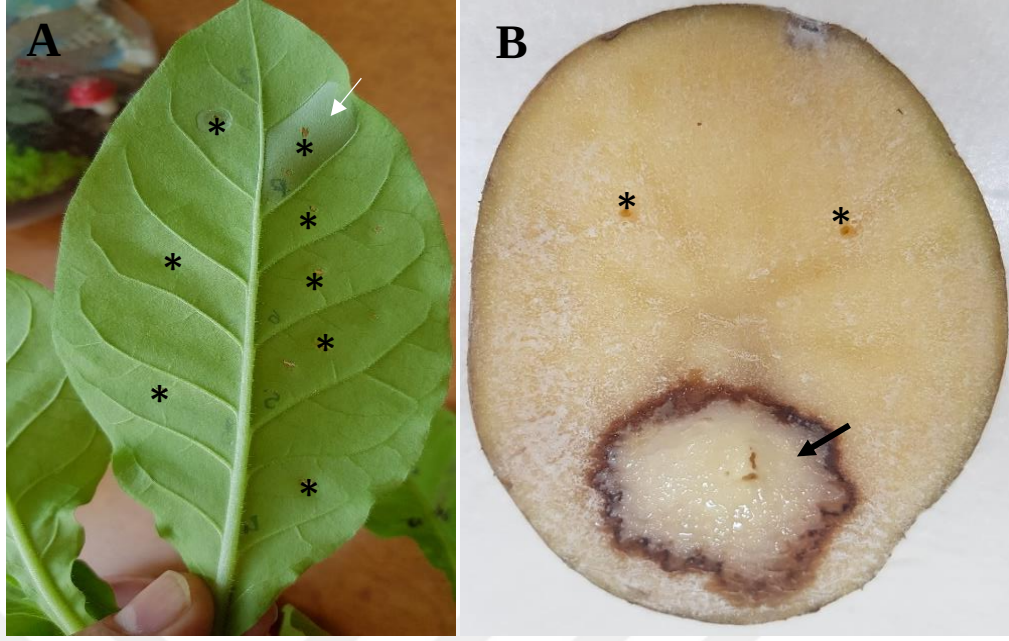
Biyoetkinlik çalışmalarına başlamadan önce farklı bölgeyi/bitki örneğini temsil edecek şekilde seçilmiş aday epifit ve endofit bakteri izolatların tamamı bütün yaprakları üzerinde aşırı duyarlılık (HR) testine tabi tutulmak suretiyle (Şekil 3.3A,B) bitki patojen olup olmadıkları belirlenmiştir. Aday bakteri izolatları öncelikle TSA besi ortamında 48 saat geliştirilmiş, gelişen kültürlerden steril kürdan yardımıyla alınan bakteri hücresi içerisinde 5 ml steril 0.05 mM $MgCl_2$ tampon içeren tüplerine alınmış, kısa bir vortekslemeden sonra inokulasyonda kullanılacak bakteri süspansiyonları (10^8 hücre/ml yoğunluğunda) elde edilmiştir. Testlemede pozitif kontrol olarak BİSAK Kültür

Koleksiyon Merkezinden sağlanan bitki patojeni *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* Pph12 izolatu kullanılmıştır. Bakteri süspansiyonları steril bir enjektör yardımıyla 2 aylık genç tütün (*Nicotiana tobaccum*) yapraklarının damar arasına gelecek şekilde alt yüzeyinden enjekte edilmiştir.

İnokule edilen bitkiler oda sıcaklığında (25 °C) inkübasyona bırakılmıştır. İnokulasyondan 1 ila 2 gün sonra tütün yapraklarındaki inokulasyon noktalarında ortaya çıkan nekrotik doku çöküntüleri HR pozitif (test edilen bakteri izolatu bitki patojeni olduğunu gösterir), herhangi bir reaksiyonun gözlenmemesi ise HR negatif (bakteri izolatu bitki patojeni olmadığını gösterir) olarak değerlendirilmiştir (Lelliot ve Stead, 1987).

Tütün yapraklarında yapılan HR testinde negatif sonuç veren aday bakteri izolatları ayrıca patates dilimleri üzerinde “yumuşak çürüklük” testine tabi tutularak pektolitik enzim üretme yetenekleri belirlenmiştir. Yumuşak çürüklük testlerinde kontrol olarak BİSAK Kültür Koleksiyon Merkezinden temin edilen *Pectobacterium caratovorum* subsp. *caratovorum* izolatu kullanılmıştır. Sağlıklı patates yumruları çeşme suyu altında iyice yıkanıp kurutulduktan sonra öncelikle %3'lük NaOCl'de 1 dak. bekletilerek yüzey dezenfeksiyonu yapılmış, daha sonra steril kabin içerisinde steril bistürü yardımıyla 2 cm genişliğinde dilimlenmiştir. Aseptik olarak kesilen patates dilimleri alt tabanlarında steril nemli filtre kâğıdı bulunduran plastik saklama kaplarında petri kapaklar üzerine yerleştirildikten sonra üst yüzeyleri steril kürdan yardımıyla 48 saatlik taze bakteri kültürlerinden alınan bakteri kütlesiyle bulaştırılmıştır (şekil 3.3C). İnokulasyon yapılmış patates dilimlerin bulunduğu saklama kutuları 26 °C 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra, tüm dilimler inokulasyon noktalarında tipik yumuşak çürüklük belirtileri gelişip gelişmediği yönünden incelenmiştir (Lelliot ve Stead, 1987).

Aday epifit ve endofit bakteri izolatların seçiminde kullanılan bir diğer kıstas, tütün HR ve patates yumuşak çürüklük testlerinde “negatif” sonuç veren izolatların “insan patojeni” olup olmadığının belirlenmesidir. Her iki test sonucunda negatif olarak değerlendirilen aday bakteri izolatları TSA besi yerine çizildikten sonra 37 °C en az 48-72 saat inkübasyona bırakılmış, burada “gelişmeyen” bakteri izolatları gerek tanılama gerekse biyoetkinlik çalışmalarında “aday biyolojik mücadele etmeni” izolatlar olarak değerlendirilmeye alınmıştır.



Şekil 3.3. (A) tütün yapraklarında aşırı duyarlılık testi (HR), (B) patates dilimleri üzerinde yumuşak çürüklük testi. İnokulasyon noktalarında (*) patojen tarafından oluşturulan tipik HR (ok) ve yumuşak çürüklük (ok) belirtileri

3.2.1.3. Aday Endofit ve Epifit Bakteri İzolatlarının Tanılanması

Aday epifit ve endofit bakteri izolatlarının tanılanması çalışmalarında tütün yapraklarında HR, patates dilimleri üzerinde yumuşak çürüklük oluşturmeyen, aynı zamanda 37 °C gelişme göstermeyen aday bakteri izolatları kullanılmıştır. Tanılama çalışmaları HMKÜ BİSAK Uygulama ve Araştırma Merkezinde (<http://www.mku.edu.tr/departments.aspx?birim=218>) yürütülmüştür. Saf kültürde gelişen tek koloni izolatların tanılanması MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany) yöntemi kullanılarak yapılmıştır (Aktan ve Soylu, 2020). Aday bakteri izolatları TSA (Tryptic Soy Agar) besiyeri üzerine 3 faz halinde çizilip 1-2 gün gelişmeye bırakıldıktan sonra besiyeri üzerinde gelişen aday antagonist bakteri izolatlarının “tek bakteri kolonisi”nden bakteri kütlesi steril kürdan yardımıyla alındıktan sonra 1 ml %70 etanol bulunan steril eppendorf tüplerinde süspansiyon haline getirilmiştir. Elde edilen bakteri süspansiyonu 13.000 rpm’de 2 dak. santrifüj edildikten sonra, süpernatant atılıp altta kalan pelet oda sıcaklığında yaklaşık 5 dak. kurumaya bırakılmıştır. Kurutulan bakteri hücresi üzerine 30 µl %70 formik asit eklenerek vortekslenmiştir. Daha sonra vortekslenen tüplere aynı hacimde (30 µl) acetonitril

eklendikten sonra karışım tekrar vortekslenmiştir. Elde edilen süspansiyon 13.000 rpm’de 2 dak. boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası alttaki bakteri hücrelerine dokunmadan üst kısmındaki süpernatant kısmından 1µl alınarak MALDI TOF örnek plakasındaki (target) noktalara iki tekrarlı olacak şekilde mikropipetle eklenmiştir. Targetler oda sıcaklığında yaklaşık 3-5 dak. kurumaya bırakılmıştır. Target üzerinde kuruyan bakteri örnekleri üzerine 1 µl MALDI-TOF matrix solusyonu (α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid) konulmuştur. Target tekrar 2-3 dak. oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Üzerlerindeki bakteri örneklerinin tamamen kuruduğu targetler, MALDI-TOF MS (Microflex LT; Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany) cihazına yüklendikten sonra çalıştırılmıştır. Bakteri izolatların tür teşhisleri cihazın yazılımı ile mikroganizma kütüphanesindeki standart türlerin spektralarıyla eşleştirilmek suretiyle (BIOTYPER™ 1.1 software (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany) yapılmıştır (Aktan ve Soylu, 2020).

Bakteri izolatların kesin tür tanılamaları firma tarafından önerilen skor (değerlere) puanlarına göre yapılmıştır. Bu değerlendirmede, tanılama skor değeri 2.30 ile 3.0 aralığında belirlenen bakteri izolatının tanısı “**tür düzeyinde oldukça güvenilir olduğu**”; tanılama skor değeri 2.00 ile 2.299 aralığında belirlenen bakteri izolatının tanısı “**cins düzeyinde güvenilir, tür düzeyinde yüksek güvenilir olduğu**”; tanılama skor değeri 1.70 ile 1.999 aralığında belirlenen bakteri izolatının tanısı “**cins düzeyinde güvenilir, tür olarak muhtemel düzeyde olduğu**” şeklinde değerlendirilmiştir. Tanılama skor değeri 1.7 değerinden aşağı olan türlerin tanısı ise “**güvensiz tanı**” olarak değerlendirilmiş olup, değerlendirmeye alınmamıştır.

3.2.2. Fungal Hastalık Etmenlerine Karşı Aday Antagonist Bakteri İzolatlarının *in vitro* Antagonistik Etkinliğinin Belirlenmesi

Farklı turuncgil meyve ağaçlarından izole edilen, tür düzeylerindeki tanılamaları MALDI-TOF ile yapılan aday epifit ve endofit bakteri izolatlarının *in vitro* biyokontrol etkinlik potansiyelleri fungal hastalık etmenleri, *Geotrichum citri-aurantii*, *Colletotrichum gloeosporioides* ve *Fusarium solani*’ye karşı belirlenmiştir. Bakteri izolatlarının fungal etmenlerin misel gelişimini engelleme (antagonistik) etkinlikleri 9 cm çapında, içerisinde TSA+PDA (1:1) besi yeri içeren Petri kaplarında “ikili kültür”

testleriyle belirlenmiştir (Şekil 3.4). İkili kültür testlerinde petrinin üst noktasından 2 cm gerisine çizgi ekim yöntemi ile çizilmiş bakteri izolatları 25 °C’de 48 saat süre ile ön inkübasyona bırakılmıştır. Bu sürenin sonunda 5 günlük fungal kültürlerinden alınan 6 mm çaplı misel diskleri gelişen bakteri kolonisinden 4 cm gerisine yerleştirilmiş ve tekrar gelişmeye bırakılmıştır (Şekil 3.4). TSA+PDA besiyerlerine herhangi bir bakteri izolatı çizilmemiş, sadece fungal izolatın yerleştirildiği petriler “kontrol” olarak kullanılmıştır. İkili kültür testlerinde, “kontrol” petrilerinde bulunan fungal hastalık etmeni izolatlar petriyi tamamen kapladıkları zaman (fungal etmenlere göre değişmekle birlikte genelde inokulasyondan 4-5 gün sonra), tüm petrilerde fungal etmenlerin bakteriye doğru yönelen misel gelişim (MGu) mesafeleri cetvelle ölçülmüştür. Bakterilerin antagonistik (engelleme) etkinlikleri, kontrol petrilerdeki misel gelişim uzunlukları (MGk) baz alınarak her bir bakteri izolatın misel gelişimini engelleme oranları %Abbot formülü kullanılmak suretiyle hesaplanmıştır (Soylu ve ark., 2020).

$$\% \text{Engelleme} = ((\text{MGk} - \text{MGu}) / \text{MGk}) * 100$$

Her bakteri izolatı için ölçümler 3 ayrı petri kabında gerçekleştirilmiş olup, denemenin tekrerrü 2 farklı zamanda yapılmıştır.



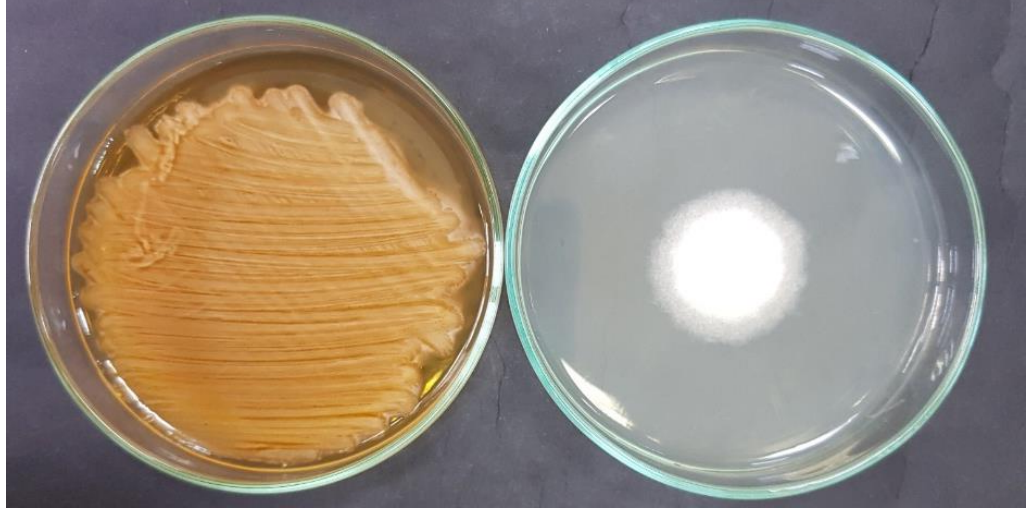
Şekil 3.4. Epifit veya endofit bakterilerin *in vitro* ikili kültür testleri ile fungal hastalık etmeninin misel gelişiminin engellemesi (ok) üzerine etkilerinin belirlenmesi

3.2.2.1. Antagonist Bakteri İzolatları Tarafından Oluşturulan Engelleme Bölgelerin Fungisidal ve Fungistatik Özelliklerinin Belirlenmesi

Antagonist bakterilerin fungal etmenlerin misel gelişimini engelledikleri bölgelerdeki etkinin fungisidal veya fungistatik özellikleri, bu bölgeye yerleştirilen fungus misellerin gelişip gelişmemelerine göre değerlendirilmiştir. Engelleme gözlenen alanlara sağlıklı fungus misel diskleri (6 mm çapında) yerleştirildikten sonra 5 gün inkübasyona bırakılmıştır. Engelleme bölgesine yerleştirilmiş olan misel disklerinden gelişmenin gerçekleşmemesi, söz konusu bölgede antagonist bakteri tarafından üretilen antimikrobiyal bileşik(ler)in etkiliğinin **fungisidal**, gelişme gerçekleşmiş ise antimikrobiyal bileşik(ler)in etkinliğinin **fungistatik** özellikte olduğunu göstermiştir.

3.2.2.2. Bakteri İzolatlarının Uçucu Bileşen(ler)inin *in vitro* Antagonistik Etkinliğinin Belirlenmesi

Bakteri izolatları tarafından üretilen uçucu bileşen(ler)inin *in vitro* koşullarda antifungal etkinlikleri daha önceden bildirilmiş “kapalı ikili kültür (sealed plate)” testleri ile belirlenmiştir (Chaves-Lopez ve ark. 2015). İkili kültür testlerinden farklı olarak, test edilecek antagonist bakteri izolatu içinde TSA besiyeri olan petri kapağına çizilmiş, fungus izolatu (6 mm disk) ise içerisinde PDA besiyeri olan diğer petri kapağına yerleştirilmiştir. Daha sonra her iki kapak yüzeyleri birbirlerine bakacak şekilde birleştirildikten sonra kapatılmış ve kenarları parafilm ile sarılmak suretiyle oluşan uçucu bileşenlerin ortamdan uzaklaşması engellenmiştir. Kontrol uygulaması olarak TSA besiyeri üzerine herhangi bir bakteri izolatu çizilmemiş, diğer PDA içeren kapağına sadece fungus misel diski yerleştirilmiştir (Şekil 3.5). Uygulama sonrası petriler 25 °C ye ayarlanmış inkübatörler içerisinde inkübasyona bırakılmıştır. Kontrol petrilerinde bulunan fungus gelişimi tamamlandıktan sonra (fungal türlere bağlı olmak üzere genelde inkübasyonun 4-7 günlerinde), fungal izolatların misel gelişimi (MG_u) çapları ölçülmüş ve kontrol petrilerdeki misel (MG_k) gelişim çaplarına kıyaslanarak % engelleme oranları hesaplanmıştır. Her bakteri izolatu için ölçümler 3 ayrı petri kabında gerçekleştirilmiş olup, denemenin tekrerrü 2 farklı zamanda yapılmıştır.



Şekil 3.5. Epifit veya endofit bakterilerin uçucu bileşenlerinin *in vitro* ikili kültür testleri ile fungal hastalık etmeninin misel gelişiminin engellemesi üzerine etkilerinin belirlenmesi. Üst kapağa (sol) bakteri izolatu alt kapağa (sağ) ise fungal izolat inokule edilmiştir

3.2.2.3. Bakteri İzolatlarının Fungal Etmenleri Engellemede Kullandıkları Antagonistik ve Bitki Gelişimini Teşvik Eden Mekanizmalarının Belirlenmesi

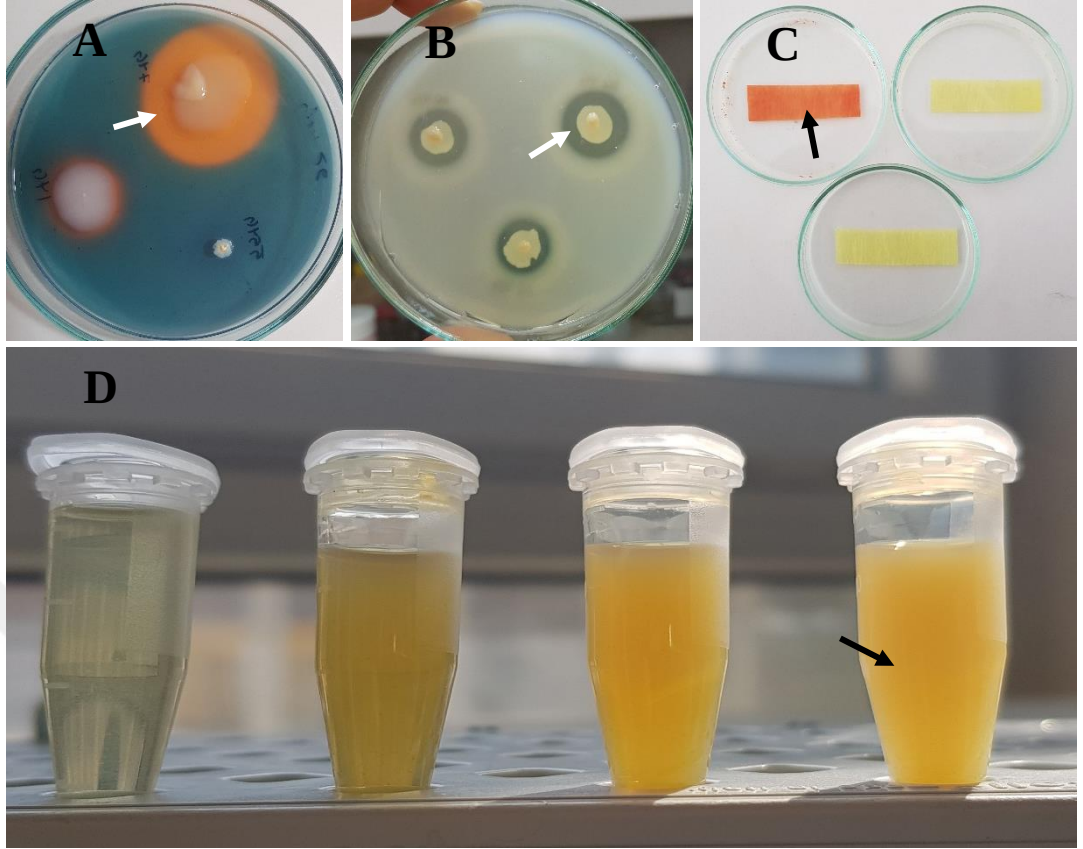
Bakteri izolatlarının fungal etmenleri engellemede kullandıkları antagonistik ve bitki gelişimini teşvik eden mekanizmalarının belirlenmesi çalışmalarında kullanılan izolatların seçiminde *in vitro* ikili kültür testlerinin sonuçlarına dayanarak alınmıştır. İzolatların seçiminde; tanılandığı tür, misel gelişimini engelleme etkinlikleri ve izole edildikleri bitki türleri göz önüne alınmıştır. Antagonist endofit ve epifit bakteri izolatlarının misel gelişiminin engellenmesinde rol oynayan antagonizm mekanizmalarından olan siderofor, proteaz (proleatik aktivite), hidrojen siyanür (HCN) ve amonyak (NH₃) üretme potansiyellerinin yanısıra, bitki gelişimini teşvik eden mekanizmalardan sayılan indol asetik asit (IAA) üretme ve fosforu çözme gibi etkinlikleri belirlenmiştir.

3.2.2.4. Hastalık Etmeninin Gelişimini Engellemede Bakteri İzolatlarının Kullandıkları Antagonistik Etki Mekanizmaları

Fungal etmenin misel gelişiminin engellenmesinde rol oynayan antagonistik etki mekanizmalarından olan siderofor, proteaz enzimi (proteolitik), hidrojen siyanür (HCN)

ve amonyak üretme potansiyellerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar özel besi ortamları üzerinde yürütülmüştür (Şekil 3.6).

Chrom Azurol-S Agar (CAS) besi yeri üzerinde (Schwyn ve Neilands, 1987) bakteri izolatlarının siderofor üretim potansiyelleri araştırılmış olup, %2 yağı alınmış süt tozu (Skimmed Milk Powder, Merck, Darmstadt, Germany) bulunan Luria Broth Agar (SMLBA) besi yeri üzerinde proteaz enzimi üretim potansiyelleri belirlenmiştir (Perneel ve ark., 2007). Bakterilerin siderofor ve proteaz enzimi üretim potansiyeli belirleme çalışmalarında; steril kürdan yardımıyla 2 günlük aday bakteri izolatından alınan bakteri kolonisi, CAS ve SMLBA besi yerleri üzerine 3 farklı noktaya inokule edilmişlerdir. Ekimleri yapılan bakteri izolatları 26 °C’de 2 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır (Şekil 3.5A,B). Bu süre sonunda, CAS besiyeri yüzeylerinde inokule edilmiş bakteri kolonisi etrafında oluşan “sarı-turuncu” renkteki engelleme bölgesi (zon) ile SMLBA besi yeri üzerine inokule edilmiş bakteri kolonisi etrafında gelişen “şeffaf” renkteki engelleme bölgeleri, test edilen bakterinin siderofor ve proteolitik aktivitesi yönünden pozitif olduğunu göstermiştir. Oluşan engelleme bölgeleri ile bu noktalarda gelişen bakteri koloni çapları ayrı ayrı ölçülmüştür. Bakteri izolatları için Siderofor (Sid-indeks) ve Proteolitik (Pro-indeks) etkinlik indeks değerleri, besiyerlerinde ölçülen engelleme zon çapının bakteri koloni çapına oranlanması ile hesaplanmıştır (Vazquez ve ark., 2000). Her bakteri izolatı için ölçümler 3 ayrı petri kabında gerçekleştirilmiş olup, denemenin tekrerrü 2 farklı zamanda yapılmıştır.



Şekil 3.6. Epifit ve endofit bakterilerin (A) siderofor, (B) proteaz enzimi (proteolitik), (C) hidrojen siyanür (HCN) ve (D) amonyak üretme (ok) potansiyellerinin belirlenmesi

Aday bakteri izolatlarının bir diğer antagonistik mekanizmalardan olan “hidrojen siyanür (HCN)” üretim potansiyelleri daha önceden bildirilen yönteme göre belirlenmiştir. Castric (1977) tarafından seçimi yapılmış 2 günlük taze bakteri kültüründen alınan antagonist bakteri izolatları 4.4 gr/L glycine içeren TSA besi yerlerine “yüzeyi tamamen kaplayacak” şekilde çizilmiştir. Bakteri izolatlarının çizildikleri petrilerin (6 cm çapında) kapağına 0.5-1.0 ml %2 picric acid + 1% sodium carbonate (Na_2CO_3) süspansiyonu (100 ml steril su+2 gr PA+1 gr Na_2CO_3) ile ıslatılmış steril kaba filtre kağıdı (1x3 cm şerit halinde kesilmiş) yerleştirilmiştir. Parafilm ile etrafları sıkıca kapatılmış olan uygulama yapılmış petriler 26 °C’de 4 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda, HCN üretiminin oluşumu, petri kapağında “beyaz/açık sarı renginde”ki filtre kâğıdının “kahverengi/koyu kırmızı”ya dönüşmesi ile belirlenmiştir (Şekil 3.6C).

Bakteri izolatlarının bir diğer antagonistik etki mekanizmalarından olan “amonyak (NH_3) oluşturma” etkinlikleri Cappuccino ve Sherman, (2013) tarafından önceden

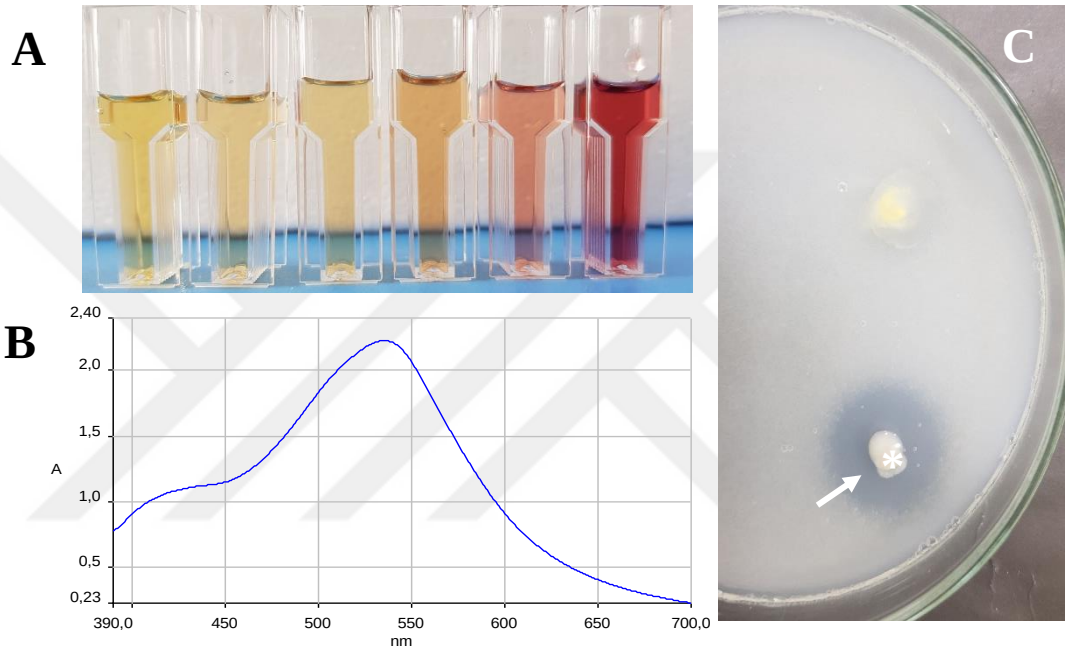
bildirildiği şekilde Pepton Water (PW) besiyelerine Nessler's çözeltisi eklenmek suretiyle belirlenmiştir. İçerisinde steril 5 ml PW içeren cam tüplere steril öze yardımıyla 2 günlük taze test edilen bakteri izolatlarının kültüründen alınan bakteri kolonisi aşılanmıştır. İnokulasyonların yapıldığı tüpler 150 rpm'e ayarlı inkübatörlü orbital çalkalayıcıda 26 °C'de 4 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Söz konusu bulaştırmaların yapıldığı tüplerde gelişen bakteri süspansiyonları üzerine Nessler's çözeltisi 250 µl hacminde ilave edildikten hemen sonra (2-4 saniye) besi yeri içerisinde üretilen "amonyak" birikiminin olup olmadığı, tüplerdeki besi yeri renginin "açık sarı"dan "kahverengi-koyu sarı" renge dönüşmesiyle kalitatif (gözlemlerle) olarak tespit edilmiştir (Şekil 3.6D).

Söz konusu testlerde bakteri izolatu için ölçümler ve değerlendirmeler 3 ayrı petri/eppendorf içerisinde gerçekleştirilmiş olup, denemenin tekrerrürrü 2 farklı zamanda yapılmıştır.

3.2.2.5. Bakteri İzolatlarının Bitki Gelişimini Teşvik Etmede Kullandıkları Etki Mekanizmaların Belirlenmesi

Bakteri izolatlarının bitki gelişimini teşvik etmede rol oynayan mekanizmalardan indol asetik asit (IAA) üretme ve fosforu çözme etkinlikleri söz konusu bu mekanizmalara yönelik hazırlanan özel besi yerleri üzerinde belirlenmiştir. Bakterilerin IAA üretme yetenekleri Glickman ve Dessaux, (1995) tarafından tarif edildiği şekilde Salkowski yöntemi kullanılarak tespit edilmiştir. Seçilmiş bakteri izolatların 48 saatlik taze kültürlerinden bakteri süspansiyonu (10^8 hücre/ml) hazırlandıktan sonra, 500 µl hacmindeki süspansiyon L-tryptophan (3 mg ml^{-1}) içeren 5 ml steril LB besi yeri bulunan cam tüplere (10x120 mm) aşılanmıştır. Bakteri izolatlarının aşılandığı besi yeri içeren tüpler 26 °C ayarlı inkübatörlü orbital çalkalayıcı (200 rpm) üzerinde 4 gün süreyle tekrar inkübasyona bırakılmıştır. Tüplerdeki sıvı besi yerinde gelişen bakteri süspansiyonundan alınan 2 ml süspansiyon soğutmalı santrifüjde 5000 rpm'de 30 dak. santrifüj edilmiştir. Daha sonra tüplerin üstte kalan sıvı kısmından alınan 1 ml süspansiyon steril eppendorf tüplere aktarılmış, üzerlerine yaklaşık 40 µl fosforik asit ilave edilmiştir. Karışımın tamamı 2 ml Salkowski çözeltisi (150 ml %98'lik H_2SO_4 , 250 ml of distile H_2O , 7.5 ml of 0.5 M $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) içeren steril cam tüplere aktarılmıştır. Bu şekilde karıştırılmış olan tüm tüpler inkübatörler içerisinde 25 °C'de 30 dak. olmak üzere karanlık ortamda inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda karışımların bulunduğu

tüplerin içerisindeki süspansiyon renginin “açık sarı”dan “kırmızı-pembe” rene dönüşmesi, test edilen bakteri izolatının besiyeri içeriğinde IAA ürettiğini (Şekil 3.5A) göstermiştir. Tüpler içinde üretilen IAA miktarları UV-vis spektrofotometre (Perkin Elmer, Lamda 25, USA) cihazı ile 535 nm dalga boyunda ölçülmek suretiyle (Şekil 3.5B) belirlenmiştir (Patten ve Glick, 2002). Bakteriler tarafından üretilen IAA miktarları standart IAA (Merck, Darmstadt, Germany) çözeltisi ile hazırlanan “standart konsantrasyon eğrisiyle” karşılaştırılmak suretiyle µg/ml (ppm) düzeyinde belirlenmiştir.



Şekil 3.7. Endofit ve epifit bakteri izolatların IAA üretme ve fosforu çözme potansiyelleri. (A) Bakteriyel izolatlar tarafından besiyeri içinde üretilen IAA’nın renk değişimi ile belirginleşmesi. (B) *Pseudomonas koreensis* YGL72ep izolatı tarafından üretilen IAA 535 nm dalga boyundaki absorbans spektrumu (C) Bakteri izolatları tarafından besiyerinde fosforu çözme (ok) potansiyelleri büyüklüğü bakteri koloni çapına (*) kıyaslanmak suretiyle kantitatif olarak hesaplanmıştır

Bakterilerin fosforu çözme yetenekleri Pikovskaya Agar (PVK) besiyerinde tri kalsiyum fosfat $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (Ek-2) bileşiğinin çözülme şiddetine göre petrilerde belirlenmiştir (Kumar ve ark., 2012). PVK besiyeri üzerine taze bakteri kültürlerinden steril kürdan ile alınıp 3 farklı noktaya aşılandıktan sonra, petriler 26 °C’de 7 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan 5 gün sonra bakteri izolatlarının geliştiği noktalardaki kolonilerin etrafında gelişen şeffaf engelleme bölgeleri, test edilen bakteri izolatının fosforu çözme yeteneğinde olduğunu göstermiştir (Şekil 3.5C). Bakteri

izolatlarının fosfor çözme etkinliği, ölçülen zon çapının gelişen bakteri kolonisinin çapına oranlanması ile fosfor çözme İndeks değerleri (Fos-indeks) belirlenmiştir (Vazquez ve ark., 2000). Söz konusu testlerde bakteri izolatu için ölçümler ve değerlendirmeler 3 ayrı petri/ependorf içerisinde gerçekleştirilmiş olup, denemenin tekrerrü 2 farklı zamanda yapılmıştır. Her bakteri izolatu için ölçümler 3 farklı tüp/petri kabında yapılmış olup, deneme 2 farklı zamanda tekrar edilmiştir.

3.2.3. Deneme Deseni ve İstatistik Analizler

Bakterilerin fungal etmenlere karşı etkinlikleri ve etki mekanizmalarının araştırıldığı tüm *in vitro* denemeler tesadüf parselleri deneme desenine göre, her bir uygulama için 3 tekrerrü olacak şekilde kurulmuştur. Denemelerde elde edilen değerlere SPSS istatistik programı (SPSS Statistics 17.0) kullanılarak tek yönlü varyans analizi yapılmış ve uygulamalar arasındaki farklılık Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi ($P \leq 0.05$) ile analiz edilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. Sağlıklı Turunçgil Ağaçlarının Farklı Bitki Kısımlarından Aday Endofit ve Epifit Bakteri İzolatlarının İzolasyonu ve Tanılanması

Hatay ilinin önemli turunçgil yetiştiriciliğinin yapıldığı alanlardaki bahçelerde *F. solani*, *G.citri-aurantii* ve *Colletotrichum gloeosporioides* hastalık etmenleri tarafından oluşturulan, solgunluk, gövde dokularında ve iletim demetlerinde kahverengileşme ve çürüme, sulanmış meyve, hafif kabarıklıklar, meyve çürüklüğü, yapraklarda leke, erken dönem yaprak ve meyve dökümleri, meyvelerde antraknoz belirtileri gösteren hasta ağaçların yanı başındaki ağaçların sağlıklı toprak altı (kök, kök boğazı ve köklere yakın topraklardan) ve toprak üstü (sürgün, yaprak ve meyve) aksamlarından biyokontrol etkinlik çalışmalarında kullanılmak amacıyla aday epifit ve endofit bakteri izolatları elde edilmiştir. İzolasyonlar sonucu elde edilen farklı morfolojik görünüme sahip izolatlar, izole edildikleri konukçu bitki, epifit/endofitlik durumu, bitki kısmı ve izole edildiği petriyi temsil edecek şekilde seçilmişlerdir. Söz konusu kriterlere göre yapılan seçimler sonucu 53 izolat epifit, 32 izolat endofit olmak üzere toplam 85 bakteri izolatı elde edilmiştir (Şekil 3.2).

Elde edilen bakteri izolatlarının bitkilerde hastalık etmeni olup olmadığını belirlemek amacıyla patates meyvesi dilimlerinde yumuşak çürüklük testi ve sağlıklı tütün bitkisinin yapraklarında HR (Şekil 3.3) testleri yapılmıştır. Yapılan testler sonucunda bitkide hastalık etmeni olmadığını sonucuna varılan 26 endofit, 45'i ise epifit olmak üzere toplam 71 aday bakteri izolatı elde edilmiştir.

MALDI-TOF tanılama çalışmaları sonucunda indeks değeri 1.7 ve üzerinde olan toplam 71 bakteri izolattan, 51 izolat Gram-pozitif, 20 izolat ise Gram-negatif olarak belirlenmiştir. Tür düzeyinde kesin teşhisi yapılan ve literatüre göre insan/hayvan/gıda patojenleri olduğu tespit edilen (*Bordetella petrii*, *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp. ve *Staphylococcus* spp.) türlere ait izolatlar çalışmalara dahil edilmemiş olup, bu izolatlar dışında kalan 48 bakteri izolatına ait tanılama sonuçları Çizelge 4.1' de sunulmuştur. Elde edilen izolatların 15 adedi sürgün-gövde, 10 adedi kök, 18 adedi meyve, 5 adedi ise sağlıklı turunçgil ağaçların yapraklarından izole edilmiştir. Elde edilen izolatların 27 tanesi epifit, 21 tanesi endofit kökenlidir. Bu izolatların konukçu bitkilere

göre dağılımlarına bakıldığında, 7 izolat limon ağacından, 15 mandarin, 4 izolat kamkat, 4 izolat kaba limon, 9 izolat portakal, 7 izolat şadok, 2 izolat ise turunç ağacından elde edilmiştir. İzolatların kodlaması toplayan kişinin baş harfleri (**YG**, Yusuf Gümüş), konukçusu (**L**, limon; **M**, mandarin; **P**, portakal; **K**, kamkat; **KL**, kaba limon; **S**, şadok; **T**, turunç) ve izole edildiği yere (**en**, endofit; **ep**, epifit) göre yapılmıştır.

Elde edilen bakterilerin cins düzeyinde dağılımı incelendiğinde 27 farklı türe ait bakteri izolatları arasından en yaygın izolatan 22 adet ile *Bacillus* cinsine ait olduğu, içerik olarak 7 izolatla *Lysinibacillus*, 3 izolatla *Acinetobacter*, ikişer izolatla *Pseudomonas* ve *Kosakonia*, birer izolatla *Burkholderia*, *Cronobacter*, *Curtobacterium*, *Enterobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Pantoea*, *Rahnella*, *Raoultella*, *Rhizobium*, *Siccibacter* ve *Staphylococcus* cinsleri bulunmuştur.

MALDI-TOF yöntemi kullanılarak tür düzeyinde kesin teşhisi yapılan 48 izolatan 15 tanesi Gram-negatif, 33 tanesi Gram-pozitif, tür olarak teşhis edilmiştir. Gram negatif olarak belirlenen toplam 15 izolattan; 3 izolat *Acinetobacter* spp., 2 izolat *Pseudomonas* spp., 2 izolat *Kosakonia cowanii*, birer izolat ise *Enterobacter xiangfangensis*, *Herbaspirillum aquaticum*, *Klebsiella oxycota*, *Pantoea agglomerans*, *Rahnella aquatilis*, *Raoultella ornithinolytica*, *Rhizobium radiobacter*, *Siccibacter colletis* olarak tür düzeyinde teşhis edilmiştir.

Gram pozitif olarak belirlenen toplam 33 izolattan, 9 izolat *Bacillus cereus*, 7 izolat *Lysinibacillus sphaericus*, 4 izolat *Bacillus megaterium*, 2 izolat *Bacillus mojavensis* ve *Bacillus subtilis*, birer izolat ise *Bacillus endophyticus*, *Bacillus safensis*, *Bacillus simplex*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus vallismortis*, *Burkholderia cepacia*, *Cronobacter sakazakii*, *Curtobacterium flaccumfaciens* ve *Staphylococcus succinus* olarak tür düzeyinde teşhis edilmiştir.

Çizelge 4.1. Farklı turuncgil türlerinden izole edilen endofit ve epifit bakteri izolatların tanımlama sonuçları

<i>Bakteri İzolatı^a</i>	İzole Edildiği Organ	Konukçu Türü	Gram Reaksiyon	MALDI Benzerlik
<i>Acinetobacter johnsonii</i> YGM76en	Meyve/en	Mandarin	-	2.280
<i>Acinetobacter lwoffii</i> YGL60en	Meyve/en	Limon	-	2.053
<i>Acinetobacter lwoffii</i> YGS37en	Sürgün/en	Şadok	-	2.063
<i>Bacillus cereus</i> YGK25en	Meyve/en	Kumkat	+	2.350
<i>Bacillus cereus</i> YGK28ep	Meyve/ep	Kumkat	+	2.381
<i>Bacillus cereus</i> YGK31en	Meyve/en	Kumkat	+	2.172
<i>Bacillus cereus</i> YGKL16ep	Yaprak/ep	Kaba Limon	+	2.362
<i>Bacillus cereus</i> YGM3ep	Yaprak/ep	Mandarin	+	2.393
<i>Bacillus cereus</i> YGM9en	Meyve/en	Mandarin	+	2.404
<i>Bacillus cereus</i> YGP1en	Sürgün/en	Portakal	+	2.317
<i>Bacillus cereus</i> YGP6en	Sürgün/en	Portakal	+	2.363
<i>Bacillus cereus</i> YGS13ep	Yaprak/ep	Şadok	+	2.252
<i>Bacillus endophyticus</i> YGL74en	Meyve/en	Limon	+	2.101
<i>Bacillus megaterium</i> YGL68ep	Kök/ep	Limon	+	2.345
<i>Bacillus megaterium</i> YGM12en	Sürgün/en	Mandarin	+	2.364
<i>Bacillus megaterium</i> YGM5ep	Meyve/en	Mandarin	+	2.325
<i>Bacillus megaterium</i> YGT18ep	Kök/ep	Turunç	+	2.121
<i>Bacillus mojavensis</i> YGL69ep	Meyve/ep	Limon	+	2.354
<i>Bacillus mojavensis</i> YGM15en	Sürgün/en	Mandarin	+	1.820
<i>Bacillus safaensis</i> YGM83ep	Kök/ep	Mandarin	+	1.742
<i>Bacillus simplex</i> YGS12ep	Kök/ep	Şadok	+	1.868
<i>Bacillus subtilis</i> YGS19ep	Kök/ep	Şadok	+	1.874
<i>Bacillus subtilis</i> YGS5en	Sürgün/en	Şadok	+	1.869
<i>Bacillus</i> YGT22en	Meyve/en	Turunç	+	2.283
<i>Bacillus vallismortis</i> YGL73ep	Gövde/ep	Limon	+	2.011
<i>Burkholderia cepacia</i> YGM75ep	Kök/ep	Mandarin	+	2.371
<i>Cronobacter sakazakii</i> YGKL12ep	Sürgün/ep	Kaba Limon	+	1.815
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> YGS25en	Kök/en	Şadok	+	2.081
<i>Enterobacter xiangfangensis</i> YGM80ep	Gövde/ep	Mandarin	-	2.109
<i>Herbaspirillum aquaticum</i> YGM78ep	Sürgün/ep	Mandarin	-	1.943
<i>Klebsiella oxycota</i> YGP62en	Meyve/en	Portakal	-	1.729
<i>Kosakonia cowanii</i> YGKL17en	Meyve/en	Kaba Limon	-	1.939
<i>Kosakonia cowanii</i> YGP7en	Meyve/en	Portakal	-	2.077
<i>Lysinibacillus sphaericus</i> YGK24en	Sürgün/en	Kumkat	+	2.393
<i>Lysinibacillus sphaericus</i> YGKL15en	Sürgün/en	Kaba Limon	+	2.283

Çizelge 4.1. (Devam) Farklı turunçgil türlerinden izole edilen endofit ve epifit bakteri izolatların tanımlama sonuçları

<i>Bakteri İzolatı^a</i>	İzole Edildiği Kısım	Konukçusu	Gram Reaksiyon	MALDI Benzerlik
<i>Lysinibacillus sphaericus</i> YGM10en	Meyve/en	Mandarin	+	2.278
<i>Lysinibacillus sphaericus</i> YGM4ep	Meyve/ep	Mandarin	+	2.165
<i>Lysinibacillus sphaericus</i> YGP3en	Sürgün/en	Portakal	+	2.396
<i>Lysinibacillus sphaericus</i> YGP4en	Meyve/en	Portakal	+	2.393
<i>Lysinibacillus sphaericus</i> YGS35ep	Kök/ep	Şadok	+	2.242
<i>Pantoea agglomerans</i> YGM81ep	Meyve/ep	Mandarin	-	2.126
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> YGM82ep	Sürgün/ep	Mandarin	-	2.299
<i>Pseudomonas koreensis</i> YGL72ep	Kök/ep	Limon	-	1.817
<i>Rahnella aquatilis</i> YGP63ep	Yaprak/ep	Portakal	-	1.802
<i>Raoultella ornithinolytica</i> YGP64en	Sürgün/en	Portakal	-	1.743
<i>Rhizobium radiobacter</i> YGM77ep	Kök/ep	Mandarin	-	1.760
<i>Siccibacter colletis</i> YGP67ep	Yaprak/ep	Portakal	-	1.740
<i>Staphylococcus succinus</i> YGL55ep	Meyve/ep	Limon	+	2.097

^a İzolat isimlerinde, **L**, limon; **M**, mandarin; **P**, portakal; **K**, kamkat; **KL**, kaba limon; **S**, şadok; **T**, turunç; **en**, endofit; **ep**, epifit olduklarını ifade eder.

Belirlenmiş olan izolatlar arasında *Acinetobacter lwoffii*, *Bacillus cereus*, *Bacillus pumilis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Lysinibacillus sphaericus* türlerin farklı turunçgil ağaçlarının farklı bitki kısımlarından hem endofit hemde epifit kökenli izolatlar elde edilmiştir.

Hastalıklarla biyolojik mücadelede kullanılan farklı türlere ait pek çok faydalı fungal, bakteriyel, viral kökenli mikroorganizmaların tarımsal öneme sahip bitkilerin rizosfer (kök ve köklerin etrafındaki toprak bölgesi) ve fillosfer (yaprak, gövde, sürgün ve çiçek gibi toprak üstü kısımlarda) bölgelerinde konukçu türleri ile etkileşim içerisinde yaşamlarını sürdürdükleri bildirilmiştir. Bu alanlardan α , β ve γ Proteobacteria şubesinin yanı sıra Firmicutes ve Actinobakteri türlerine ait farklı endofit ve epifit karakterlerde bakteri izolatları elde edilmiştir. Yapılan tanımlama çalışmaları sonucunda benzer tür(ler)e ait endofit bakteri izolatlarının aynı zamanda bitkilerin farklı kısımlarında epifit olarakta yaşadıkları, bitkilerin iç dokularında yaşayan endofit bakteri izolatların ise toprakta veya bitki yüzeylerinde yaşayan rizosfer/fillosfer kökenli epifit bakterilerin alt populasyon grubunda olabileceği bildirmiştir (Hallmann ve ark., 1997; Sturz ve ark., 2000; Rosenblueth ve Martínez-Romero, 2006; Sun ve ark., 2009; Marquez-Santacruz ve ark., 2010; Romero ve ark., 2014; Shi ve ark., 2014; Santayo ve ark., 2016; Sülü ve ark., 2016).

4.2. Endofit ve Epifit Bakterilerin Turunçgil Fungal Patojenlerinin Misel Gelişiminin Engellenmesi Üzerine Antagonistik Etkinlikleri

Bitki patojeni olmadığı patates dilimleri ve tütün yaprakları üzerinde yapılan patojenisite testler (HR ve patates çürüklük testleri) sonucu belirlenen 48 bakteri izolatının fungal *G. citri-aurantii*, *Colletotrichum gloeosporioides* ve *F. solani* hastalık etmenlerinin misel gelişimini engellemesindeki antagonistik etkinlikleri “ikili kültür” testlemeleriyle belirlenmiştir (Şekil 3.4).

In vitro ikili kültür test sonuçlarına göre kullanılan tüm izolatların test edildikleri 3 farklı tür hastalık etmenin misel gelişimlerini zayıftan güçlüye olmak üzere değişen oranlarda engellediği belirlenmiştir (Çizelge 4.2, Çizelge 4.3 ve Çizelge 4.4). Bakteri izolatlarının fungal hastalık etmenlerinin misel gelişimlerini engelleme oranlarına göre;

- (i) **hiç engelleyemeyenler,**
- (ii) **%0.5-24.9 zayıf düzeyinde engelleyenler,**
- (iii) **%25.0-49.9 orta düzeyinde engelleyenler ve**
- (iv) **%50.0>güçlü düzeyde engelleyen** izolatlar olmak üzere 4 farklı kategoride sınıflandırılmıştır (Dalal ve Kulkarni, 2013).

4.2.1. Endofit ve Epifit Bakteri İzolatlarının *G. citri-aurantii* Misel Gelişiminin Engellenmesi üzerine *in vitro* Antagonistik Etkinlikleri

In vitro ikili kültür çalışmalarında kullanılan 48 endofit ve epifit bakteri izolatının *G. citri-aurantii* misel gelişimini farklılı düzeylerde engellediği belirlenmiştir. İkili kültür testlerinde miseliyal gelişimi 14 izolatın misel gelişimini **zayıf düzeyde**, 13 izolatın misel gelişimini **orta düzeyde**, 21 izolatın ise **güçlü düzeyde** engellediği belirlenmiştir (Şekil 4.6). Yapılan istatistik analizler, etkinlik gösteren izolatlar arasında önemli farklılıkların bulunduğunu, Gram negatif bakteri izolatı olan *Pseudomonas chlororaphis* dışında genelde Gram pozitif bakteri türlerinin (özellikle *Bacillus* spp. bağlı izolatlar) fungal hastalık etmeninin misel gelişimini güçlü düzeyde engellediği görülmüştür (Çizelge 4.2).

Yapılan ikili kültür testleri sonucunda *G. citri-aurantii*’nin misel gelişimini en yüksek düzeyde engelleyen izolatlar, sırasıyla %77.2 ile *Bacillus vallismortis* (YGL73ep), %76.6 ile *Bacillus cereus* (YGK25en), %73.3 ile *Pseudomonas chlororaphis*

(YGM82ep) olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.2, Şekil 4.1). Misel gelişimini engellemede yüksek düzeyde etkinlik gösteren izolatlar arasında olduğu kadar aynı türe ait izolatların da misel gelişimini engellemesi arasında istatistiksel olarak önemli düzeylerde farklılıklar görülmüştür.

Test edilen bakteri izolatlarından *Siccibacter colletis* YGP67ep, *Bacillus megaterium* YGL68ep, *Bacillus megaterium* YGM12en, *Cronobacter sakazakii* YGKL12ep, *Acinetobacter lwoffii* YGS37en, *Acinetobacter lwoffii* YGL60en, *Bacillus megaterium* YGM5ep, *Bacillus subtilis* YGS19ep, *Curtobacterium flaccumfaciens* YGS25en, *Kosakonia cowanii* YGKL17en, *Raoultella ornithinolytica* YGP64en ve *Staphylococcus succinus* YGL55ep, hastalık etmenin misel gelişimini %0-7.7 oranında engellemiş olup, yapılan istatistik analizlerde bu izolatlar kontrol grubu ile aynı istatistik grubunda yer almıştır.

Çizelge 4.2. Farklı turuncgil türlerinde elde edilen epifit endofit ve antagonist bakteri izolatların in vitro ikili kültür testlerinde *G. citri-aurantii* 'nin misel gelişimini engelleme potansiyelleri

Bakteri İzolatları	Antagonistik Etki^a	
	MG (mm)	MGE (%)
<i>Bacillus vallismortis</i> YGL73ep	13.67 ^a	77.22
<i>Bacillus cereus</i> YGK25en	14.00 ^{ab}	76.67
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> YGM82ep	16.00 ^{ac}	73.33
<i>Bacillus cereus</i> YGK28ep	17.33 ^{bd}	71.11
<i>Bacillus cereus</i> YGM3ep	19.33 ^{ce}	67.78
<i>Bacillus cereus</i> YGS13ep	20.00 ^{df}	66.67
<i>Bacillus cereus</i> YGK31en	22.00 ^{eg}	63.33
<i>Bacillus thuringiensis</i> YGT22en	22.00 ^{eg}	63.33
<i>Bacillus cereus</i> YGP6en	23.00 ^{fh}	61.67
<i>Rahnella aquatilis</i> YGP63ep	23.00 ^{fh}	61.67
<i>Bacillus cereus</i> YGKL16ep	23.33 ^{fh}	61.11
<i>Bacillus cereus</i> YGP1en	23.33 ^{fh}	61.11
<i>Bacillus mojavensis</i> YGM15en	23.33 ^{fh}	61.11
<i>Burkholderia cepacia</i> YGM75ep	23.33 ^{fh}	61.11
<i>Bacillus mojavensis</i> YGL69ep	24.67 ^{gh}	58.89

Çizelge 4.2. (Devam) Farklı turuncgil türlerinde elde edilen epifit endofit ve antagonist bakteri izolatların in vitro ikili kültür testlerinde *G. citri-aurantii* 'nin misel gelişimini engelleme potansiyelleri

Bakteri İzolatları	Antagonistik Etki^a	
	MG (mm)	MGE (%)
<i>Bacillus simplex</i> YGS12ep	26.00 ^{hi}	56.67
<i>Enterobacter xiangfangensis</i> YGM80ep	26.33 ^{hi}	56.11
<i>Rhizobium radiobacter</i> YGM77ep	26.33 ^{hi}	56.11
<i>Bacillus cereus</i> YGM9en	29.00 ^{ji}	51.67
<i>Herbaspirillum aquaticum</i> YGM78ep	29.33 ^{ik}	51.11
<i>Bacillus endophyticus</i> YGL74en	31.33 ^{jl}	47.78
<i>Klebsiella oxycota</i> YGP62en	31.67 ^{jl}	47.22
<i>Bacillus subtilis</i> YGS5en	32.67 ^{km}	45.56
<i>Lysinibacillus sphaericus</i> YGM10en	32.67 ^{km}	45.56
<i>Bacillus safaensis</i> YGM83ep	33.00 ^{lm}	45.00
<i>Lysinibacillus sphaericus</i> YGM4ep	33.00 ^{lm}	45.00
<i>Lysinibacillus sphaericus</i> YGS35ep	34.33 ^{ln}	42.78
<i>Lysinibacillus sphaericus</i> YGK24en	36.00 ^{mo}	40.00
<i>Lysinibacillus sphaericus</i> YGKL15en	37.00 ^{no}	38.33
<i>Kosakonia cowanii</i> YGP7en	38.33 ^o	36.11
<i>Lysinibacillus sphaericus</i> YGP4en	38.33 ^o	36.11
<i>Pantoea agglomerans</i> YGM81ep	39.33 ^o	34.44
<i>Lysinibacillus sphaericus</i> YGP3en	44.67 ^p	25.56
<i>Bacillus megaterium</i> YGT18ep	48.67 ^r	18.89
<i>Pseudomonas koreensis</i> YGL72ep	48.67 ^r	18.89
<i>Siccibacter colletis</i> YGP67ep	55.33 ^s	7.78
<i>Bacillus megaterium</i> YGL68ep	56.67 st	5.56
<i>Bacillus megaterium</i> YGM12en	56.67 st	5.56
<i>Cronobacter sakazakii</i> YGKL12ep	57.00 st	5.00
<i>Acinetobacter lwoffii</i> YGS37en	60.00 st	0.00
<i>Acinetobacter lwoffii</i> YGL60en	60.00 st	0.00
<i>Bacillus megaterium</i> YGM5ep	60.00 st	0.00
<i>Bacillus subtilis</i> YGS19ep	60.00 st	0.00
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> YGS25en	60.00 st	0.00
<i>Kosakonia cowanii</i> YGKL17en	60.00 st	0.00
<i>Raoultella ornithinolytica</i> YGP64en	60.00 st	0.00
<i>Staphylococcus succinus</i> YGL55ep	60.00 st	0.00
<i>G. citri-aurantii</i> (Kontrol)	60.00 st	0.00

MG: Misel Gelişimi; **MGE:** Misel Gelişiminin Engellenme oranı (%)

^a Sütun içerisinde yer alan ortalama değerlerin yanındaki aynı küçük harfler izolatlar arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığını gösterir (Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi, P<0.05)



Şekil 4.1. Farklı türlere ait endofit ve epifit bakteri izolatlarının ikili kültür testlemelerinde fungal etmen *G. citri-aurantii*'nin misel gelişiminin engellenmesi üzerine olan antagonistik etkinlikleri

4.2.2. Endofit ve Epifit Bakteri İzolatlarının *C. gloeosporioides*'in Misel Gelişiminin Engellenmesi üzerine *in vitro* Antagonistik Etkinliği

Çalışmalarda kullanılan 48 bakteri izolatının ikili kültür testlemelerinde *C. gloeosporioides*'in misel gelişimini engelleme oranları dikkate alındığında; 17 izolat misel gelişimini **güçlü düzeyde**, 21 izolat **orta düzeyde**, geri kalan 10 izolat ise misel gelişimini **zayıf düzeyde** engellemiştir (Çizelge 4.3).

C. gloeosporioides 'in misel gelişimine güçlü düzeyde antagonistik etki gösteren 9 izolattan 7 tanesinin Gram pozitif *Bacillus* spp. ait olduğu görülmüştür. Hastalık etmenin misel gelişimini en yüksek düzeyde engelleyen izolatlar sırasıyla %72.7 ile *Bacillus thuringiensis* YGT22en, %71.1 ile *Bacillus vallismortis* YGL73ep ve *Bacillus cereus* YGK25en, %65.56 engelleme oranı ile *Pseudomonas chlororaphis* YGM82ep olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.3, Şekil 4.2).

Curvobacterium flaccumfaciens YGS25en, *Acinetobacter lwoffii* YGL60en, *Cronobacter sakazakii* YGKL12ep, *Kosakonia cowanii* YGKL17en ve *Raoultella ornithinolytica* YGP64en izolatları ise test edildikleri fungal etmenin misel gelişimini %0-5.56 gibi en düşük oranda engellemek suretiyle kontrol uygulaması ile aynı istatistik grupta yer alan izolatlar olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.3).



Şekil 4.2. Farklı türlere ait endofit ve epifit bakteri izolatlarının ikili kültür testlemelerinde fungal etmen *C. gloeosporioides*'in misel gelişiminin engellenmesi üzerine olan antagonistik etkinlikleri

Çizelge 4.3. Farklı turuncgil türlerinde elde edilen epifit endofit ve antagonist bakteri izolatların *in vitro* ikili kültür testlerinde *C. gloeosporioides*'in misel gelişimini engelleme potansiyelleri

Bakteri İzolatları	Antagonistik Etki^a	
	MG (mm)	MGE (%)
<i>Bacillus thuringiensis</i> YGT22en	16.33 ^a	72.78
<i>Bacillus vallismortis</i> YGL73ep	17.33 ^{ab}	71.11
<i>Bacillus cereus</i> YGK25en	17.33 ^{ab}	71.11
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> YGM82ep	20.67 ^{bc}	65.56
<i>Bacillus cereus</i> YGP6en	21.00 ^{bd}	65.00
<i>Bacillus simplex</i> YGS12ep	22.00 ^{ce}	63.33
<i>Rahnella aquatilis</i> YGP63ep	22.33 ^{ce}	62.78
<i>Bacillus safensis</i> YGM83ep	22.33 ^{ce}	62.78
<i>Bacillus cereus</i> YGS13ep	24.00 ^{cf}	60.00
<i>Bacillus cereus</i> YGM3ep	25.33 ^{dg}	57.78
<i>Bacillus cereus</i> YGP1en	25.33 ^{dg}	57.78
<i>Bacillus cereus</i> YGKL16ep	26.00 ^{eg}	57.22
<i>Bacillus cereus</i> YGM9en	26.33 ^{eg}	56.67
<i>Bacillus mojavensis</i> YGM15en	25.67 ^{eg}	56.11
<i>Bacillus cereus</i> YGK28ep	26.33 ^{eg}	56.11
<i>Bacillus subtilis</i> YGS5en	27.33 ^{fh}	54.44
<i>Bacillus subtilis</i> YGS19ep	28.67 ^{gi}	52.22
<i>Bacillus mojavensis</i> YGL69ep	30.67 ^{hj}	48.89
<i>Bacillus cereus</i> YGK31en	30.67 ^{hj}	48.89
<i>Herbaspirillum aquaticum</i> YGM78ep	31.00 ^{hk}	48.33
<i>Burkholderia cepacia</i> YGM75ep	33.33 ^{jn}	47.78
<i>Enterobacter xiangfangensis</i> YGM80ep	32.33 ^{im}	46.11
<i>Rhizobium radiobacter</i> YGM77ep	31.33 ^{hl}	44.44
<i>Bacillus endophyticus</i> YGL74en	33.33 ^{jn}	44.44
<i>Lysinibacillus sphaericus</i> YGS35ep	34.00 ^{jo}	43.33
<i>Bacillus megaterium</i> YGL68ep	35.33 ^{ko}	43.33

Çizelge 4.3. (Devam) Farklı turuncğil türlerinde elde edilen epifit endofit ve antagonist bakteri izolatların in vitro ikili kültür testlerinde *C. gloeosporioides*'in misel gelişimini engelleme potansiyelleri

Bakteri İzolatları	Antagonistik Etki^a	
	MG (mm)	MGE (%)
<i>Lysinibacillus sphaericus</i> YGK24en	34.00 ^{jo}	41.67
<i>Lysinibacillus sphaericus</i> YGM4ep	35.00 ^{jo}	41.11
<i>Pseudomonas koreensis</i> YGL72ep	35.33 ^{ko}	41.11
<i>Acinetobacter johnsonii</i> YGM76en	35.67 ^{lo}	40.56
<i>Lysinibacillus sphaericus</i> YGKL15en	37.67 ^{no}	38.89
<i>Lysinibacillus sphaericus</i> YGM10en	36.67 ^{mo}	37.22
<i>Pantoea agglomerans</i> YGM81ep	37.67 ^{no}	37.22
<i>Bacillus megaterium</i> YGT18ep	38.00 ^o	36.67
<i>Siccibacter colletis</i> YGP67ep	42.67 ^p	28.89
<i>Acinetobacter lwoffii</i> YGS37en	43.67 ^{pr}	27.78
<i>Bacillus megaterium</i> YGM5ep	43.33 ^{pr}	27.22
<i>Klebsiella oxycota</i> YGP62en	45.00 ^{pr}	25.00
<i>Lysinibacillus sphaericus</i> YGP3en	47.33 ^{rs}	21.11
<i>Bacillus megaterium</i> YGM12en	49.67 st	17.22
<i>Lysinibacillus sphaericus</i> YGP4en	50.00 st	16.67
<i>Kosakonia cowanii</i> YGP7en	53.67 ^{tu}	13.89
<i>Staphylococcus succinus</i> YGL55ep	51.67 ^t	10.56
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> YGS25en	56.67 ^{uv}	5.56
<i>Acinetobacter lwoffii</i> YGL60en	59.33 ^v	1.11
<i>Cronobacter sakazakii</i> YGKL12ep	60.00 ^v	0.00
<i>Kosakonia cowanii</i> YGKL17en	60.00 ^v	0.00
<i>Raoultella ornithinolytica</i> YGP64en	60.00 ^v	0.00
<i>C. gloeosporioides</i> (Kontrol)	60.00 ^v	0.00

MG: Misel Gelişimi; **MGE:** Misel Gelişiminin Engellenme oranı (%)

^a Sütun içerisinde yer alan ortalama değerlerin yanındaki aynı küçük harfler izolatlar arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığını gösterir (Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi, P<0.05)

4.2.3. Endofit ve Epifit Bakteri İzolatlarının *F. solani* Misel Gelişiminin Engellenmesi üzerine in vitro Antagonistik Etkinliği

F. solani'nin misel gelişimini engelleme etkinliklerinin belirlenmesinde kullanılan 48 bakteri izolatı arasında; 18 izolatın (%37.5) misel gelişimini **zayıf düzeyde**, 13 izolatın (%27.1) misel gelişimini **orta düzeyde**, geri kalan 17 izolatın (%35.4) ise misel gelişimini **güçlü düzeyde** engellediği belirlenmiştir (Çizelge 4.4).

Diğer fungal hastalık türlerinde olduğu gibi, hastalık etmeninin misel gelişimini yüksek düzeyde engelleyen 12 izolattan 9 izolatın Gram pozitif *Bacillus* spp. ait izolatlardan oluştuğu görülmüştür. Test edilen izolatlar arasında en yüksek antagonistik etkinlik gösteren izolat %71.1 engelleme oranı ile *Bacillus subtilis* YGS5en olduğu

belirlenirken, bu izolatu %70 engelleme oranı ile *Bacillus cereus* YGK25en ve %66.1 engelleme oranı ile *Pseudomonas chlororaphis* YGM82ep izolatları takip etmiştir. (Şekil 4.3, Çizelge 4.4).

Hastalık etmeninin misel gelişimini %0-7.2 gibi en düşük oranda engellemek suretiyle kontrol uygulamasıyla aynı istatistik grubunda yer alan 14 izolatın ise *Bacillus safensis* YGM83ep, *Staphylococcus succinus* YGL55ep, *Curtobacterium flaccumfaciens* YGS25en, *Lysinibacillus sphaericus* YGP4en, *Acinetobacter johnsonii* YGM76en, *Bacillus endophyticus* YGL74en, *Bacillus megaterium* YGM12en, *Bacillus megaterium* YGL68ep, *Raoultella ornithinolytica* YGP64en, *Acinetobacter lwoffii* YGS37en, *Herbaspirillum aquaticum* YGM78ep ve *Lysinibacillus sphaericus* YGS35ep olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.4).



Şekil 4.3. Farklı türlere ait endofit ve epifit bakteri izolatlarının ikili kültür testlemelerinde fungal etmen *F. solani* 'nin misel gelişiminin engellenmesi üzerine olan antagonistik etkinlikleri

Çizelge 4.4. Farklı turuncgil türlerinde elde edilen epifit endofit ve antagonist bakteri izolatların *in vitro* ikili kültür testlerinde *F. solani*'nin misel gelişimini engelleme potansiyelleri

İzolat	Antagonistik Etki ^a	
	MG (mm)	MGE (%)
<i>Bacillus subtilis</i> YGS5en	17.33 ^a	71.11
<i>Bacillus cereus</i> YGK25en	18.00 ^a	70.00
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> YGM82ep	20.33 ^{ab}	66.11
<i>Bacillus cereus</i> YGM9en	21.00 ^{ac}	65.00
<i>Bacillus cereus</i> YGM3ep	21.33 ^{ac}	64.44
<i>Bacillus subtilis</i> YGS19ep	22.33 ^{ad}	62.78
<i>Bacillus mojavensis</i> YGL69ep	24.00 ^{be}	60.00
<i>Bacillus cereus</i> YGKL16ep	25.33 ^{be}	57.78
<i>Kosakonia cowanii</i> YGP7en	25.33 ^{be}	57.78
<i>Rahnella aquatilis</i> YGP63ep	25.33 ^{be}	57.78
<i>Bacillus cereus</i> YGP6en	26.00 ^{cf}	56.67
<i>Bacillus vallismortis</i> YGL73ep	26.00 ^{cf}	56.67
<i>Bacillus cereus</i> YGK28ep	27.00 ^{dg}	55.00
<i>Siccibacter colletis</i> YGP67ep	27.67 ^{eh}	53.89
<i>Bacillus thuringiensis</i> YGT22en	28.33 ^{ei}	52.78
<i>Lysinibacillus sphaericus</i> YGP3en	28.67 ^{ei}	52.22
<i>Bacillus mojavensis</i> YGM15en	29.33 ^{ej}	51.11
<i>Pantoea agglomerans</i> YGM81ep	31.00 ^{fk}	48.33
<i>Bacillus cereus</i> YGP1en	31.33 ^{gk}	47.78
<i>Bacillus cereus</i> YGK31en	31.33 ^{gk}	47.78
<i>Enterobacter xiangfangensis</i> YGM80ep	32.00 ^{gk}	46.67
<i>Klebsiella oxycota</i> YGP62en	32.67 ^{hk}	45.56
<i>Lysinibacillus sphaericus</i> YGK24en	33.33 ^{il}	44.44
<i>Bacillus cereus</i> YGS13ep	34.00 ^{jl}	43.33
<i>Bacillus megaterium</i> YGT18ep	35.00 ^{kl}	41.67
<i>Bacillus simplex</i> YGS12ep	35.33 ^{km}	41.11
<i>Pseudomonas koreensis</i> YGL72ep	36.00 ^{kn}	40.00
<i>Lysinibacillus sphaericus</i> YGM4ep	38.33 ^{ln}	36.11
<i>Lysinibacillus sphaericus</i> YGKL15en	40.00 ^{mn}	33.33
<i>Cronobacter sakazakii</i> YGKL12ep	40.67 ⁿ	32.22
<i>Acinetobacter lwoffii</i> YGL60en	45.33 ^o	24.44
<i>Kosakonia cowanii</i> YGKL17en	49.33 ^{op}	17.78
<i>Rhizobium radiobacter</i> YGM77ep	49.33 ^{op}	17.78
<i>Bacillus megaterium</i> YGM5ep	51.67 ^{pr}	13.89
<i>Burkholderia cepacia</i> YGM75ep	52.00 ^{pr}	13.33
<i>Lysinibacillus sphaericus</i> YGM10en	53.00 ^{ps}	11.67
<i>Bacillus safensis</i> YGM83ep	55.67 ^{rt}	7.22
<i>Staphylococcus succinus</i> YGL55ep	57.33 st	4.44
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> YGS25en	57.67 st	3.89
<i>Lysinibacillus sphaericus</i> YGP4en	57.67 st	3.89
<i>Acinetobacter johnsonii</i> YGM76en	58.33 ^t	2.78
<i>Bacillus endophyticus</i> YGL74en	59.00 ^t	1.67
<i>Bacillus megaterium</i> YGM12en	59.00 ^t	1.67
<i>Bacillus megaterium</i> YGL68ep	59.33 ^t	1.11

Çizelge 4.4. (Devam) Farklı turunçgil türlerinde elde edilen epifit endofit ve antagonist bakteri izolatların in vitro ikili kültür testlerinde *F. solani*'nin misel gelişimini engelleme potansiyelleri

İzolat	Antagonistik Etki ^a	
	MG (mm)	MGE (%)
<i>Raoultella ornithinolytica</i> YGP64en	59.33 ^t	1.11
<i>Acinetobacter lwoffii</i> YGS37en	59.67 ^t	0.56
<i>Herbaspirillum aquaticum</i> YGM78ep	59.67 ^t	0.56
<i>Lysinibacillus sphaericus</i> YGS35ep	60.00 ^t	0.00
<i>F. solani</i> (Kontrol)	60.00 ^t	0.00

MG: Misel Gelişimi; **MGE:** Misel Gelişiminin Engellenme oranı (%)

^a Sütun içerisinde yer alan ortalama değerlerin yanındaki aynı küçük harfler izolatlar arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığını gösterir (Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi, P<0.05)

Farklı turunçgil türlerinden izole edilen 48 farklı bakteri izolatının 3 farklı fungal etmenin misel gelişimini engellemelerindeki antagonistik etkinlikleri Çizelge 4.5'de birlikte sunulmuştur. Yapılan değerlendirmede; 9 izolatın antagonistik etkinliklerinin 3 farklı hastalık etmeni türüne göre aynı istatistik grubunda yer almak suretiyle herhangi bir farklılık göstermediği belirlenmiştir. Test edilen 14 izolat ise (*Lysinibacillus sphaericus* YGP4en, *Kosakonia cowanii* YGP7en, *Cronobacter sakazakii* YGKL12ep, *Bacillus thuringiensis* YGT22en, *Bacillus subtilis* YGS19ep, *Bacillus subtilis* YGS5en, *Siccibacter colletis* YGP67ep, *Bacillus megaterium* YGL68ep, *Burkholderia cepacia* YGM75ep, *Acinetobacter johnsonii* YGM76en, *Bacillus safensis* YGM83ep, *Bacillus megaterium* YGM5ep, *Bacillus mojavensis* YGM15en, *Lysinibacillus sphaericus* YGM10en) antagonist etkinlik yönünden 3 türe karşı istatistiksel olarak önemli düzeylerde farklılıklar göstermiştir.

Antagonistik etkinlik yönünden değerlendirildiğinde; 11 izolatın (*Bacillus cereus* YGP6en, *Bacillus cereus* YGKL16ep, *Bacillus thuringiensis* YGT22en, *Bacillus cereus* YGK25en, *Bacillus cereus* YGK28ep, *Rahnella aquatilis* YGP63ep, *Bacillus vallismortis* YGL73ep, *Pseudomonas chlororaphis* YGM82ep, *Bacillus cereus* YGM9en, *Bacillus mojavensis* YGM15en ve *Bacillus cereus* YGM3ep) test edildikleri 3 farklı hastalık etmenine karşı yüksek düzeyde (>%50 üzerinde engelleme ile) antagonistik etkinlik gösterdiği belirlenmiştir (Çizelge 4.5).

G. citri-aurantii için test edilen 48 bakteri izolatının hastalık etmenin misel gelişimini %0.0-76.6 oranları arasında engellediği, antagonistik etki gösteren izolatlar için hesaplanan ortalama engelleme oranının %47.6 düzeyinde olduğu belirlenmiştir.

Aynı şekilde *G. gloeosporioides* için engelleme oranının %0.0-72.7 aralığında olduğu, antagonistik etki gösteren izolatlar için hesaplanan ortalama engelleme oranının %44.7 düzeyinde olduğu, *F. solani* için ise engelleme oranlarının %0.0-71.1 oranları arasında olup ortalama engelleme oranının %41.9 düzeyinde olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.5. Farklı turuncgil türlerinde elde edilen epifit endofit ve antagonist bakteri izolatların *in vitro* ikili kültür testlerinde 3 farklı fungal etmene karşı antagonistik etkinliklerinin karşılaştırılması

<i>Endofit/Epifit Bakteri İzolat</i>	Antagonistik Etki^a		
	<i>G. citri-aurantii</i>	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>F. solani</i>
Kontrol	60.00 ^x	60.00 ^y	60.00 ^z
<i>Acinetobacter johnsonii</i> YGM76en	25.00 ^{ghA}	35.67 ^{l-oB}	58.33 ^{tC}
<i>Acinetobacter lwoffii</i> YGS37en	60.00 ^{stB}	43.67 ^{prA}	45.33 ^{oA}
<i>Acinetobacter lwoffii</i> YGL60en	60.00 ^{stA}	59.33 ^{va}	59.67 ^{tA}
<i>Bacillus cereus</i> YGK25en	14.00 ^{abA}	17.33 ^{abA}	18.00 ^{aA}
<i>Bacillus cereus</i> YGK28ep	17.33 ^{b-dA}	26.33 ^{e-gB}	27.00 ^{d-gB}
<i>Bacillus cereus</i> YGK31en	22.00 ^{e-gA}	30.67 ^{h-jB}	31.33 ^{g-kB}
<i>Bacillus cereus</i> YGKL16ep	23.33 ^{f-hA}	26.00 ^{e-gB}	25.33 ^{b-eAB}
<i>Bacillus cereus</i> YGM3ep	19.33 ^{c-eA}	25.33 ^{d-gB}	21.33 ^{a-cA}
<i>Bacillus cereus</i> YGM9en	29.00 ^{ijA}	26.33 ^{e-gA}	21.00 ^{a-cA}
<i>Bacillus cereus</i> YGP1en	23.33 ^{f-hA}	25.33 ^{d-gA}	31.33 ^{g-kA}
<i>Bacillus cereus</i> YGP6en	23.00 ^{f-hA}	21.00 ^{b-dA}	26.00 ^{c-fA}
<i>Bacillus cereus</i> YGS13ep	20.00 ^{d-fA}	24.00 ^{c-fA}	34.00 ^{j-lB}
<i>Bacillus endophyticus</i> YGL74en	31.33 ^{j-lA}	33.33 ^{j-nA}	59.00 ^{tB}
<i>Bacillus megaterium</i> YGL68ep	56.67 ^{stB}	35.33 ^{koA}	59.33 ^{tC}
<i>Bacillus megaterium</i> YGM12en	56.67 ^{stA}	49.67 ^{stA}	59.00 ^{tA}
<i>Bacillus megaterium</i> YGM5ep	60.00 ^{stC}	43.33 ^{prA}	51.67 ^{prB}
<i>Bacillus megaterium</i> YGT18ep	48.67 ^{rb}	38.00 ^{oA}	35.00 ^{klA}
<i>Bacillus mojavensis</i> YGL69ep	24.67 ^{ghA}	30.67 ^{h-jB}	24.00 ^{b-eA}
<i>Bacillus mojavensis</i> YGM15en	23.33 ^{f-hA}	25.67 ^{e-gB}	29.33 ^{e-jC}
<i>Bacillus safaensis</i> YGM83ep	33.00 ^{lmB}	22.33 ^{c-eA}	55.67 ^{r-tC}
<i>Bacillus simplex</i> YGS12ep	26.00 ^{hiA}	22.00 ^{c-eA}	35.33 ^{k-mB}
<i>Bacillus subtilis</i> YGS19ep	60.00 ^{stC}	28.67 ^{giB}	22.33 ^{adA}
<i>Bacillus subtilis</i> YGS5en	32.67 ^{k-mC}	27.33 ^{f-hB}	17.33 ^{aA}
<i>Bacillus thuringiensis</i> YGT22en	22.00 ^{e-gB}	16.33 ^{aA}	28.33 ^{e-iC}
<i>Bacillus vallismortis</i> YGL73ep	13.67 ^{aA}	17.33 ^{abA}	26.00 ^{c-fB}
<i>Burkholderia cepacia</i> YGM75ep	23.33 ^{f-hA}	33.33 ^{j-nB}	52.00 ^{prC}
<i>Cronobacter sakazakii</i> YGKL12ep	57.00 ^{stB}	60.00 ^{vc}	40.67 ^{na}
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> YGS25en	60.00 ^{stB}	56.67 ^{uvA}	57.67 ^{stA}
<i>Enterobacter xiangfangensis</i> YGM80ep	26.33 ^{hiA}	32.33 ^{i-mB}	32.00 ^{g-kB}
<i>Herbaspirillum aquaticum</i> YGM78ep	29.33 ^{j-ka}	31.00 ^{h-ka}	59.67 ^{tB}
<i>Klebsiella oxycota</i> YGP62en	31.67 ^{j-la}	45.00 ^{prB}	32.67 ^{h-ka}
<i>Kosakonia cowanii</i> YGKL17en	60.00 ^{stB}	60.00 ^{vb}	49.33 ^{opA}

Çizelge 4.5 (Devam) Farklı turuncgil türlerinde elde edilen epifit endofit ve antagonist bakteri izolatların *in vitro* ikili kültür testlerinde 3 farklı fungal etmene karşı antagonistik etkinliklerinin karşılaştırılması

<i>Endofit/Epifit Bakteri İzolat</i>	Antagonistik Etki^a		
	<i>G. citri-aurantii</i>	<i>C. gloesporioides</i>	<i>F. solani</i>
<i>Kosakonia cowanii</i> YGP7en	38.33 ^{oB}	53.67 ^{tuC}	25.33 ^{b-eA}
<i>Lysinibacillus sphaericus</i> YGK24en	36.00 ^{m-oA}	34.00 ^{j-oA}	33.33 ^{i-lA}
<i>Lysinibacillus sphaericus</i> YGKL15en	37.00 ^{noA}	37.67 ^{noA}	40.00 ^{mnA}
<i>Lysinibacillus sphaericus</i> YGM10en	32.67 ^{k-mA}	36.67 ^{m-oB}	53.00 ^{p-sC}
<i>Lysinibacillus sphaericus</i> YGM4ep	33.00 ^{lmA}	35.00 ^{j-oA}	38.33 ^{l-nB}
<i>Lysinibacillus sphaericus</i> YGP3en	44.67 ^{pB}	47.33 ^{rsB}	28.67 ^{e-iA}
<i>Lysinibacillus sphaericus</i> YGP4en	38.33 ^{oA}	50.00 ^{stB}	57.67 ^{stC}
<i>Lysinibacillus sphaericus</i> YGS35ep	34.33 ^{l-nA}	34.00 ^{j-oA}	60.00 ^{tB}
<i>Pantoea agglomerans</i> YGM81ep	39.33 ^{oB}	37.67 ^{noB}	31.00 ^{f-kA}
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> YGM82ep	16.00 ^{a-cA}	20.67 ^{bcB}	20.33 ^{abB}
<i>Pseudomonas koreensis</i> YGL72ep	48.67 ^{rB}	35.33 ^{k-oA}	36.00 ^{k-nA}
<i>Rahnella aquatilis</i> YGP63ep	23.00 ^{f-hAB}	22.33 ^{c-eA}	25.33 ^{b-eB}
<i>Raoultella ornithinolytica</i> YGP64en	60.00 ^{stA}	60.00 ^{va}	59.33 ^{tA}
<i>Rhizobium radiobacter</i> YGM77ep	26.33 ^{hiA}	31.33 ^{h-lA}	49.33 ^{opB}
<i>Siccibacter colletis</i> YGP67ep	55.33 ^{sC}	42.67 ^{pB}	27.67 ^{e-hA}
<i>Staphylococcus succinus</i> YGL55ep	60.00 ^{stB}	51.67 ^{tA}	57.33 ^{stB}

^a Aynı sütun içerisinde yer alan ortalama değerlerin yanındaki benzer küçük harfler ile aynı satır içerisinde yer alan ortalama değerlerin yanındaki benzer büyük harfler izolatlar arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığını gösterir (Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi, $P < 0.05$) Yeşil renkle işaretli antagonist izolatlar fungus türlerine bağlı olarak etkinlikte istatistiksel olarak önemli farklılık gösterirken, sarı ile işaretli izolatların etkinlikleri türlere bağlı farklılık göstermemiştir.

Bu çalışmada kullanılan 3 fungal etmene karşı $\geq 50\%$ antagonistik etkinlik gösteren 11 endofit ve epifit bakteri izolatından *Pseudomonas chlororaphis* YGM82ep dışında kalan bakteri izolatların tamamının *Bacillus* spp. ait izolatlar olduğu belirlenmiştir. İzolatlar arasında *G. citri-aurantii* etmenine karşı $> 50\%$ antagonistik etkinlik gösteren toplam 21 izolatından 14 tanesi, *C. gloesporioides*'e karşı toplam 17 izolatından 15 tanesinin, *F. solani*'ye karşı ise 17 izolatından 13 tanesinin benzer şekilde *Bacillus* spp. ait izolatlar olduğu tespit edilmiştir. Fungal etmenlere karşı en yüksek antagonistik etki gösteren izolatlar tür düzeyinde incelendiğinde, *G. citri-aurantii*'ye karşı *Bacillus vallismortis* YGL73ep ve *Bacillus cereus* YGK25en; *C. gloesporioides*'e karşı *Bacillus thuringiensis* YGT22en, *Bacillus vallismortis* YGL73ep ve *Bacillus cereus* YGK25en; *F. solani*'ye karşı ise *Bacillus subtilis* YGS5en, *Bacillus cereus* YGK25en, *Pseudomonas chlororaphis* YGM82ep, *Bacillus cereus* YGM9en, *Bacillus cereus* YGM3ep ve *Bacillus*

subtilis YGS19ep izolatları en yüksek etkinlik gösteren türler olmuştur. Etkili olarak belirlenen *Bacillus vallismortis* YGL73ep ve *Bacillus cereus* YGK25en; *Bacillus thuringiensis* YGT22en, *Bacillus subtilis* YGS5en, *Pseudomonas chlororaphis* YGM82ep, *Bacillus cereus* YGM9en, *Bacillus cereus* YGM3ep ve *Bacillus subtilis* YGS19ep izolatları Hatay ilinin Erzin ilçesindeki farklı turuncgil bahçelerinde yer alan sağlıklı turuncgil türlerinden izole edilmiştir.

Biyolojik mücadele çalışmalarında sıklıkla üzerinde çalışılan türler arasında yer alan türlerden olan *Bacillus* spp.'ye ait izolatların kimyasal yapıları birbirinden farklı >70'den fazla antimikrobiyal etkiye sahip antimikrobiyal madde üretme potansiyelinde olduğu, bu bileşiklerin farklı konukçu bitkilerde tohum, toprak, yaprak ve depo kökenli fungal ve bakteriyel hastalık etmenlerine karşı biyolojik mücadele etmeni olarak etkinliği çalışılan türler olduğu bilinmektedir. Çalışmalarımızda da etkinliği yüksek olarak belirlenen *Bacillus* spp. arasında özellikle *Bacillus cereus*, *B. mojavensis*, *B. vallismortis*, *B. subtilis*, ve *B. thuringiensis* gibi epifit ve endofit kökenli türlerinin çok farklı kimyasal yapıları antimikrobiyal bileşikler üretmeleri nedeni ile biyolojik mücadele çalışmalarında üzerlerinde en fazla çalışılan bakteriyel türler olduğu bildirilmiştir (Tariq ve ark., 2020). *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. pumilus*, *B. licheniformis*, *B. cereus* ve *B. thuringiensis* gibi türler tarafından sentezlenen iturin, surfactin, lichenysin, fengycin veya yakın türevleri en fazla rapor edilen antimikrobiyal etkili bileşenlerdir (An-Dong ve ark., 2015; Kim ve ark., 2009; Huszcza ve Burczyk, 2006).

Agrobacterium, *Bacillus* ve *Pseudomonas* gibi önemli bakteri cinslerine ait biyolojik mücadele etmeni izolatlardan üretilen biyopreparatlar, günümüz biyofungusit pazarında oldukça önemli bir yere sahiptir (Fravel, 2005). Bu pazarın tartışılmaz lideri *Bacillus* spp.'ye ait biyopreparatlar olup, en fazla payı (>%70) özellikle lepidoptera larvalarına karşı insektisit olarak kullanılan *B. thuringiensis* kökenli biyopreparatlar almaktadır. Diğer yandan, tüketicilerin son yıllarda bilinçlenerek organik/sürdürülebilir tarıma olan ilgilerinden dolayı, *Bacillus subtilis*, *B. subtilis* var. *amyloliquefaciens*, *B. licheniformis* ve *B. pumilus* türlerine ait izolatlardan üretilen ve farklı fungal ve bakteriyel hastalıklara karşı birçok ülkede yaygın olarak ruhsatlı olarak kullanılan biyopreparatların biyopestisit pazarındaki konumu son yıllarda ciddi şekilde yükselmektedir. Farklı *Bacillus* spp. ait endofit ve epifit bakteri izolatlarının biyolojik mücadele çalışmalarında sıkça yer almasının, biyopestisit pazarında yaygın yer bulmasının altında yatan ana

etkenlerin başında; (i) bu türlere ait izolatların farklı moleküler yapıya sahip antimikrobiyal bileşikler üretmeleri, (ii) üretilen farklı yapıdaki bileşiklere karşı hastalık etmenlerin kolayca dayanıklılık geliştirememesi, (iii) bu türe ait izolatların olumsuz çevre koşullarına karşı dayanıklı spor olarak adlandırılan “endospor” oluşturmaları gelmektedir. Çalışmalarımızda *Bacillus* spp. dışında hastalık etmenlerine karşı yüksek düzeyde antagonistik etkinlik gösteren bir diğer bakteri izolatı *Pseudomonas chlororaphis* olarak tanımlanmıştır. Sistemik dayanıklılığı teşvik etmelerinin yanısıra aynı zamanda hastalıklarına karşı etkili bir biyolojik mücadele etmeni olarak bilinen *Pseudomonas chlororaphis*, aralarında *Pythium aphanidermatum* gibi birçok farklı toprak kökenli hastalık etmenlerine karşı 2,4 diacetylphloroglucinol (DAPG), hydrogen cyanide (HCN), pyrrolnitrin, pyoluteorin ve phenazines grubu antimikrobiyal metabolitler üretir (Raio ve Puopolo, 2021).

Endofit ve epifit bakteri izolatlarından *Bacillus cereus* YGK25en, *Pseudomonas chlororaphis* YGM82ep, *Bacillus cereus* YGM9en, *Bacillus cereus* YGM3ep, *Rahnella aquatilis* YGP63ep, *Bacillus cereus* YGKL16ep, *Bacillus vallismortis* YGL73ep, *Bacillus cereus* YGP6en, *Bacillus cereus* YGK28ep, *Bacillus thuringiensis* YGT22en ve *Bacillus mojavensis* YGM15en ‘in ikili kültür testlerinde 3 hastalık etmenine karşı yüksek düzeyde ($\geq 50\%$) antagonistik etkinlik gösterdiği belirlenmiştir.

Turunçgillerde sorun *G. citri-aurantii*, *C. gloesporioides* ve *F. solani* etmenlerine karşı yapılmış çok az sayıda biyolojik mücadele çalışmalarına rastlanılmıştır. Bu etmenlerden *G. citri-aurantii* etmenine karşı genelde depo koşullarında meyve yüzeyinden elde edilen maya ve bakterilerin biyoetkinliği araştırılırken, *C. gloesporioides* ve *F. solani* etmenlerine genelde turunçgillerden ziyade diğer konukçu bitkileri üzerinde yapılmış biyolojik mücadele çalışmalarının yapıldığı görülmüştür. Riera ve ark. (2017), 6 farklı yararlı bakteri izolatı öncelikle iki bakteriyel hastalık etmenine (*Agrobacterium tumefaciens* ve *Sinorhizobium meliloti*) karşı antimikrobiyal etkinliği araştırılmış, daha sonra yapılan çalışmada izolatların antifungal etkinliği üç fungal (*Alternaria alternata*, *Colletotrichum acutatum*, *Phyllosticta citricarpa*) iki oomycet (*Phytophthora nicotianae* ve *Phytophthora palmivora*) hastalık etmenine karşı test edilmiştir. Elde edilen 6 bakteri izolatı arasından 4 izolatın (*Burkholderia territorii* A63, *Burkholderia metallica* A53, *Pseudomonas geniculata* 95 ve *Bacillus pumilus* 104) antagonistik etkinlik çalışmalarında turunçgil kök patojeni *Phytophthora nicotianae*’ya karşı yüksek düzeyde antagonistik

etkiye sahip olduğu bildirilmiştir. Bakterilerin antagonistik etkinliklerinin yanısıra, fosfor çözüme, siderefor üretimi ile demir alımı, uçucu organik bileşik üretimi, ozmo proteksiyon ve ozmotik tolerans, fitohormon üretimi, antagonizm ve besin rekabeti ile ilgili genlerin teşvik edilmesi hastalık etmeninin baskılanmasında rol oynayan olası mekanizmalar olarak belirlenmiştir.

Yakın zamanda Soylu ve ark., (2021) tarafından yapılan çalışmada sağlıklı turunçgil ağaçlarından izole edilen 24 aday bakteri izolatu arasında bitki veya insan patojeni olmayan on altı farklı bakteri izolatuının *G. citri-aurantii*'nin misel gelişiminin engellenmesi üzerine olan antagonistik potansiyeli *in vitro* koşullarda değerlendirilmiştir. Test edilen bakteriler arasında *Bacillus* spp. ait izolatların fungal etmenin misel gelişimini %59.5-78.6 oranında engellediğini gözlemlemişlerdir. En yüksek antagonistik etkinlik *B. subtilis* CM8 (%78.6) izolatu tarafından gösterilmiştir. *Acinetobacter johnsonii* CT7, *Erwinia herbicola* CM5, *Pseudomonas putida* CL2, *Pantoea agglomerans* CM14, *Acinetobacter lwoffii* CP1 ve *Stenotrophomonas maltophilia* CP3 izolatları, ikili kültür denemelerinde misel gelişimini engellemede başarısız bulunmuştur.

Gedik (2019) tarafından yapılan bir diğer çalışmada turunçgilde derim sonrası ekşi çürüklük hastalığı etmeni *G.citri-aurantii*'ye karşi 19 farklı antagonist *Bacillus* spp.'ye ait izolatların yanısıra bor ürünlerinin antifungal etkileri *in vitro* ve yarı *in vivo* koşullarında araştırılmıştır. Yapılan *in vitro* etkinlik çalışmaları sonuçlarına göre misel gelişimini engellemede %66.9 engelleme oranı ile *Bacillus cereus* (G1B:3:6), %66.1 engelleme oranı ile *B. pumilus* (G4B:0:4) en etkili antagonist bakteri izolatları olarak belirlenmiştir.

Hyder ve ark. (2020) biber bitkilerinde yıkıcı hastalığa neden olan *Phytophthora capsici*'ye karşi PGPR özellikli bakterilerin antagonistik etkinliklerini belirlemeye yönelik yaptıkları çalışmalarında, 15 izolatuın elde edildiği, bu izolatlardan 8 tanesinin ikili kültür testlerinde hastalık etmenin gelişimini oldukça yüksek düzeyde engellediği, izolatların tamamının değişen konsantrasyonlarda HCN, katalaz, siderofor ve IAA ürettiği belirlenmiştir. Yapılan moleküler tanılama çalışmalarında patojene karşi etkili olarak belirlenen bakteriyel izolatların *Pseudomonas putida*, *P. libanensis*, *P. aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *B. megaterium* ve *B. cereus* türlerine ait olduğunu bildirmişlerdir. Test edilen tüm bakteri izolatlarının *in vivo* biyoetkinlik testlerinde uygulandııkları bitkilerde hastalık çıkışı ve gelişimini %52.3-63 oranında engelledikleri gözlemlemişlerdir.

Soto ve ark. (2018) limon meyvelerinde hasat sonrası önemli hastalıklara neden olan fungal etmenlerden *Geotrichum citri-aurantii*, *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum* ve *Phyllosticta citricarpa*'ya karşı sağlıklı meyvelerin yüzeylerinden izole ettikleri faydalı bakteri, maya ve fungal izolatları *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis*, *Paenibacillus polymyxa*, *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas syringae*, *Candida membranifaciens*, *Candida utilis*, *Cryptococcus laurentii*, *Debaryomyces hansenii*, *Kloeckera apiculata*, *Metschnikowia* spp., *Pichia guilliermondii*, *Pichia membranifaciens*, *Rhodosporidium paludigenum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aureobasidium pullulans*, *Nodulisporium* spp. ve *Trichoderma* spp olarak teşhis etmişlerdir. Araştırmacılar elde ettikleri sonuçlardan yola çıkarak, bakteri, maya ve fungal antagonist izolatların *in vitro* ve *in vivo* etkinliklerine göre limon meyvelerinde hasat sonrası hastalıklara neden olan 3 fungal etmene karşı biyolojik mücadele etmeni olarak kullanılabileceğini önermişlerdir.

He ve ark. (2020) yaptıkları çalışmada, yenedünya meyvelerinde çürümelere neden olan *Fusarium oxysporum*, *Botryosphaeria* sp., *Trichoderma atroviride*, *Colletotrichum gloeosporioides*, ve *Penicillium expansum* hastalık etmenlerine karşı *Bacillus methylotrophicus* BCN2 ve *Bacillus thuringiensis* BCN10 bakteri izolatlarının uçucu bileşenlerinin antifungal etkinliklerini belirlemeyi amaçlamışlardır. Gerek bakteri kütlelerinin gerekse üretmiş oldukları uçucu bileşenlerin *in vitro* ikili kültür testlerinde misel gelişimini ve *in vivo* koşullarda meyveler üzerinde hastalık çıkışını ciddi düzeyde baskıladıklarını bildirmişlerdir. Çalışma sonuçları bakteriler tarafından üretilen uçucu bileşenlerin depo koşullarında hastalıklarla mücadelede kullanılma potansiyellerinin olduğunu göstermiştir. Liu ve ark. (2010), tarafından yapılan çalışmada, iki antagonistik maya izolatının turunçgilde *Geotrichum citri-aurantii*'nin neden olduğu hasat sonrası ekşi çürüklüğü hastalığının engellenmesi üzerine antifungal etkileri ve engellemede rol oynayan olası mekanizmaları değerlendirilmiştir. *C. laurentii* tarafından gösterilen antifungal etkinlikte rol oynayan olası mekanizmaların, besin ve alan rekabeti, dayanıklılık mekanizmalarının teşvik edilmesi ve antibiyotik bileşiklerinin salgılanmasından kaynaklandığı belirlenmiştir. Bu tür antagonistlerin kullanımı, turunçgilde hasat sonrası ekşi çürüklüğü kontrol etmek için sentetik fungisitlere önemli bir alternatif oluşturabileceğini düşündürmüştür.

Bacillus spp. arasında *B. subtilis*, *B. pumilis*, *B. amyloliquefaciens* izolatlarının turunçgil depo hastalık etmenlerinden *P. digitatum*, *P. crustosum*, *P. italicum* ve *G. citri-aurantii*'ye karşı *in vitro* ve *in vivo* antifungal etkinlik gösterdiği (Huang ve ark., 2004; Arrebola ve ark., 2010b; Hong ve ark., 2014; Chen ve ark., 2018; Tian ve ark., 2020), *B. amyloliquefaciens* ise bu hastalık etmenleri dışında, uçkurutan hastalığı etmeni *Phoma tracheiphila*'nın spor ve misel gelişiminin engellenmesi üzerine oldukça önemli biyoetkinlik gösterdiği bildirilmiştir (Kalai-Grami ve ark., 2014). Chenniappan ve ark., (2019) tarafından yapılan çalışmada, zerdeçal kök ve rizomlarından izole ettikleri bakterileri, 7 farklı rizom kök çürüklüğü hastalık etmeni olan *Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani*, *Schizophyllum commune*, *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium graminearum* ve *Fusarium solani*'ye karşı antagonistik etkinliklerini araştırmışlardır. Söz konusu fungal patojenlere karşı *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus tequilensis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* türlerine ait 16 izolatın test edilmesi sonucu değişen oranlarda antagonistik etkinlik gösterdikleri görülmüştür. Fungal hastalık etmenlerine karşı gösterilen antagonistik etkinliğin 2,4-diacetylphloroglucinol, pyrrolnitrin, pyoluteorin, bacillomycin D, fengycin, hydrogen cyanide, ve lytic enzyme, cellulase'dan kaynaklandığını bildirmişlerdir. Tagele ve ark., (2019) tarafından yapılan çalışmada, mısır bitkilerinde yanıklığa neden olan *R. solani* izolatına karşı *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* izolatının antagonistik etkinliği araştırılmıştır. *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* izolatının, *Colletotrichum dematium*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis*, *Fusarium subglutinans* ve *Stemphylium lycopersici*'ye karşı oldukça yüksek düzeyde antagonistik etkinlik gösterdiğini gözlemlemişlerdir. Antagonist bakteri izolatının fosfor çözme etkinliği dışında, birçok bitki gelişimini teşvik eden mekanizmaları kullandığını, antagonist etkinlikten ise bakteri tarafından üretilen antifungal phenazin türevleri ile Octamethylcyclotetrasiloxan (D4), dimethyl disulfide, 2-methyl-1,3-butadiene ve 1-undecene isimli uçucu bileşenlerin sorumlu olduğunu bildirmişlerdir. Bir diğer önemli biyolojik mücadele etmeni türlerden olan *B. thuringiensis* izolatının turunçgil siyah leke hastalığı etmeni *Guignardia citricarpa* *in vitro* koşullarda misel gelişimini engellemede oldukça etkili olduğu belirlenmiştir (Lucon ve ark., 2010).

Ghazy ve El-Nahrawy (2020) yapmış oldukları çalışmada mısır bitkilerinde ciddi ürün kayıplarına neden olan fungal solgunluk hastalık etmeni *Cephalosporium maydis*'e

karşı 6 farklı (*Bacillus subtilis*, *B. circulance*, *B. coagulans*, *B. licheniformis*, *Pseudomonas fluorescens* ve *P. koreensis*) antagonist bakteri izolatının ikili kültür testleri ile biyoetkinliğini, *B. subtilis* ve *P. koreensis* izolatlarının yüksek düzeylerde siderofor üretmek suretiyle antagonistik etkinlik gösterdiğini, iki izolatının karışımı ile elde edilen süspansiyonun uygulandığı bitkide katalaz (CAT), peroksidaz (POX) ve polifenol oksit (PPO) enzim aktivitelerinde ciddi artışların olduğunu bildirmişlerdir. Yang ve ark., (2012) biber bitkilerinden izole ettikleri aday antagonist bakteri izolatlarının antagonistik etkinliğini *Phytophthora capsici*'ye karşı araştırmışlardır. Elde edilen 1487 izolatı ikili kültür testleri ile taradıkları, sonuçta 232 izolatın hastalık etmenine karşı değişen oranlarda etkinlik gösterdiğinin, bu izolatlar arasında >5mm engelleme zonu oluşturmak suretiyle yüksek düzeyde etkinlik gösteren 5 izolatın siderofor, kitinaz, selüloz, ve proteaz enzim üretimlerine bakıldığını, yapılan analizler sonucunda *Bacillus cereus* (B1301), *Chryseobacterium* sp. (R98) ve *Bacillus cereus* (PX35) izolatların söz konusu mekanizmaları kullanmak suretiyle *in vivo* hastalık çıkışını ve gelişimini %83.5- 92.3 oranında engellediklerini belirlemişlerdir.

Çalışmalarımızda etkinliği düşük olarak belirlenen, aynı zamanda bitki patojeni olan *Curtobacterium flaccumfaciens* izolatıda elde edilmiştir. Söz konusu izolatın sağlıklı yetiştirilen fasulye fidelerinde yapılan patojenite testinde virülent özellikte olmadığı belirlenmiştir. Biyolojik mücadele olanaklarının araştırıldığı bir çok çalışmada fasulye bakteriyel solgunluk hastalığı etmeni olarak bilinen *Curtobacterium flaccumfaciens*'in saprofitik formdaki izolatların topraktan, sağlıklı bitki ve ağaçların farklı bitki kısımlarından izole edilerek bitki bakteriyel hastalık etmenlerine karşı biyolojik mücadele etmeni olarak kullanılmıştır. Yapılan söz konusu çalışmalarda *Curtobacterium flaccumfaciens*'in avirülent izolatlarının sağlıklı armut (Barbe ve ark., 2022), şeker kamışı (Rezamahalleh ve ark., 2019), dut ağacı (Xu ve ark., 2019), çarkıfelek meyvesi (Halfeld-Vieira), erik (Janisiewicz ve ark., 2013), nektarin (Janisiewicz ve ark., 2010) ve elma (Kucheryava ve ark., 1999) ağaçlarının farklı kısımlarından endofitik veya epifitik olarak izole edildikleri ve bu ağaçlarda sorun olan fungal ve önemli bakteriyel hastalık etmenlerine karşı antagonistik etkinliklerinin yanısıra bitki gelişimini teşvik edici özelliklerinin bulunduğu bildirilmiştir.

4.3. Fungal Etmenlerin Misel Gelişimini Engellemede Bakteri İzolatlarının Kullandıkları Biyokontrol Etki Mekanizmaları

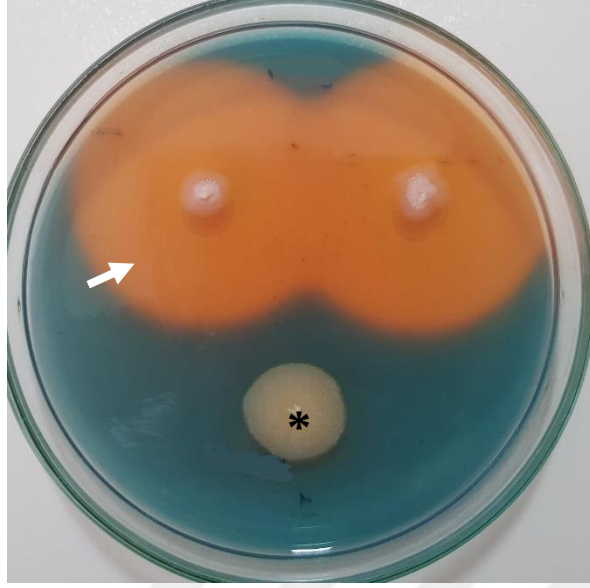
Antagonistik etkinlik gösteren bakteriler arasından türleri ve göstermiş oldukları etkinlikleri temsilen seçilen 25 izolatın ikili kültür teslerinde fungal etmenin misel gelişimini engellemeden sorumlu olan biyokontrol etki mekanizmalarından siderofor (Şekil 4.4) ve proteaz enzimi kantitatif, hidrojen siyanür (HCN) ve amonyak (NH₃) üretme kapasiteleri ise kalitatif olarak değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.6'da verilmiştir.

Çizelge 4.6. Seçilmiş antagonist bakteri izolatların fungal etmenlere karşı gösterdikleri olası biyokontrol etkinlik mekanizmaların belirlenmesi^a

Bakteri İzolatı	Sid-İnd	Pro-İnd	NH₃	HCN
<i>Pseudomonas koreensis</i> YGL72ep	3.78 ^g	1.23 ^{b-d}	+	+
<i>Bacillus simplex</i> YGS12ep	2.33 ^f	1.61 ^{f-g}	++	-
<i>Burkholderia cepacia</i> YGM75ep	2.30 ^f	1.09 ^b	+++	-
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> YGM82ep	2.15 ^f	1.31 ^{b-e}	++	++
<i>Raoultella ornithinolytica</i> YGP64en	1.73 ^{d-e}	1.51 ^{d-g}	++	++
<i>Lysinibacillus sphaericus</i> YGP3en	1.56 ^{c-e}	0.00 ^a	++	-
<i>Bacillus cereus</i> YGM3ep	1.55 ^{c-e}	1.59 ^{e-g}	+	-
<i>Bacillus mojavensis</i> YGM15en	1.55 ^{c-e}	1.78 ^g	++	-
<i>Bacillus cereus</i> YGK25en	1.49 ^{b-d}	1.47 ^{c-f}	+	-
<i>Bacillus megaterium</i> YGT18ep	1.45 ^{b-d}	1.22 ^{b-d}	+	+++
<i>Rahnella aquatilis</i> YGP63ep	1.42 ^{b-d}	1.19 ^{b-c}	++	-
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> YGS25en	1.34 ^{b-d}	1.09 ^b	+	-
<i>Rhizobium radiobacter</i> YGM77ep	1.24 ^{bc}	0.00 ^a	++	-
<i>Pantoea agglomerans</i> YGM81ep	1.22 ^{b-c}	1.20 ^{b-c}	+	-
<i>Bacillus vallismortis</i> YGL73ep	1.20 ^{b-c}	1.08 ^b	++	+
<i>Bacillus subtilis</i> YGS5en	1.16 ^{b-c}	1.15 ^b	+	-
<i>Staphylococcus succinus</i> YGL55ep	1.14 ^{b-c}	1.22 ^{b-d}	++	-
<i>Bacillus cereus</i> YGP1en	1.10 ^{b-c}	1.36 ^{b-f}	++	-
<i>Cronobacter sakazakii</i> YGKL12ep	1.05 ^b	0.00 ^a	++	-
<i>Acinetobacter johnsonii</i> YGM76en	0.00 ^a	0.00 ^a	-	-
<i>Acinetobacter lwoffii</i> YGS37en	0.00 ^a	0.00 ^a	+	-
<i>Bacillus thuringiensis</i> YGT22en	0.00 ^a	1.47 ^{c-f}	++	-
<i>Klebsiella oxycota</i> YGP62en	0.00 ^a	0.00 ^a	+	-
<i>Siccibacter colletis</i> YGP67ep	0.00 ^a	0.00 ^a	++	-
<i>Kosakonia cowanii</i> YGP7en	1.93 ^{e-f}	1.13 ^b	++	-

Sid-İnd: Siderofor; **Pro-İnd:** Protease; **NH₃:** Amonyak; **HCN:** Hidrojen Siyanür; -, renk değişimi olmadığını, ±, +, ++, +++ ise HCN veya amonyak konsantrasyonunun artışına paralel renk değişim şiddetindeki artışını gösterir.

^a Aynı sütun içerisinde yer alan ortalama değerlerin yanındaki aynı harfler izolatlar arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığını gösterir (Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi, P<0.05)



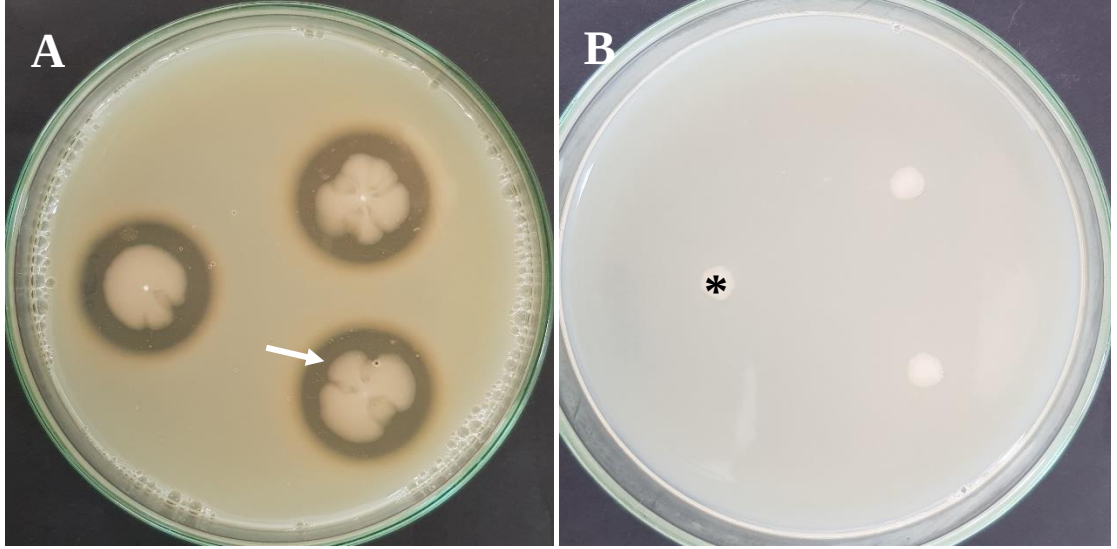
Şekil 4.4. Antagonist bakterilerin CAS Agar üzerinde siderofor üretme potansiyelleri. Aynı petride *Pseudomonas koreensis* YGL72ep (ok) tarafından geniş engelleme bölgesi oluşturulurken, *Bacillus thuringiensis* YGT22en (*) izolatu engelleme bölgesi oluşturamamıştır

Çizelge 4.6’da görüleceği gibi CAS besi yeri üzerinde bakteriler tarafından oluşturulan engelleme zonunun bakteri çapına oranlanmasıyla elde edilen indeks değerlerine bakıldığında, test edilen tüm izolatların 1.05-3.78 siderofor indeks değeri ile siderofor oluşturma yeteneğinde oldukları görülmektedir. Yapılan istatistik analiz sonucunda farklı türlere veya aynı türe bağlı izolatların siderofor oluşturma açısından istatistiksel olarak birbirlerinden önemli düzeyde farklılık gösterdikleri görülmüştür (Şekil 4.4). Bakteri izolatları arasında en yüksek siderofor indeks değeri 3.78 ile *Pseudomonas koreensis* YGL72ep izolatu tarafından oluşturmuştur. Siderofor indeks değerlerine göre bu izolatu sırasıyla *Bacillus simplex* YGS12ep (2.33), *Burkholderia cepacia* YGM75ep (2.30) ve *Pseudomonas chlororaphis* YGM82ep (2.15) izolatları takip etmiştir. Diğer yandan *Kosakonia cowanii* YGP7en (1.93), *Raoultella ornithinolytica* YGP64en (1.78), *Lysinibacillus sphaericus* YGP3en (1.56) ve *Bacillus mojavensis* YGM15en (1.55) izolatlarında besiyeri üzerinde önemli düzeyde siderofor oluşturan diğer izolatlar olmuşlardır (Çizelge 4.6).

Test edildikleri fungal etmenlere karşı yüksek düzeylerde antagonistik etkinlik gösteren *Burkholderia cepacia* YGM75ep (2.30), *Pseudomonas chlororaphis* YGM82ep (1.93) ve *Bacillus cereus* YGM3ep (1.55) izolatlarının CAS besi yeri üzerinde oldukça yüksek düzeylerde siderofor ürettikleri belirlenmiştir (Çizelge 4.5 ve Çizelge 4.6). Mango

ağaçlarında antraknoz hastalığına neden olan *Colletotrichum gloeosporioides*'e karşı yapılan biyolojik mücadele çalışmasında, sağlıklı ağaçların kök bölgesinden izole edilen antagonist bakteri izolatları arasından *Burkholderia cepacia* XXVI izolatının hastalık etmeninin *in vitro* koşullarda misel gelişimini oldukça yüksek bir engelleme düzeyinde (>%90.0) engellendiği, hastalık etmeninin engellenmesinde antimikrobiyal peptidlerin yanı sıra, hydroxamate tipinde siderofor'un önemli rol oynadığı bildirilmiştir. Yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda etkili izolat olarak belirlenen *Burkholderia cepacia* XXVI izolatının veya ürettikleri siderofor'un yüksek antifungal etkinlik göstermesi, hastalık etmeni ile biyolojik mücadelede etkili bir şekilde kullanılabilecek potansiyele sahip olduğunu göstermiştir (de los Santos-Villalobos ve ark., 2012).

Mukolitik bir enzim olan proteaz, bazı biyokontrol etmeni antagonist bakteriler tarafından üretilen, fungal hastalık etmenlerinin hücre duvarı yapısında bozulmalara ve erimelere neden olan proteolitik enzimlerden biridir. Bakterilerce üretilen proteaz enzim üretimi %2 yağı alınmış süt tozu içeren LB besi yerinde oluşturulan engelleme zonunun bakteri çapına oranlanmasıyla belirlenmiş ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4.6'da ve Şekil 4.5'de gösterilmiştir. Yapılan testlerde seçilerek kullanılan 25 izolatın 18 tanesi 1.08-1.78 indeks değerleri arasında değişen oranda proteaz enzimi ürettikleri kantitatif olarak belirlenmiştir. Siderofor'da olduğu gibi yapılan istatistik analizlerde farklı türlere ait veya aynı türe bağlı farklı izolatlar proteaz oluşturma etkinliği açısından istatistiksel olarak birbirlerinden önemli düzeyde farklılık gösterdikleri belirlenmiştir. Bakteri izolatları arasında en yüksek proteaz enzimi 1.78 indeks değeri ile *Bacillus mojavensis* YGM15en izolatı tarafından oluşturulmuştur. Bu izolat sırasıyla 1.61 indeks değeri ile *Bacillus simplex* YGS12ep, 1.59 indeks değeri ile *Bacillus cereus* YGM3ep, 1.51 indeks değeri ile *Raoultella ornithinolytica* YGP64en, 1.47 indeks değeri ile *Bacillus thuringiensis* YGT22en ve aynı indeks değeri ile *Bacillus cereus* YGK25en izolatları tarafından takip edilmiştir. *In vitro* biyoetkinlik çalışmalarında fungal etmenlere karşı yüksek düzeyde antagonistik etkinlik gösteren *Bacillus mojavensis* YGM15en (1.78), *Bacillus simplex* YGS12ep (1.61), *Bacillus cereus* YGM3ep (1.59) ve *Bacillus thuringiensis* YGT22en (1.47) izolatlarının aynı zamanda farklı düzeylerde proteaz enzim aktivitesi gösterdikleri belirlenmiştir (Şekil 4.5 ve Çizelge 4.6).



Şekil 4.5. (A ve B) Farklı turuncgil türlerinden elde edilen antagonist bakteri izolatlarının protease enzim üretme potansiyellerinin SMLBA besi yeri üzerinde belirlenmesi. (A) *Bacillus cereus* YGK3en izolatı tarafından üretilen protease besi yeri üzerinde engelleme bölgesi (ok) oluştururken, (B) *Acinetobacter johnsonii* YGM76en izolatı (*) engelleme bölgesi oluşturmamıştır

Bir diğer antagonistik etki mekanizmalarından biri olan amonyak (NH_3) üretme potansiyelleri, bakterilerin geliştirildikleri Peptonlu su (Pepton Water, PW) içinde Nessler's çözeltisi ile belirlenmiştir (Cappuccino ve Sherman, 2013). Bakteri izolatlarınca PW besi yeri içerisinde oluşturulan amonyak üretimi tüplerdeki besi yeri renginin Nessler's çözeltisi eklenmesiyle açık sarıdan kahverengi-koyu sarı renge dönüşmesiyle görsel (kalitatif) olarak belirlenmiştir (Şekil 3.6, Şekil 4.6, Çizelge 4.6). Elde edilen sonuçlara göre, aralarında yüksek oranda antagonistik etkinlik gösteren *Pseudomonas chlororaphis* YGM82ep, *Bacillus vallismortis* YGL73ep, *Bacillus thuringiensis* YGT22en ve *Rahnella aquatilis* YGP63ep bakteriyel izolatların bulunduğu 24 bakteri izolat besi yeri içerisinde değişen konsantrasyonlarda amonyak ürettikleri belirlenmiştir (Çizelge 4.6).



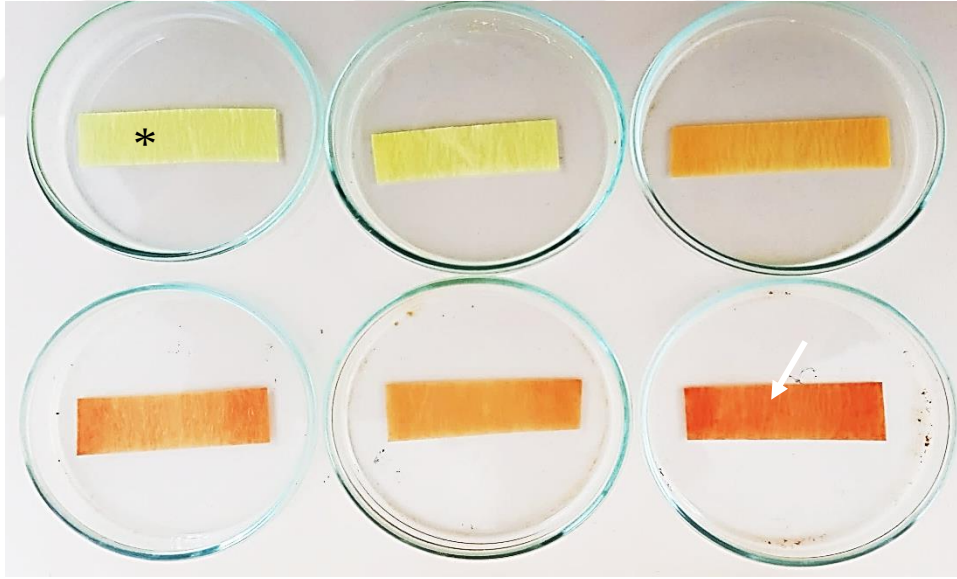
Şekil 4.6. Farklı turunçgil türlerinden elde edilen antagonist bakteri izolatlarının amonyak üretim potansiyellerinin PW besiyeri içerisinde belirlenmesi. Besi yeri içerisinde oluşturulan tüplerdeki besiyeri renginin açık sarıdan (*) koyu sarı-kahverengine dönüşmesiyle (ok) belirginleşmiştir

Antagonist bakterilerin hastalık gelişimini engellemede kullandıkları mekanizmalardan bir diğeri de uçucu hidrojen siyanür (HCN) bileşenidir. Castric, (1977) tarafından bildirildiği üzere, glycine içeren besiyerinde gelişen bakteri hücreleri tarafından üretilen uçucu HCN bileşeni petri kapağında bulunan ve pikrik asit ile ıslatılmış filtre kâğıdı renginin sarı renkten kahverengi veya koyu kırmızıya dönüşmesi ile görsel (kalitatif) olarak belirlenmiştir (Şekil 4.7). Elde edilen gözlemlere dayanılarak Çizelge 4.6’da sunulan sonuçlara göre, 25 izolat arasında sadece 5 izolatın değişen şiddetlerde HCN ürettiği belirlenmiştir. HCN üretimi bakımından test edilen bakteri izolatları arasında en şiddetli HCN üretimi antagonistik etkinliği oldukça yüksek izolatlardan olan *Bacillus megaterium* YGT18ep tarafından üretilirken, bu izolatı *Pseudomonas chlororaphis* YGM82ep ile *Raoultella ornithinolytica* YGP64en izolatları izlemiştir. Bu bakterileri nispeten daha düşük HCN üretimine sahip olan *Bacillus vallismortis* YGL73ep ve *Pseudomonas koreensis* YGL72ep izolatları takip etmiştir. Aralarında yüksek oranda antagonistik etkinlik gösteren *Bacillus cereus* YGM3ep ve *Bacillus thuringiensis* YGT22en gibi birçok izolatın HCN üretme potansiyelinin olmadığı tespit edilmiştir.

Acebo-Guerrero ve ark., (2015) tarafından yapılan çalışmada, kakao ağaçlarının kök bölgesinden izole edilen bakterilerin, kök çürüklüğü hastalığı etmeni olan *Phytophthora palmivora*’ya karşı antagonistik etkinlikleri araştırılmıştır. Elde edilen bakteri izolatları arasında *Pseudomonas chlororaphis* olarak teşhisi yapılan 3 izolatın

fungus etmene karşı yüksek antagonistik etkinlik gösterdiği, gösterilen antagonistik etkinliklerinin, siderofor ve HCN üretiminden kaynaklandığı bildirilmiştir.

Shahid ve ark., (2017) Pakistan'ın farklı bölgelerinden izole ettikleri antagonist bakteri izolatları arasından 8 floresans *Pseudomonas* izolatı *P. chlororaphis* subsp. *chlororaphis* ve *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* olarak tanılamışlardır. Teşhisini yaptıkları tüm izolatların fenazin, HCN, siderofor ve IAA ürettikleri, topraktaki bağlı fosforu çözmede etkili olamadıkları, fakat aralarından 5 izolatın toprakta bağlı çinkoyu çözebildiklerini böylece bitki gelişimini önemli düzeyde teşvik ettikleri bildirilmiştir. Nandi ve ark., (2017) Biyolojik mücadele etmeni olan antagonist *Pseudomonas chlororaphis* PA23 izolatının fungal hastalık etmeni olan *Sclerotinia sclerotiorum*'un misel gelişimini *in vitro* koşullarda engellediğini, söz konusu engellemede rol oynayan olası mekanizmaların, bakteri tarafından üretilen antimikrobiyal bileşiklerden pirolnitrin (PRN), fenazin (PHZ), hidrojen siyanit (HCN), hücre duvarını yıkan enzimler ve siderofordan kaynaklandığını bildirmişlerdir.



Şekil 4.7. Farklı turuncu türlerinden izole edilen antagonist bakteri izolatlarının hidrojen siyanür (HCN) üretim potansiyellerinin Glycine içeren TSA besiyeri üzerinde belirlenmesi. Besiyeri içerisinde uçucu HCN birikimi sonucunda petri kapağındaki filtre kâğıdının açık sarı renkten (*) kırmızı-turuncu renge (ok) dönüşmüştür

4.4. Bakteri İzolatlarının Bitki Büyüme Gelişimini Teşvik Eden Mekanizmalarının Belirlenmesi

Antagonistik etkinlik gösteren bakteri izolatlarının bitki büyümesini teşvik etmekten sorumlu olabilecek olası etki mekanizmalarından indol asetik asit (IAA) üretme potansiyelleri, daha önceden bildirildiği şekilde L-tryptophane içeren LB sıvı besisi içinde ppm ($=\mu\text{g/ml}$) düzeyinde standart IAA absorbans değerlerine kıyaslanmak suretiyle kantitatif olarak belirlenmiştir (Şekil 3.7CD, Şekil 4.8). Bakteri izolatların fosforu çözme potansiyelleri ise tri kalsiyum fosfat içeren Pikovskaya Agar (PVK) besisi yeri üzerinde bakterilerin ürettiği enzimler sonucu tri kalsiyum fosfatın çözülmesiyle oluşturdukları engelleme zonlarının (Şekil 4.9) bakteri çapına kıyaslanmasıyla hesaplanmış indeks değerleri ile kantitatif olarak değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.7’de olarak verilmiştir.

Çizelge 4.7’de görülebileceği gibi test edilen 25 izolattan 21 izolatın 1.84-69.68 $\mu\text{g/ml}$ aralığında değişen konsantrasyonlarda IAA üretmek suretiyle kontrol ve zayıf bakteri izolatlarından farklı gruba düşmek suretiyle istatistiksel olarak önemli düzeyde farklılık göstermiştir. İzolatların geneli değerlendirildiğinde, Gram negatif bakteri türlerinden *Pseudomonas koreensis* YGL72ep (69.68 $\mu\text{g/ml}$) ve *Pseudomonas chlororapsis* YGM82ep (49.83 $\mu\text{g/ml}$) izolatlarının oldukça yüksek düzeylerde IAA ürettikleri belirlenmiştir. Benzer şekilde Gram pozitif bakteri türlerinden *Bacillus simplex* YGS12ep (16.88 $\mu\text{g/ml}$), *Staphylococcus succinus* YGL55ep (13.53 $\mu\text{g/ml}$), *Bacillus mojavensis* YGM15en (11.36 $\mu\text{g/ml}$), *Bacillus cereus* YGM3ep (10.51 $\mu\text{g/ml}$) izolatlarının yüksek düzeylerde IAA ürettikleri belirlenmiştir.



Şekil 4.8. Antagonist bakterilerin L-tryptophane içeren LB besi yerinde IAA üretme potansiyellerinin belirlenmesi. (A) Farklı bakteri izolatu tarafından üretilen IAA sonucu besi yerinin kırmızı-pembe renge (ok) dönüşmüştür. (B) Farklı türlere ait bakteri izolatları tarafından üretilen ve bitki büyümesini teşvik eden IAA konsantrasyonlarına bağlı renk (sarı renkten koyu kırmızı-pembe) değişimleri

Bakteri izolatları arasında en yüksek düzeyde IAA üreten *Pseudomonas koreensis* YGL72ep izolatu (69.68 µg/ml) olarak belirlenmişken (Çizelge 4.6), bu izolatu takip eden ve bu izolata oranla daha düşük seviyede IAA üreten bakteri izolatları *Pseudomonas chlororaphis* YGM82ep (49.83 µg/ml), *Bacillus simplex* YGS12ep (16.88 µg/ml), *Pantoea agglomerans* YGM81ep (13.93 µg/ml), ve *Bacillus mojavensis* YGM15en (11.36 µg/ml) olarak tespit edilmiştir. Epifit ve endofit bakteri izolatlarının IAA üretme potansiyeli karşılaştırdığında, epifit bakterilerin endofit bakterilerden daha fazla IAA ürettiği belirlenmiştir.

Çizelge 4.7. Seçilmiş bakteri izolatların bitki büyümesini teşvik eden IAA ve fosforu çözme potansiyelleri a

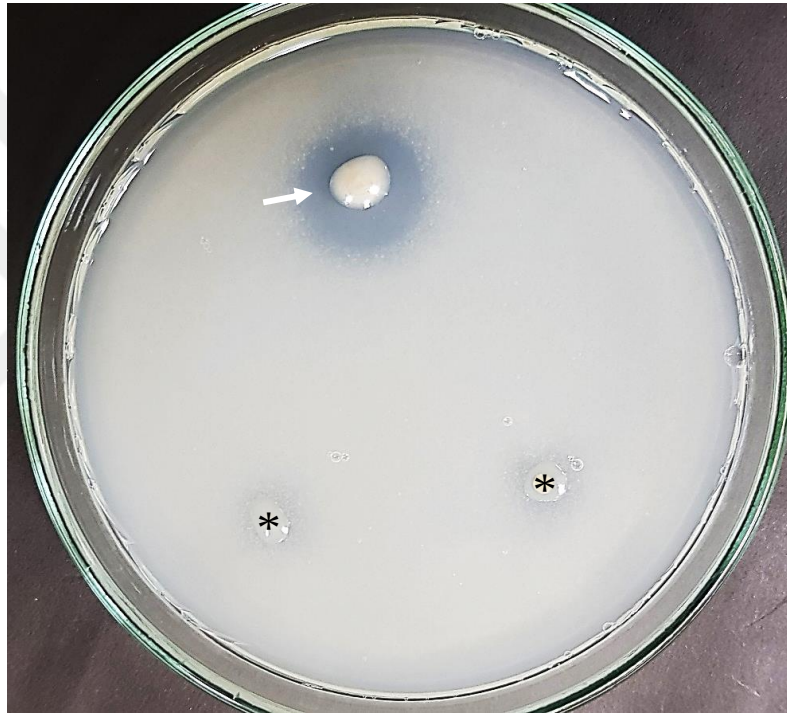
Bakteri İzolatı	Bitki büyümesini teşvik eden mekanizmalar ^a	
	IAA (µg/ml)	Fosfor Çözme İndeksi
<i>Pseudomonas koreensis</i> YGL72ep	69.68 ^o	2.27 ^c
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> YGM82ep	49.83 ⁿ	0.00 ^a
<i>Bacillus simplex</i> YGS12ep	16.88 ^m	0.00 ^a
<i>Pantoea agglomerans</i> YGM81ep	13.93 ^l	0.00 ^a
<i>Staphylococcus succinus</i> YGL55ep	13.53 ^l	0.00 ^a
<i>Bacillus mojavensis</i> YGM15en	11.36 ^k	0.00 ^a
<i>Lysinibacillus sphaericus</i> YGP3en	10.97 ^k	0.00 ^a
<i>Bacillus cereus</i> YGM3ep	10.51 ^{jk}	0.00 ^a
<i>Bacillus cereus</i> YGK25en	10.31 ^{jk}	0.00 ^a
<i>Rahnella aquatilis</i> YGP63ep	9.16 ^{ij}	2.57 ^d
<i>Bacillus subtilis</i> YGS5en	7.93 ^{hi}	0.00 ^a
<i>Acinetobacter lwoffii</i> YGS37en	7.73 ^{hi}	0.00 ^a
<i>Cronobacter sakazakii</i> YGKL12ep	7.46 ^h	1.09 ^b
<i>Bacillus megaterium</i> YGT18ep	6.96 ^{gh}	0.00 ^a
<i>Bacillus thuringiensis</i> YGT22en	6.75 ^{f-h}	0.00 ^a
<i>Bacillus cereus</i> YGP1en	5.96 ^{e-g}	0.00 ^a
<i>Acinetobacter johnsonii</i> YGM76en	5.38 ^{d-f}	0.00 ^a
<i>Klebsiella oxycota</i> YGP62en	4.87 ^{de}	0.00 ^a
<i>Burkholderia cepacia</i> YGM75ep	4.46 ^d	1.19 ^b
<i>Bacillus vallismortis</i> YGL73ep	2.39 ^c	0.00 ^a
<i>Rhizobium radiobacter</i> YGM77ep	1.84 ^{bc}	0.00 ^a
<i>Siccibacter colletis</i> YGP67ep	1.45 ^{a-c}	1.14 ^b
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> YGS25en	0.59 ^{ab}	0.00 ^a
<i>Kosakonia cowanii</i> YGP7en	0.02 ^a	1.16 ^b
<i>Raoultella ornithinolytica</i> YGP64en	0.01 ^a	2.50 ^d
Kontrol	0.00 ^a	nt

^a Aynı sütun içerisinde yer alan ortalama değerlerin yanındaki aynı küçük harfler izolatlar arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığını gösterir (Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi, P<0.05)

Bakteri izolatlarının bir diğer bitki gelişimini teşvik eden etki mekanizmalarından olan fosfor çözme potansiyelleri ise tri kalsiyum fosfat içeren Pikovskaya Agar (PVK) besi yeri üzerinde belirlenmiştir. Bakterilerin ürettiği enzimler sonucu PVK besiyeri içerisindeki tri kalsiyum fosfatın çözülmesiyle gözlenen engelleme zonlarının (Şekil 4.9) bakteri çapına kıyaslanmasıyla fosfor çözme indeks değerleri hesaplanmıştır (Çizelge 4.7). Elde ettiğimiz sonuçlara göre test edilen 25 farklı bakteri izolatın 18 tanesi (%60.5) PVK besiyeri üzerinde fosfor çözme etkinliği göstermezken, 7 izolat 1.09 ile 2.57

arasında değişen çözünürlük indeks değerlerinde fosforu çözme potansiyeline sahip olduğu gözlenmiştir (izelge 4.7, şekil 4.9).

Denemelerde kullanılan bakteri izolatların PVK besiyeri üzerinde göstermiş oldukları fosfor çözme etkinliklerine göre Gram negatif bakteri türlerinin gram pozitif türlere kıyasla daha yüksek etkinlik göstermiştir. Bu izolatlar arasında *Rahnella aquatilis* YGP63ep, *Raoultella ornithinolytica* YGP64en, *Pseudomonas koreensis* YGL72ep izolatları sırasıyla 2.57, 2.50, 2.27 çözünürlük index değeri ile en yüksek etkinlik gösteren izolatlar olmuşlardır (izelge 4.7).



şekil 4.9. Farklı turunıl türlerinden elde edilen bakteri izolatlarının PVK besi yerinde fosforu çözme etkinliğinin belirlenmesi. *Pseudomonas koreensis* YGL72ep izolatı (ok) besi yerinde engelleme bölgesi (ok) oluşturmak suretiyle fosforu çözerken, *Bacillus cereus* YGP1en ve *Bacillus megaterium* YGT18ep izolatları (*) etkinlik göstermemiştir

Gusain ve ark., (2015) Himalaya dağlarındaki yağmur ormanlarından izole ettikleri ve *Pseudomonas koreensis*, *Arthrobacter nitroguajacolicus* YB4 ve *Klebsiella oxytoca* olarak tanımladıkları bakteri izolatlarının fosforu özme, IAA ve siderofor üretme potansiyellerinin belirlenmesine yönelik yaptıkları çalışmalarında, 4 izolatında yüksek düzeylerde siderofor ve IAA üretme yeteneğinde olduklarını, *Pseudomonas koreensis*, *Arthrobacter nitroguajacolicus* YB4 ve *Klebsiella oxytoca* izolatlarının fosforu çözme

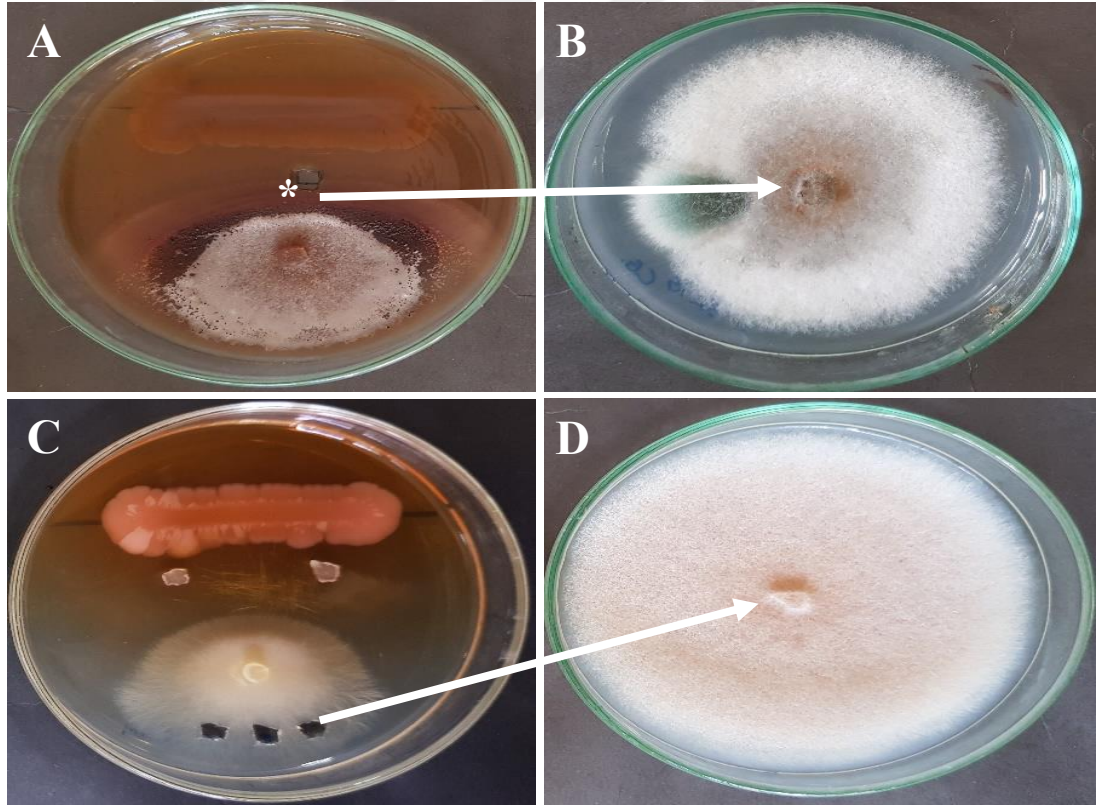
etkinliğinde bulunduğunu, 5 izolatın uygulandığı bitkilerde fosfor alımının arttığı, bitki biyomasında (yaş ve kuru ağırlık olarak) ciddi ağırlık artışı olduğu belirlenmiştir. Rokhbakhsh-Zamin ve ark. (2011) tarafından yapılan çalışmada inci darısı bitkilerinin kök bölgelerinden 31 farklı *Acinetobacter* izolatı izole etmişlerdir. Elde ettikleri bakteri izolatları arasından 26 izolatın fosfor ve çinko elementlerini çözme, siderofor ve IAA üretme suretiyle bitki gelişimin oldukça yüksek düzeylerde teşvik ettiğini bildirmişlerdir. Çalışmalarımızda ikili kültür testlerde yüksek antagonistik etkinliğe sahip olan *Rahnella aquatilis* YGP63ep izolatının aynı zamanda yüksek düzeyde fosfor çözme yeteneğinde (2.57) olduğu belirlenmiştir. Diğer yandan *Raoultella ornithinolytica* YGP64en izolatının ikili kültür testlerinde etkinliğini oldukça düşük seviyede olmasına rağmen, fosfor çözme yeteneğinin yüksek düzeyde (2.27) olduğu belirlenmiştir. Bu durum antagonistik etkinliği yüksekolan tür/izolatların aynı anda bitki gelişimini teşvik etmede başarılı olacağının anlamına gelmediğini göstermiştir.

4.5. Fungal Etmenlerin Misel Gelişiminin Engellendiği Bölgelerinin Fungisidal ve Fungistatik Özellikleri

İn vitro ikili kültür testleri sonucunda antagonistik etkinliği yüksek izolatların sebep olduğu engelleme bölgelerinin fungisidal veya fungistatik özelliklerinin belirlenmesi amacıyla ikili kültürdeki fungal kültürün alt kısmından alınan 2 canlı misel diski yerleştirilerek tekrar inkübasyona bırakılmıştır. Engelleme bölgelerindeki besiyerleri üzerinde misel gelişiminin görülmemesi, bu bölgelerde bakteri tarafından üretilen bileşik(ler)in fungisidal etkinliğe sahip olduğunu göstermiştir (Şekil 4.10). Yine ikili kültür petrilerinde gelişen fungusun engelleme bölgesine yakın ve uzaktaki yerlerinden alınan disklerin PDA petrilerine ekimleri yapılarak buradaki hiflerin canlılık durumu belirlenmiştir. İnkübasyondan 4 gün sonra engelleme bölgesine yakın yerden alınan ve morfolojik bozukluk gözlenen misel diskin uzak noktadan alınan sağlıklı misel diske oranla daha yavaş geliştiği gözlenirken (Şekil 4.11B), engelleme bölgesine uzak yerlerinden alınan misel diskin normal gelişme gösterdiği (Şekil 4.11D) belirlenmiştir.



Şekil 4.10. Engelleme bölgesindeki bileşik(ler)in fungusidal etkinliğinin belirlenmesi potansiyellerinin belirlenmesi. Engelleme bölgesine yerleştirilen sağlıklı fungus disklerinde (*) gelişme görülmemesi bu bölgede üretilen bileşik(ler)in fungusidal etkinliğini göstermektedir



Şekil 4.11. (A-B) engelleme bölgesine yakın yerdeki yapısal bozukluğun olduğu misel diski (*) PDA besiyerine aktarıldığında sınırlı gelişim gösterirken, (C-D) engelleme bölgesinden uzak noktadan alınan misel diski normal gelişim göstermiştir

4.6. Antagonist Bakteri İzolatları Tarafından Üretilen Uçucu Organik Bileşen(ler)in Antagonistik Etkinliği

In vitro ikili kültür testlerinde yüksek antagonistik etki gösteren izolatlar arasında temsili olarak seçilen *Bacillus cereus* YGK25en, *Bacillus thuringiensis* YGT22en, *Bacillus vallismortis* YGL73ep, *Pseudomonas chlororaphis* YGM82ep gibi farklı *Bacillus* ve *Pseudomonas* türlerine ait izolatlar tarafından üretilen uçucu organik bileşenlerin (VOCs, volatile organic compounds) antifungal etkinliği birbirlerine temas etmeyecek şekilde tasarlanmış ikili kültür testleri ile belirlenmiştir (Şekil 4.12). Söz konusu izolatlar arasında 3 farklı fungal etmene karşı yüksek düzeyde antifungal etkinlik gösteren bakteri izolatı *Pseudomonas chlororaphis* YGM82ep olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.8). *Pseudomonas chlororaphis* YGM82ep izolatı tarafından üretilen uçucu bileşenler *Geotrichum citri-aurantii*'nin misel gelişimini engelleme oranı %89.2 iken, *Colletotrichum gloeosporioides*' in misel gelişimini %82.6 oranında, *Fusarium solani*'nin misel gelişimini ise %57.1 oranlarında engellediği belirlenmiştir. Bunun yanında *Bacillus thuringiensis* YGT22en izolatı *Geotrichum citri-aurantii*'nin misel gelişimini %77.7 gibi yüksek oranda engellediği gözlenmiştir. Bakteriyel etmenin uçucu bileşenlerin antifungal etkinliği daha önce yapılan ikili kültür testlerinde besiyerine difüze olan bileşenlerden (Çizelge 4.5) daha düşük seviyelerde olduğu gözlenmiştir. *In vitro* ikili kültür testlerinde yüksek etkinlik gösteren bu izolatların (Çizelge 4.5) uçucu bileşenlerinin antifungal etkinliği diğer test edilmiş fungal etmenlere karşıda düşük düzeylerde gerçekleşmiştir (Çizelge 4.8).

Farklı *Pseudomonas* ve *Bacillus* türlerine ait antagonist bakteri izolatları tarafından besiyerlerine difüze olabilen (2,4-diacetylphloroglucinol, phenazine-1-carboxylic acid, phenazine-1-carboxamide, pyoluteorin, pyrrolnitrin, iturin, surfactin, fengycin vb.) antimikrobiyal etkinliğe sahip bileşenlerin yanısıra uçucu organik metabolitler (VOCs, Volatile Organic Compounds) üreterek patojen gelişimini engellediği/baskıladığına yönelik bir çok çalışma bulunmaktadır (Raio ve Puopolo, 2021; Dimkic ve ark., 2022). VOC mikroorganizmaların yanısıra bitkiler üzerine gerek zararlı gerekse faydalı etkide bulunabilirler.

Çizelge 4.8. Antagonist etkinliği yüksek bazı bakteri izolatları tarafından üretilen uçucu organik bileşenlerinin *in vitro* ikili kültür testlerinde fungal etmenlerin misel gelişimi ve engellenmesi üzerine etkinliği

Antagonist bakteri izolatları	Fungal etmenler					
	<i>F. solani</i>		<i>G. citri-aurantii</i>		<i>C. gloeosporioides</i>	
	MG (mm)	MGE (%)	MG (mm)	MGE (%)	MG (mm)	MGE (%)
<i>Kontrol</i>	81.67 ^d	-	90,00 ^e		86,33 ^e	
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> YGM82ep	35.00 ^a	57.15 D	9.67 ^a	89.26 Y	15.00 ^a	82.63 Y
<i>Bacillus vallismortis</i> YGL73ep	34.33 ^a	57.97 Y	46.67 ^c	48.14 D	73.67 ^c	14.67 D
<i>Bacillus thuringiensis</i> YGT22en	60.00 ^c	26.54 D	20.00 ^b	77.78 Y	79.67 ^d	7.72 D
<i>Bacillus cereus</i> YGK25en	50.00 ^b	38.78 D	63.33 ^d	29.63 D	58.33 ^b	32.44 D

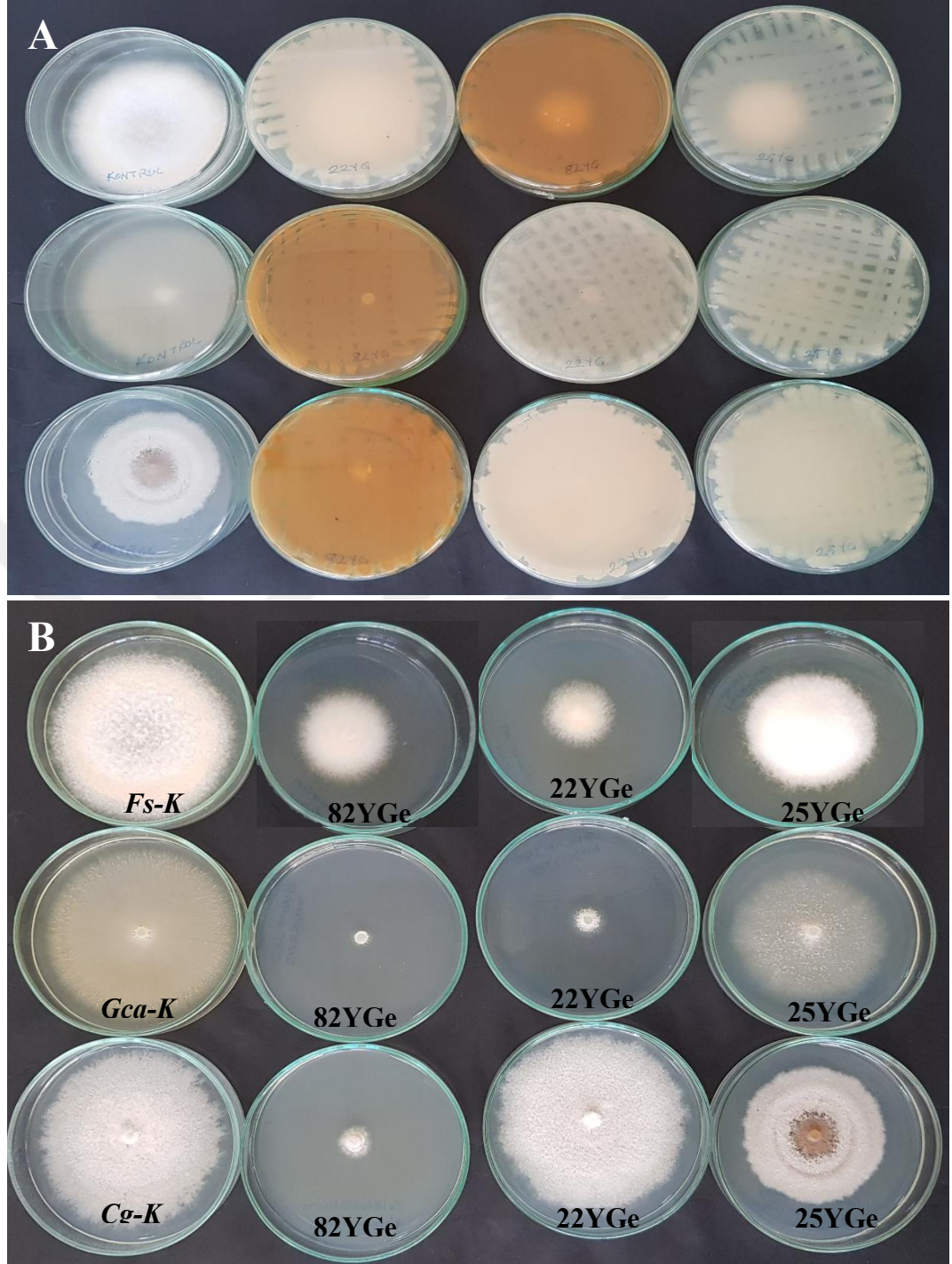
MG: Misel gelişimi (mm); **MGE:** Misel gelişiminin engellenme oranı (%)

Sütun içinde yer alan ortalama değerlerin yanındaki farklı küçük harfler uygulamalar arasındaki farkın istatistiksel olarak Duncan Çoklu Karşılaştırma testine göre önemli olduğunu gösterir (P<0.05).

D ve **Y:** Uçucu bileşen(ler)in antagonist etkinliğinin ikili kültür testlemesine göre daha düşük (**D**) veya daha yüksek (**Y**) düzeyde olduğunu gösterir.

Özellikle *P. chlororaphis* türünün bazı patojenlerin gelişimini engellemede üretmiş oldukları VOC'ın büyük rol oynadığı, *P. chlororaphis* SPS-41 izolatının üretmiş olduğu “3-Methyl-1-butanol”ün tatlı patates bitkilerinde *Ceratocystis fimbriata* hastalık etmenini etkili bir şekilde engellediği bildirilmiştir (Zhang ve ark., 2019). Benzer şekilde *P. chlororaphis* 449 izolatı tarafından üretilen bir diğer VOC olan “1-Undecene”nin zararlı böcek türlerinden olan *Drosophila melanogaster* ve nematod *C. elegans*'a karşı yüksek antagonistik etki gösterdiği bildirilmiştir (Popova ve ark., 2014). *P. chlororaphis* M71 izolatı tarafından üretilen bir diğer VOC olan “Methanethiol” ise fungal hastalık etmeni *S. cardinale* ye karşı biyokontrol etkinlik göstermiştir (Raio ve ark., 2020). *P. chlororaphis* M71 izolatı tarafından üretilen “methanethiol” aynı zamanda domates bitkilerini su stresine karşı koruduğu gibi, izolat tarafından üretilen bir başka VOC olan “butanediol” tütün bitkisinde *Erwinia caratovora*'ya karşı dayanıklılığı teşvik ettiği, *Arabidopsis thaliana* bitkisinde ise kuraklığa karşı toleransı artırdığı bildirilmiştir (Han ve ark., 2006; Cho ve ark., 2008).

Benzer şekilde farklı *Bacillus* spp. ait antagonist bakteri izolatları tarafından üretilen VOC'ların farklı konukçu bitkilerinde hastalığa neden olan *Fusarium* spp. karşı antifungal etkinlik gösterdiği yapılan *in vitro* ve *in vivo* testlerle ortaya konulmuştur (Khalaf ve Raizada, 2018; Baez-Vallejo ve ark., 2020; Toloza-Moreno ve ark., 2020; Ezrari ve ark., 2021).



Şekil 4.12. Antagonist bakteri izolatları tarafından üretilen uçucu bileşenlerin fungal etmenlerin misel gelişimi üzerine antagonistik etkinlikleri. (A) Kapalı ikili kültür testinde üst petri kapağında bakteri, (B) alt kapaktaki besiyerinde uçucu bileşenlere maruz kalmış fungal etmenlerin gelişimi

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Yaptığımız bu çalışmada sağlıklı turunçgil ağaçlarının kök, gövde, yaprak, meyve dokularından endofit ve epifit bakteriler izole edilmiştir. MALDI-TOF analiz yöntemi ile kesin tür tanısı yapılan bakteri izolatları turunçgil meyve ağaçlarında sırasıyla solgunluk, ekşi çürüklük, antraknoza sebep olan *Fusarium solani*, *Geotrichum citri-aurantii*, *Colletotrichum gloeosporioides* fungal hastalık etmenlerine karşı *in vitro* koşullarda antagonist etkinliği ve hastalık etmenlerinin misel gelişimini engellemede rol oynayan olası etki mekanizmaları çalışılmıştır.

Ülkemizde yakın zamanda ekşi çürüklük (*Geotrichum citri-aurantii*) hastalık etmenine karşı yapılmış biyolojik mücadele çalışması bulunmaktadır. Doğrudan turunçgillerin kök, dal-sürgün, yaprak ve meyve gibi farklı kısımlarından elde edilmiş faydalı bakteriyel türlerin *F. solani* ve *C. gloeosporioides* hastalık etmenlerine karşı yapılmış çalışma bulunmamaktadır. Bu bağlamda, çalışma turunçgillerden izole edilen endofit ve epifit bakterilerin fungal etmenlere karşı biyolojik mücadele olanaklarının araştırıldığı ilk çalışma niteliğindedir. Çalışmada etkinliği araştırılan ekşi çürüklük (*G. citri-aurantii*) etmenine karşı yakın zamanlarda yapılmış olan kompostlardan (Gedik, 2019) ve sağlıklı turunçgil meyvelerinden izole edilmiş antagonist bakterilerin *in vitro* etkinliğinin araştırıldığı bir çalışma mevcuttur (Soylu ve ark., 2022).

Bacillus ve *Pseudomonas* cinslerine ait biyolojik mücadele etmeni izolatlar ve bu izolatlar tarafından üretilen biyoaktif sekonder metabolitleri, doğrudan antibiyosis, bitki büyümesi ve gelişimini teşviki ve konukçu bitkilerinde sistemik dayanıklılığın teşvik edilmesi gibi çeşitli mekanizmaları harekete geçirmek suretiyle hastalık/zararlı yönetiminde çevre dostu güvenilir mücadele etmenleri olarak kabul edilirler. Bu türlere ait izolatların bitki patojeni bakteri ve fungal etmenlere, nematodlara ve farklı böceklerle karşı çok aktif etkinliğe sahip olduğu yapılan birçok çalışmada kanıtlanmıştır. Mevcut çalışmamızda sağlıklı turunçgil bitkilerinin farklı kısımlarından endofit ve epifit karakterlerde toplam 48 izolat bakteri izolatı elde edilmiş olup, tür düzeyinde tanılamaları MALDI-TOF ile yapılmıştır. Elde edilen bakteri izolatların fungal etmenlerin misel gelişimini engellemesi üzerine olan antagonistik etkinlikleri türe, izolata ve test edildikleri hastalık etmenine bağlı olarak değişiklik göstermiştir. Antagonistik etkinliği yüksek olan bakterilerin genelde gram pozitif *Bacillus* spp. ve bazı *Pseudomonas* spp. (*P.*

chlororapsis) ait izolatlar olduğu belirlenmiştir. Yapılan ikili kültür testlerinde *G. citri-aurantii*'nin misel gelişimini; *Bacillus vallismortis* YGL73ep, *Bacillus cereus* YGK25en ve *Pseudomonas chlororapsis* YGM82ep izolatları %73.3-77.2 oranlarında; *C. gloeosporioides*'in misel gelişimini; *Bacillus thuringiensis* YGT22en, *Bacillus vallismortis* YGL73ep, *Bacillus cereus* YGK25en ve *Pseudomonas chlororaphis* YGM82ep izolatları %65.5-72.7 oranlarında; *F. solani*'nin misel gelişimini ise *Bacillus subtilis* YGS5en, *Bacillus cereus* YGK25en, ve *Pseudomonas chlororapsis* YGM82ep izolatları %66.1-71.1 oranlarında engelleyen en güçlü antagonist izolatlar olarak belirlenmiştir. Yapılan detaylı biyoetkinlik çalışmalarında, ikili kültür petripleri üzerinde güçlü antagonist bakteri izolatları tarafından oluşturulan engelleme bölgesine difüze olan antifungal bileşik(ler)in hastalık etmenlerine karşı “fungisidal” etkiye sahip olduğu görülmüştür. Benzer şekilde bazı izolatların engelleme bölgesine yakın yerlerinde fungus miselleri üzerinde kısmen de olsa morfolojik bozulmalara neden olduğu, ancak bu bölgelerden alınan misellerin canlılıklarını tamamen yitirmedikleri yapılan canlılık ve mikroskopik çalışmalarla tespit edilmiştir. Güçlü etkiye sahip izolatlar arasından seçilen farklı türlere ait antagonist bakteri izolatlarından olan *Pseudomonas chlororapsis* YGM82ep, *Bacillus vallismortis* 73YGep, *Bacillus thuringiensis* 22YGen ve *Bacillus cererus* 25YGen tarafından üretilen uçucu organik bileşikler (VOC's) *in vitro* ikili kültür testlerinde fungal patojenlerin misel gelişimlerini önemli ölçüde engellediği gözlenmiştir.

Fungal etmenlere karşı yüksek düzeyde antagonistik etki gösteren izolatlar arasından türleri/konukçuları ve yaşadıkları bölgeyi temsil edecek şekilde seçilmiş bakteri izolatlar siderophore, protease, amonyak, HCN üretimi, fosfor çözme ve IAA, üretme açısından istatistiksel olarak oldukça farklılıklar göstermiştir. Seçilerek test edilen 25 bakteri izolatın, 20 tanesi siderophore, 24 tanesi amonyak, 19 tanesi protease, 5 tanesi ise HCN üretim bakımından pozitif olarak kayıt edilmiştir. Güçlü olarak belirlenen bakteri izolatların bu mekanizmalardan bir veya birkaçını birlikte üretme yetisinde olması, siderofor, protease, HCN ve amonyak üretiminin misel gelişiminin engellenmesinde (antagonizm) rol oynadığı düşünülen mekanizmalar olarak kabul edilmiştir.

Söz konusu izolatların ayrıca bitki gelişimini teşvik etmede rol oynayan mekanizmalardan IAA ve fosforu çözme potansiyelleride değerlendirilmiştir. İzolatlar arasından temsilen seçilen 25 bakteri izolattan 21 tanesi 1.84-69.68 µg/ml konsantrasyon

aralığında değişen IAA üretmiş olup, sadece 7 izolatın tri kalsiyum fosfat içeren Pikovskaya Agar (PVK) besi yeri üzerinde ürettikleri enzimler sonucu fosforu çözebilme yeteneğinde olduğu belirlenmiştir. İzolatlar arasında en yüksek konsantrasyonda IAA üreten bakteriler sırasıyla *Pseudomonas koreensis* YGL72ep, *Pseudomonas chlororaphis* YGM82ep ve *Bacillus simplex* YGS12ep olarak belirlenmiştir. Fosforu çözme potansiyelleri açısından değerlendirildiğinde ise en yüksek etkinliği sırasıyla *Rahnella aquatilis* YGP63ep, *Raoultella ornithinolytica* YGP64en ve *Pseudomonas koreensis* YGL72ep izolatları göstermiştir.

Söz konusu izolatlar Erzin ilçesinde yer alan farklı turunçgil türlerine ait sağlıklı ağaçlardan izole edilmişlerdir. Antagonistik etkinlik bakımından farklı türler arasında olduğu kadar aynı türe ait izolatlar arasında da önemli farklılıklar gözlenmiştir. Gözlenen farklılıının ağaçların yetiştiği ortamdaki biyotik ve abiyotik faktörlerin izolatların genetik çeşitliliğine etkide bulunmasından kaynaklandığı düşünölmektedir. Epifitik ve endofitik kökenli bakterilerin toprak kökenli hastalık etmenlere karşı *in vitro* antagonistik etkinlik gösterdiği, hastalık etmenlerinin engellemesinde antagonistik, parazitik ve PGPB etki mekanizmalarından bir veya birkaçını birden kullanmak suretiyle etkili olduğu belirlenmiştir.

Sonuç olarak turunçgillerde sorun olan antraknoz, *Fusarium solgunluğu* ve ekşi çüröklük hastalıklarına karşı biyolojik mücadele etmeni olarak kullanılan antagonist bakteriyel izolatlar entegre mücadele programı kapsamında kullanılmak suretiyle pestisitlerin çevre üzerindeki olası olumsuzlukların azaltılmasına katkıda bulunabilir. İzolatlar arasında yüksek antagonistik (siderophore, protease, amonyak üretimi) ve bitki gelişimini teşvik edici (IAA ve fosfor çözme) etkinlikler gösteren, özellikle *Bacillus* spp. ve *Pseudomonas* spp. ait antagonist ve PGPB izolatların teksele veya karışım halinde geliştirilecek biyopreparatların söz konusu hastalıklarla mücadelede kimyasal fungusitlere alternatif olarak değerlendirilebileceği görüşüne varılmıştır.

KAYNAKLAR

- Abebanjo, A., Bankole, S.A., 2004. Evaluation of some fungi and bacteria for biocontrol of anthracnose disease of cowpea. **Journal of Basic Microbiology**, 44, 3-9.
- Acebo-Guerrero, Y., Hernandez-Rodriguez, A., Vandeputte, O., Miguelez-Sierra, Y., Heydrich-Perez, M., Cornelis, P., Bertin, P., El Jaziri, M. 2015. Characterization of *Pseudomonas chlororaphis* from *Theobroma cacao* L. rhizosphere with antagonistic activity against *Phytophthora palmivora* (Butler). **Journal of Applied Microbiology**, 119,1112-1126.
- Aiello, D., Carrieri, R., Guarnaccia, V., Vitale, A., Lahoz, E. and Polizzi, G., 2015. characterization and pathogenicity of *Colletotrichum gloeosporioides* and *C. karstii* causing preharvest disease on citrus sinensis in Italy. **Journal of Phytopathology**, 163, 168-177.
- Aktan, Z.C., ve Soylu, S., 2020. Diyarbakır ilinde yetiştirilen badem ağaçlarından endofit ve epifit bakteri türlerinin izolasyonu ve bitki gelişimini teşvik eden mekanizmalarının karakterizasyonu. **KSU Tarım ve Doğa Dergisi**, 23, 641-654.
- Al-Sadi, A.M., Al-Ghaithi, A.G., Al-Fahdi, N. and Al-Yahyai, R., 2014. Characterization and pathogenicity of fungal pathogens associated with root diseases of citrusin Oman. **International Journal of Agriculture and Biology**, 16, 371–376.
- Alvindia, D.G., Natsuaki, K.T., 2009. Biocontrol activities of *Bacillus amyloliquefaciens* DGA14 isolated from banana fruit surface against banana crown rot-causing pathogens. **Crop Protection**, 28, 236-242.
- Amarean, N., Jayakumar, V. and Thajuddin, N., 2014. Isolation and characterization of endophytic bacteria associated with chilli (*Capsicum annuum*) grown in coastal agricultural ecosystem. **Indian Journal of Biotechnology**, 13, 247-255.
- An-Dong, G., He-Ping, L., Qing-Song, Y., Xiu-Shi, S., Wei, Y., WeiJie, H., Jing-Bo, Z. and Yu-Cai, L., 2015. Antagonistic mechanism of Iturin A and Plipastatin A from *Bacillus amyloliquefaciens* S76-3 from wheat spikes against *Fusarium graminearum*. **Plos One**, 10(2), e0116871.
- Arras, G., 1996. Mode of action of an isolate of *Candida famata* in biological control of *Penicillium digitatum* in orange fruits. **Postharvest Biology and Technology**, 8, 191-198.
- Arrebola, E., Sivakumar, D., Bacigalupo, R., and Korsten, L., 2010. Combined application of antagonist *Bacillus amyloliquefaciens* and essential oils for the control of peach postharvest diseases. **Crop Protection**, 29, 369-377.
- Atay, M., 2019. Kurutmalık biber (*Capsicum annum* L.) meyvelerinde mikotoksin oluşturan bazı fungal etmenlerin gelişimi üzerine bitki uçucu yağ, isothiocyanate ve antagonist bakteri izolatlarının in vitro koşullarda antifungal etkilerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, **Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilim Dalı.**
- Ayon, C.B.C., Esquivel, G.L., Velasco, C.R., Virgen, O.E., Arangure, A.B. and Campos, O.J.C., 2020. In vitro evaluation of antagonists against soursop fruit pathogens (*Annona muricata* L.) in Nayarit, Mexico. **Revista Brasileira De Fruticultura**, 42, e-147.
- Baez-Vallejo, N., Camarena-Pozos, D.A., Monribot-Villanueva, J.L., Ramirez-Vazquez, M., Carrion-Villarnovo, G.L., Guerrero-Analco, J.A., Partida-Martinez, L.P. and Reverchon, F., 2020. Forest tree associated bacteria for potential biological control

- of *Fusarium solani* and of *Fusarium kuroshium*, causal agent of Fusarium dieback. **Microbiological Research**, 235, 126440.
- Bakthavatchalu, S., Shivakumar, S., Sulla, S.B., 2013. Molecular detection of antibiotic related genes from *Pseudomonas aeruginosa* FP6, an antagonist towards *Rhizoctonia solani* and *Colletotrichum gloeosporioides*. **Turkish Journal of Biology**, 37, 289-295.
- Barbe, S., Figas-Segura, A., Benada, M., Navarro-Herrero, I., Sampaio, T.M., Biosca, E.G. and Marco-Noales, E., 2022. Plant-associated microbiota as a source of antagonistic bacteria against the phytopathogen *Erwinia amylovora*. **Environmental Microbiology Reports**, 14(4), 559-569.
- Bazioli, J.M., Belinato, J.R., Costa, J.H., Akiyama, D.Y., Pontes, J.G.D., Kupper, K.C., Augusto, F., de Carvalho, J.E., Fill, T.P., 2019. Biological control of citrus postharvest phytopathogens. **Toxins**, 11, 460.
- Bernal, G., Illanes, A. and Ciampi, L., 2002. Isolation and partial purification of a metabolite from a mutant strain of *Bacillus* sp. with antibiotic activity against plant pathogenic agents. **Electronic Journal of Biotechnology**, (on line), 15 April 2002, 5. Available from <http://www.ejbiotechnology.info/content/vol5/issue1/full/4/>
- Bueno, C.J., Fischer I.H., Rosa, D.D., Firmino, A.C., Harakava, R., Oliveira, C.M.G. and Furtado, E.L., (2014). *Fusarium solani* f. sp. *passiflorae*: a new forma specialis causing collar rot in yellow passion fruit. **Plant Pathology**, 63, 382–389.
- Cappuccino, J.C. and Sherman, N., 2013. In: Microbiology: A Laboratory Manual, 3rd ed. Benjamin Cummings Pub. Co, New York, pp. 125-179.
- Castric, P.A., 1977. Glycine metabolism by *Pseudomonas aeruginosa*: hydrogen cyanide biosynthesis. **Journal of Bacteriology**, 130, 826-831.
- Chaisu, K., 2018. Biological control of post-harvest banana diseases using antagonistic bacteria in thailand. **2018 5th Ieee International Conference On Engineering Technologies and Applied Sciences (Ieee Ictetas)**.
- Chaves-Lopez, C., Serio, A., Ginotti, G., Sacchetti, G., Ndagijimana, M., Ciccarane, C., Stellarini, A., Corsetti, A. and Paparella, A., 2015. Diversity of food-borne *Bacillus* volatile compounds and influence on fungal growth. **Journal of Applied Microbiology**, 119, 487-499.
- Chen, K., Tian, Z., Luo, Y., Cheng, Y. and Long, C., 2018. Antagonistic activity and the mechanism of *Bacillus amyloliquefaciens* dh-4 against citrus green mold. **Phytopathology**, 108, 1253-1262.
- Chenniappan, C., Narayanasamy, M., Daniel, G.M., Ramaraj, G.B., Ponnusamy, P., Sekar, J., Ramalingam, P.V., 2019. Biocontrol efficiency of native plant growth promoting rhizobacteria against rhizome rot disease of turmeric. **Biological Control**, 129, 55-64.
- Cho, S.M., Kang, B.R., Han, S.H., Anderson, A.J., Park, J.Y., Lee, Y.H., Cho, B.H., Yang, K.Y., Ryu, C.M. and Kim, Y.C., 2008. 2R, 3R-butanediol, a bacterial volatile produced by *Pseudomonas chlororaphis* O6, is involved in induction of systemic tolerance to drought in *Arabidopsis thaliana*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, 21(8), 1067–1075.
- Choudhary, B., Nagpure, A. and Gupta, R.K., 2015. Biological control of toxigenic citrus and papaya-rotting fungi by *Streptomyces violascens* MT7 and its extracellular metabolites. **Journal of Basic Microbiology**, 55, 1343-1356.

- Dalal J., and Kulkarni N., 2013. Antagonistic and plant growth promoting potentials of indigenous endophytic bacteria of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill). **Current Research in Microbiology and Biotechnology**, 1, 62–69.
- Damasceno, C.L., Duarte, E.A.A., dos Santos, L.B.P.R., de Oliveira, T.A.S., de Jesus, F.N., de Oliveira, L.M., Goes-Neto, A., Soares, A.C.F., 2019. Postharvest biocontrol of anthracnose in bananas by endophytic and soil rhizosphere bacteria associated with sisal (*Agave sisalana*) in Brazil. **Biological Control**, 137, UNSP-104016.
- Daoud, H.B., Baraldi, E., Iotti, M., Leonardi, P. and Boughalleb-M'Hamdi, N., 2019. Characterization and pathogenicity of *Colletotrichum* spp. causing citrus anthracnose in Tunisia. **Phytopathologia Mediterranea**, 58, 175-185.
- De Costa, D.M., Zahra, A.R.F., Kalpage, M.D. and Rajapakse, E.M.G., 2008. Effectiveness and molecular characterization of *Burkholderia spinosa*, a prospective biocontrol agent for controlling postharvest diseases of banana. **Biological Control**, 47, 257-267.
- de los Santos-Villalobos, S., Barrera-Galicia, G.C., Miranda-Salcedo, M.A., and Pena-Cabriales, J.J., 2012. *Burkholderia cepacia* XXVI siderophore with biocontrol capacity against *Colletotrichum gloeosporioides*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, 28, 2615-2623.
- Dille, J.W., Rogers, C.M. and Schneegurt, M.A., 2016. Isolation and characterization of bacteria from the feathers of wild Dark-eyed Juncos (*Junco hyemalis*). **The Auk**, 133(2), 155–167.
- Dimkic, I., Janakiev, T., Petrovic, M., Degrassi, G. and Fira, D., 2022. Plant-associated *Bacillus* and *Pseudomonas* antimicrobial activities in plant disease suppression via biological control mechanisms-A review. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 117, 101754.
- dos Passos, J.F.M., da Costa, P.B., Costa, M.D., Zaffari, G.R., Nava, G., Boneti, J.I., de Oliveira, A.M.R. and Passaglia, L.M.P., 2014. Cultivable bacteria isolated from apple trees cultivated under different crop systems: diversity and antagonistic activity against *Colletotrichum gloeosporioides*. **Genetics and Molecular Biology**, 37, 560-572.
- Douanla-Meli, C. and Unger, J.G., 2017. Phylogenetic study of the *Colletotrichum* species on imported citrus fruits uncovers a low diversity and a new species in the *Colletotrichum gigasporum* complex. **Fungal Biology**, 121, 858-868.
- Ezrari, S., Mhidra, O., Radouane, N., Tahiri, A., Polizzi, G., Lazraq, A. and Lahlali, R., 2021. Potential role of rhizobacteria isolated from citrus rhizosphere for biological control of citrus dry root rot. **Plants-Basel**, 10, 872.
- FAOSTAT 2019 FAOSTAT, Word Production Data.
<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize> (Erişim Tarihi: 25.12.2020)
- Ferreira, F.V., Herrmann-Andrade, A.M., Calabrese, C.D., Bello, F., Vazquez, D. and Musumeci, M.A. 2020. Effectiveness of *Trichoderma* strains isolated from the rhizosphere of citrus tree to control *Alternaria alternata*, *Colletotrichum gloeosporioides* and *Penicillium digitatum* A21 resistant to pyrimethanil in post-harvest oranges (*Citrus sinensis* L. (Osbeck)). **Journal of Applied Microbiology**, 129, 712-727.
- Fravel, D.R., 2005. Commercialization and implementation of biocontrol. **Annual Review of Phytopathology**, 43, 337-359.

- Fu, G., Huang, S.L., Ye, Y.F., Wu, Y.G., Cen, Z.L. and Lin, S.H., 2010. Characterization of a bacterial biocontrol strain B106 and its efficacy in controlling banana leaf spot and post-harvest anthracnose diseases. **Biological Control**, 55, 1-10.
- Gamagae, S.U., Sivakumar, D., Wijeratnam, R.S.W. and Wijesundera, R.L.C., 2003. Use of sodium bicarbonate and *Candida oleophila* to control anthracnose in papaya during storage. **Crop Protection**, 22, 775-779.
- Gedik, M., 2019. Turunçgilde Derim Sonrası Ekşi Çürüklük Hastalığı Etmeni *Geotrichum citri-aurantii*’ ye Karşı Antagonist Bakteriler ve Bor Ürünlerinin Antifungal Etkileri. **Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü**, Bitki Koruma Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Hatay
- Ghazy, N. and El-Nahrawy, S., 2020. Siderophore production by *Bacillus subtilis* MF497446 and *Pseudomonas koreensis* MG209738 and their efficacy in controlling *Cephalosporium maydis* in maize plant. **Archives of Microbiology**, 203, 1195-1209.
- Glickman, E. and Y. Dessaux., 1995. A critical evaluation of the specificity of salkowski reagent for indole compounds produced by phytopathogenic bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, 61, 793–796.
- Guarnaccia, V., Groenewald, J.Z., Polizzi, G. and Crous, P.W., 2017. High species diversity in *Colletotrichum* associated with citrus diseases in Europe. **Persoonia**, 39, 32-50.
- Guerrero-Barajas, C., Constantino-Salinas, E.A., Amora-Lazcano, E., Tlalapango-Angeles, D., Mendoza-Figueroa, J.S., Cruz-Maya, J.A. and Jan-Roblero, J., 2020. *Bacillus mycoides* A1 and *Bacillus tequilensis* A3 inhibit the growth of a member of the phytopathogen *Colletotrichum gloeosporioides* species complex in avocado. **Journal of The Science of Food and Agriculture**, 100, 4049-4056.
- Gusain, Y.S., Kamal, R., Mehta, C.M., Singh, U.S. and Sharma, A.K. 2015. Phosphate solubilizing and indole-3-acetic acid producing bacteria from the soil of Garhwal Himalaya aimed to improve the growth of rice. **Journal of Environmental Biology**, 36, 301-307.
- Halfeld-Vieira, B.D., da Silva, W.L.M., Schurt, D.A., Ishida, A.K.N., de Souza, G.R. and Nechet, K.D., 2015. Understanding the mechanism of biological control of passionfruit bacterial blight promoted by autochthonous phylloplane bacteria. **Biological Control**, 80, 40-49.
- Han, S.H, Lee SJ, Moon JH, Park KH, Yang KY, Cho BH, Kim KY, Kim YW, Lee MC, Anderson AJ and Kim YC., 2006. GacS-dependent production of 2R, 3R-butanediol by *Pseudomonas chlororaphis* O6 is a major determinant for eliciting systemic resistance against *Erwinia carotovora* but not against *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* in tobacco. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, 19, 924–930.
- Hallmann, J., Quadts-Hallmann, A., Mahaffee, W.F. and Kloepper, J.W., 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, 43, 895-914.
- He, C.N., Ye, W.Q., Zhu, Y.Y. and Zhou, W.W., 2020. Antifungal activity of volatile organic compounds produced by *Bacillus methylotrophicus* and *Bacillus thuringiensis* against five common spoilage fungi on loquats. **Molecules**, 25, 3360.
- Hong, P., Hao, W.N., Luo, J.J., Chen, S.H., Hu, M.Y. and Zhong, G.H., 2014. Combination of hot water, *Bacillus amyloliquefaciens* HF-01 and sodium bicarbonate treatments to control postharvest decay of mandarin fruit. **Postharvest Biology and Technology**, 88, 96-102.

- Horuz, S. and Kınay, P., 2009. The effect of some new postharvest fungicides and combination of hot water with sodium bicarbonate against *Geotrichum citri-aurantii* on citrus. **ACTA Horticulturae**, 877, 1551-1555.
- Huang, C.J. and Chen, C.Y., 2004. Gene cloning and biochemical characterization of chitinase CH from *Bacillus cereus* 28-9. **Annals of Microbiology**, 54, 289-297.
- Huang, F., Chen, G.Q., Hou, X., Fu, Y.S., Cai, L., Hyde, K.D. and Li, H.Y., 2013. *Colletotrichum* species associated with cultivated citrus in China. **Fungal Diversity**, 61, 61-74.
- Huszcza, E. and Burczyk, B., 2006. Surfactin isoforms from *Bacillus coagulans*. **Zeitschrift für Naturforschung C**, 61, 727-733.
- Hyder, S., Gondal, A.S., Rizvi, Z.F., Ahmad, R., Alam, M.M., Hannan, A., Ahmed, W., Fatima, N. and Inam-ul-Haq, M. 2020. Characterization of native plant growth promoting rhizobacteria and their anti-oomycete potential against *Phytophthora capsici* affecting chilli pepper (*Capsicum annum* L.). **Scientific Reports**, 10, 13859.
- Janisiewicz, W.J. and Buyer, J.S., 2010. Culturable bacterial microflora associated with nectarine fruit and their potential for control of brown rot. **Canadian Journal Of Microbiology**, 56(6), 480-486.
- Janisiewicz, W.J., Jurick, W.M., Vico, I., Peter, K.A. and Buyer, J.S., 2013. Culturable bacteria from plum fruit surfaces and their potential for controlling brown rot after harvest. **Postharvest Biology and Technology**, 76, 145-151.
- Jayakumar, V., Bhaskaran, R. and Tsushima, S., 2007. Potential of plant extracts in combination with bacterial antagonist treatment as biocontrol agent of red rot of sugarcane. **Canadian Journal of Microbiology**, 53, 196-206.
- Kalai-Grami, L., Saidi, S., Bachkouel, S., Slimene, İ. B., Mnari-Hattab, M., Hajlaoui, M. R., and Limam, F., 2014. Isolation and characterization of putative endophytic bacteria antagonistic to *Phoma tracheiphila* and *Verticillium albo-atrum*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 174, 365-375.
- Kara, M. and Soylu, E.M., 2020. Assessment of glucosinolate-derived isothiocyanates as potential natural antifungal compounds against citrus sour rot disease agent *Geotrichum citri-aurantii*. **Journal of Plant Pathology**, 168 (5), 279-289
- Kara, M., Soylu, S., Turkmen, M. and Kaya, DA., 2020. Determination and antifungal activities of laurel and fennel essential oils against fungal disease agents of cypress seedlings. **Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi**, 17, 264-275.
- Katz, H., Bercovitz, A., Chalutz, E., Droby, S., Hofstein R. and Keren-Tzoor, M., 1995. Compatibility of ecogens biofungicide Aspire a yeast based preparation, with other commonly used for the control of postharvest decay of citrus. **Phytopathology**, 85, 1123.
- Kefialew, Y. and Ayalew, A., 2008. Postharvest biological control of anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) on mango (*Mangifera indica*). **Postharvest Biology and Technology**, 50, 8-11.
- Khalaf, E.M. and Raizada, M.N., 2018. Bacterial seed endophytes of domesticated cucurbits antagonize fungal and oomycete pathogens including powdery mildew. **Frontiers in Microbiology**, 9, 42.
- Kim, G.H., Lim, M.T., Hur, J.S., Yum, K.J. and Koh, Y.J., 2009. Biological control of tea anthracnose using an antagonistic bacterium of *Bacillus subtilis* isolated from tea leaves. **Plant Pathology Journal**, 25, 99-102.

- Kim, P.I., Bai, H., Bai, D., Chae, H., Chung, S., Kim, Y. and Chi, Y.T., 2004. Purification and characterization of a lipopeptide produced by *Bacillus thuringiensis* CMB26. **Journal of Applied Microbiology**, 97, 942-949.
- Koomen, I. and Jeffries, P., 1993. Effects of antagonistic microorganisms on the postharvest development of *Colletotrichum-gloeosporioides* on mango. **Plant Pathology**, 42, 230-237.
- Korsten, L., DeJager, E.S., Devilliers, E.E., Lourens, A., Kotze, J.M. and Wehner, F.C., 1995. Evaluation of bacterial epiphytes isolated from avocado leaf and fruit surfaces for biocontrol of avocado postharvest diseases. **Plant Disease**, 79, 1149-1156.
- Kucheryava, N., Fiss, R., Auling, G. and Kroppenstedt, R.M., 1999. Isolation and characterization of epiphytic bacteria from the phyllosphere of apple, antagonistic in vitro to *Venturia inaequalis*, the causal agent of apple scab. **Systematic And Applied Microbiology**, 22(3), 472-478.
- Kumar, P., Dubey, R.C. and Maheshwari, D.K., 2012. *Bacillus* strains isolated from rhizosphere showed plant growth promoting and antagonistic activity against phytopathogens. **Microbiological Research**, 167, 493-499.
- Kurt, Ş., Uysal, A., Soylu, E.M., Kara, M. and Soylu S., 2020. Characterization and pathogenicity of *Fusarium solani* associated with dry root rot of citrus in the eastern Mediterranean region of Turkey. **Journal of General Plant Pathology**, 86 (4), 326-332.
- Kurtzman, C.P., Robnett, C.J. and Basehoar-Powers, E., 2001. *Zygosaccharomyces kombuchaensis*, a new ascosporogenous yeast from Kombucha tea. **Yeast Research**, 1, 133-138.
- Ladania, M.S., 2008. **Citrus Fruit**. Academic Press. ISBN: 978-0-12-374130-1.
- Lelliot, R.A. and Stead, D.E., 1987. Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. (T.F. Preece, Editor). In: **Methods in Plant Pathology**, Black well Scientific Publications, Pp, 2, 176-177, Oxford.
- Leslie, J.F. and Summerell B.A., 2006. The *Fusarium* laboratory manual. **Blackwell Publishing, Ames, IA, USA**. 388p.
- Liu, X., Wang, L.P, Li, Y.C., Li, H.Y., Yu, T. and Zheng, X.D., 2009. Antifungal activity of thyme oil against *Geotrichum citri-aurantii* in vitro and in vivo. **Journal of Applied Microbiology** 107, 1450-1456.
- Liu, X., Fang, W., Liu, L., Yu, T., Lou, B. and Zheng, X., 2010. Biological control of postharvest sour rot of citrus by two antagonistic yeasts. **Letters in Applied Microbiology**, 51, 30-35.
- Lucon, C.M.M., Guzzo, S.D., De Jesus, C.O., Pascholati, S.F. and De Goes, A., 2010. Postharvest harpin or *Bacillus thuringiensis* treatments suppress citrus black spot in 'Valencia' oranges. **Crop Protection**, 29, 766-772.
- Marquez-Santacruz, H.A., Hernandez-Leon, R., Orozco-Mosqueda, M.C., VelazquezSepulveda, I. and Santoyo, G., 2010. Diversity of bacterial endophytes in roots of Mexican husk tomato plants (*Physalis ixocarpa*) and their detection in the rhizosphere. **Genetics and Molecular Research**, 9, 2372-2380.
- Mayorquin, J.S., Nouri, M.T., Peacock, B.B., Trouillas, F.P., Douhan, G.W., Kallsen, C. and Eskalen, A., 2019. Identification, pathogenicity, and spore trapping of *Colletotrichum karstii* associated with twig and shoot dieback in California. **Plant Disease**, 103, 1464-1473.

- McKay, A. H., Förster, H., and Adaskaveg, J. E. 2012. Efficacy and application strategies for propiconazole as a new postharvest fungicide for managing sour rot and green mold of citrus fruit. **Plant Disease**, 96, 235-242.
- Montiel, L.G.H., Rodriguez, R.Z., Angulo, C., Puente, E.O.R., Aguilar, E.E.Q. and Galicia, R., 2017. Marine yeasts and bacteria as biological control agents against anthracnose on mango. **Journal of Phytopathology**, 165, 833-840.
- Nandi, M., Selin, C., Brawerman, G., Fernando, W.G.D. and de Kievit, T., 2017. Hydrogen cyanide, which contributes to *Pseudomonas chlororaphis* strain PA23 biocontrol, is upregulated in the presence of glycine. **Biological Control**, 108, 47-54.
- O'Donnell, K., Ward, T.J., A.R.G. Robert, V., Crous, P.W., Geiser, D.M. and Kang, S., 2015. DNA sequence-based identification of *Fusarium*: Current status and future directions. **Phytoparasitica**, 43, 583-595
- Ortega-Morales, B.O., Ortega-Morales, F.N., Lara-Reyna, J., De la Rosa-Garcia, S.C., Martinez-Hernandez, A. and Montero-M, J., 2009. Antagonism of *Bacillus* spp. isolated from marine biofilms against terrestrial phytopathogenic fungi. **Marine Biotechnology**, 11,375-383.
- Patten, C.L. and Glick, B.R., 2002. Role of *Pseudomonas putida* indole acetic acid in development of the host plant root system. **Applied and Environmental Microbiology**, 68, 3795-3801.
- Peng, L.J., Yang, Y.L., Hyde, K.D., Bahkali, A.H. and Liu, Z.Y., 2012. *Colletotrichum* species on Citrus leaves in Guizhou and Yunnan provinces, China. **Cryptogamie Mycologie**, 33, 267-283.
- Perneel, M., Heyrman, J., Adiobo, A., De Maeyer, K., Raaijmakers, J. M., De Vos, P. and Höfte, M., 2007. Characterization of CMR5c and CMR12a, novel fluorescent *Pseudomonas* strains from the cocoyam rhizosphere with biocontrol activity. **Journal of Applied Microbiology**, 103,1007-1020.
- Popova A.A., Koksharova O.A., Lipasova V.A., Zaitseva J.V., Katkova-Zhukotskaya O.A., Eremina SI, Mironov A.S., Chernin L.S. and Khmel I.A., 2014. Inhibitory and toxic effects of volatiles emitted by strains of *Pseudomonas* and *Serratia* on growth and survival of selected microorganisms, *Caenorhabditis elegans*, and *Drosophila melanogaster*. **BioMed Research International**, 2014, 125704.
- Raio, A. and Puopolo, G., 2021. *Pseudomonas chlororaphis* metabolites as biocontrol promoters of plant health and improved crop yield. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 37(6), 99.
- Raio, A., Brilli, F., Baraldi, R., Neri, L. and Puopolo, G., 2020. Impact of spontaneous mutations on physiological traits and biocontrol activity of *Pseudomonas chlororaphis* M71. **Microbiological Research**, 239,126517.
- Ramos, A.P., Talhinhos, P., Sreenivasaprasad, S. and Oliveira, H., 2016. Characterization of *Colletotrichum gloeosporioides*, as the main causal agent of citrus anthracnose, and *C-karstii* as species preferentially associated with lemon twig dieback in Portugal. **Phytoparasitica**, 44, 549-561.
- Reyes-Estebanez, M., Sanmartin, P., Camacho-Chab, J.C., De la Rosa-Garcia, S.C., Chan-Bacab, M.J., Aguila-Ramirez, R.N., Carrillo-Villanueva, F., De la Rosa-Escalante, E., Arteaga-Garma, J.L., Serrano, M. and Ortega-Morales, B.O., 2020. Characterization of a native *Bacillus velezensis*-like strain for the potential biocontrol of tropical fruit pathogens. **Biological Control**, 141, 104127.

- Reyes-Perez, J.J., Hernandez-Montiel, L.G., Vero, S., Noa-Carrazana, J.C., Quiñones-Aguilar, E.E., Rincón-Enríquez, G., 2019. Postharvest biocontrol of *Colletotrichum gloeosporioides* on mango using the marine bacterium *Stenotrophomonas rhizophila* and its possible mechanisms of action. **Journal of Food Science and Technology-Mysore**, 56, 4992-4999.
- Rezamahalleh, H.M., Khodakaramian, G. and Hassanzadeh, N., 2019. Diversity of Endophytic and Epiphytic Bacteria From Sugarcane in Khuzestan, Iran. **Brazilian Archives Of Biology and Technology**, 62, e19180407.
- Riera, N., Handique, U., Zhang, Y.Z., Dewdney, M.M. and Wang, N.A., 2017. Characterization of antimicrobial-producing beneficial bacteria isolated from huanglongbing escape citrus trees. **Frontiers in Microbiology**, 8, 2415.
- Roberts, R.G., 1990. Postharvest biological control of gray mold of apple by *Cryptococcus laurentii*. **Phytopathology**, 80, 526-530.
- Rokhbakhsh-Zamin F., Sachdev D., Kazemi-Pour, N., Engineer, A., Pardesi, K.R., Zinjarde, S.S., Dhakephalkar, P.K., and Chopade B.A., 2011. Characterization of plant-growth-promoting traits of *Acinetobacter* species isolated from rhizosphere of *Pennisetum glaucum*. **Journal of Microbiology Biotechnology**, 21, 556-566.
- Romero, F. M., Marina, M. and Pieckenstain, F.L., 2014. The communities of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) leaf endophytic bacteria, analyzed by 16S-ribosomal RNA gene pyrosequencing. **FEMS Microbiology Letters**, 351, 187-194.
- Rosenbluet, M. and Martinez-Romero, E., 2006. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. **Molecular Plant-Microbe Interact**, 19, 827–837.
- Santoyo, G., Moreno-Hagelsieb, G., Orozco-Mosqueda, M.C. and Glick, B.R., 2016. Plant growth-promoting bacterial endophytes. **Microbiological Research**, 183: 92-99.
- Sawant, I.S., Wadkar, P.N., Rajguru, Y.R., Mhaske, N.H., Salunkhe, V.P., Sawant, S.D. and Upadhyay, A., 2016. Biocontrol potential of two novel grapevine associated *Bacillus* strains for management of anthracnose disease caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. **Biocontrol Science and Technology**, 26, 964-979.
- Schwyn, B. and Neilands, J.B., 1987. Universal chemical assay for detection and determination of siderophores. **Analytical Biochemistry**, 160, 47-56.
- Shahid, I., Rizwan, M., Baig, D.N., Saleem, R.S., Malik, K.A., and Mehnaz, S., 2017. Secondary metabolites production and plant growth promotion by *Pseudomonas chlororaphis* and *P. aurantiaca* strains isolated from cactus, cotton, and para grass. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, 27, 480-491.
- Shi, Y., Yang, H., Zhang, T., Sun, J., and Lou, K., 2014. Illumina-based analysis of endophytic bacterial diversity and space-time dynamics in sugar beet on the 96 north slope of Tianshan mountain. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 98, 6375-6385.
- Shivas, R.G., Tan, Y.P., Edwards, J., Dinh, Q., Maxwell, A., Andjic, V., Liberato, J.R., Anderson, C., Beasley, D.R., Bransgrove, K. 2016. *Colletotrichum* Species in Australia. Australas. **Plant Pathology**, 45, 447–464.
- Soliman, K. M., and Badeaa, R. I. 2002. Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. **Food and Chemical Toxicology**, 40(11):1669-1675.
- Soto, F., Tramon, C., Aqueveque, P. and de Bruijn, J., 2018. Antagonist microorganisms that inhibit the development of post-harvest pathogens in lemons (*Citrus limon* L.). **Chilean Journal of Agricultural & Animal Sciences**, 34, 173-184.

- Soylu, E.M., Soylu, S., Kara, M., Kurt, Ş. (2020). Sebzelerde sorun olan önemli bitki fungal hastalık etmenlerine karşı vermikomposttan izole edilen mikrobiyomların *in vitro* antagonistik etkilerinin belirlenmesi. **KSU Tarım ve Doğa Dergisi**, 23, 7-18.
- Soylu, S., Kara, M., Soylu, E.M., Uysal, A., ve Kurt, Ş., 2022. *Geotrichum citri-aurantii*'nin sebep olduğu turunçgil ekşi çürüklük hastalığının biyolojik mücadelesinde endofit bakterilerin biyokontrol potansiyellerinin belirlenmesi. **Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi**, 19, 177-191.
- Soylu, S., Kara, M., Soylu E.M., Uysal, A. and Kurt, Ş. 2021. Determination of biocontrol potentials of endophytic bacteria in biological control of citrus sour rot disease caused by *Geotrichum citri-aurantii*. **Journal of Tekirdag Agricultural Faculty**, 19(1),177-191.
- Spina, S., Coco, V., Gentile, A., Catara, A. and Cirvilleri, G., 2008. Association of *Fusarium solani* with rolabc and wild type troyer citrange. **Journal of Plant Pathology**, 90 (3), 479-486.
- Stirling, A.M., Pegg, K.G. and Hayward, A.C., 1998. Interaction of *Colletotrichum gloeosporioides*, epiphytic microorganisms and nutrients on avocado leaves and fruit. **Australasian Plant Pathology**, 27, 169-179.
- Sturz, A.V., Christie, B.R. and Nowak, J., 2000. Bacterial endophytes, potential role in developing sustainable systems of crop production. **Critical Reviews in Plant Sciences**, 19, 1-30.
- Sun, T., Simon, P.W. and Tanumihardjo, S.A., 2009. Antioxidant phytochemicals and antioxidant capacity of biofortified carrots (*Daucus carota* L.) of various colors. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 57, 4142–4147.
- Sülü, S.M., Bozkurt, İ.A., Soylu, S. (2016). Bitki büyüme düzenleyici ve biyolojik mücadele etmeni olarak bakteriyel endofitler. **Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi** 21 (1), 103-111.
- Tagele, S.B., Lee, H.G., Kim, S.W. and Lee, Y.S., 2019. Phenazine and 1-undecene producing *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* strain knu17pc1 for growth promotion and disease suppression in korean maize cultivars. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, 29, 66-78.
- Tariq, M., Khan, A., Asif, M., Khan, F., Ansari, T., Shariq, M. and Siddiqui, M.A. 2020. Biological control: a sustainable and practical approach for plant disease management. **Acta Agriculturae Scandinavica Section B-Soil and Plant Science**, 70, 507-524.
- Tian, D. D., Zhou, W., Li, C. S., Wei, D., Qin, L. Y., Huang, S. M., Wei, L.P., Long, S. F., He, Z. F., and Wei, S. L. 2020. Isolation and identification of lipopeptide antibiotic produced by *Bacillus amyloliquefaciens* GKT04 antagonistic to banana *Fusarium* Wilt. **Journal of South China Agricultural University**, 51, 1122–1127.
- Tolosa-Moreno, D.L., Lizarazo-Forero, L.M. and Uribe-Velez, D., 2020. Antagonist capacity of bacteria isolated from cape gooseberry cultures (*Physalis peruviana* L.) for biological control of *Fusarium oxysporum*. **Tropical Plant Pathology**, 45, 1-12.
- Tuxbury, K.A., Shaw, G.C., Montali, R.J., Clayton, L.A., Kwiatkowski, N.P., Dykstra, M.J. and Mankowski, J.L., 2014. *Fusarium solani* species complex associated with carapace lesions and branchitis in captive American horseshoe crabs *Limulus polyphemus*. **Diseases of Aquatic Organisms**, 109, 223–230.
- TÜİK, 2021. Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK), Bitkisel Üretim İstatistikleri, <https://biruni.tuik.gov.tr/medas/?kn=92&locale=tr>. (Erişim Tarihi:15.07.2021).

- Uysal, A., Kurt, Ş. and Akgül, D.S., 2016. Akdeniz Bölgesi limon bahçelerinde antraknoz hastalığına neden olan *Colletotrichum gloeosporioides*' in patojenik ve moleküler karakterizasyonu. **Uluslararası Katılımlı Türkiye VI. Bitki Koruma Kongresi**, 5-8 Eylül, Konya, s. 597.
- Uysal, A. and Kurt, Ş., 2019. First report of *Colletotrichum karstii* causing anthracnose on citrus in the Mediterranean region of Turkey. **Journal of Plant Pathology**, 101, 753-753.
- Uysal, A. and Kurt, Ş., 2019a. First report of *Colletotrichum karstii* causing anthracnose on citrus in the Mediterranean region of Turkey. **Journal of Plant Pathology**, 101, 753.
- Uysal, O. and Polatöz, S. 2017. Dünyada ve Türkiye'de turunçgil üretimi ve dış ticareti. **Türkiye Tohumcular Birliği Dergisi**, 6 (22), 4-9.
- Vazquez, P., Holguin, G., Puente, M.E., Lopez-Cortes, A. and Bashan, Y., 2000. Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. **Biology and Fertility of Soils**, 30, 460-468.
- Yang, M.M., Xu, L.P., Xue, Q.Y., Yang, J.H., Xu, Q., Liu, H.X. and Guo, J.H., 2012. Screening potential bacterial biocontrol agents towards *Phytophthora capsici* in pepper. **European Journal of Plant Pathology**, 134(4), 811-820.
- Yaseen, T. and D'Onghia, A.M., 2012. *Fusarium* spp. associated to citrus dry root rot: an emerging issue for Mediterranean citriculture. **ISHS Acta Horticulturae**, 940, 647-655.
- Yoshida, S., Hiradate, S., Tsukamoto, T., Hatakeda, K. and Shirata, A., 2001. Antimicrobial activity of culture filtrate of *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2 isolated from mulberry leaves. **Phytopathology**, 91, 181-187.
- Yoshida, S., Shirata, A. and Hiradate, S., 2002. Ecological characteristics and biological control of mulberry anthracnose. **Jarq-Japan Agricultural Research Quarterly**, 36, 89-95.
- Zhang, Y., Li, T., Liu, Y., Li, X., Zhang, C., Feng, Z., Peng, X., Li, Z., Qin, S. and Xing, K., 2019. Volatile organic compounds produced by *Pseudomonas chlororaphis* subsp. aureofaciens SPS-41 as biological fumigants to control *Ceratocystis fimbriata* in postharvest sweet potatoes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 67(13), 3702-3710.
- Zhou, H.E., Tao, N.G. and Jia, L., 2014. Antifungal activity of citral, octanal and α -terpineol against *Geotrichum citri-aurantii*. **Food Control** 37, 277-283.
- Zivkovic, S., Stojanovic, S., Ivanovic, Z., Gavrilovic, V., Popovic, T. and Balaz, J., 2010. Screening of antagonistic activity of microorganisms against *Colletotrichum acutatum* and *Colletotrichum gloeosporioides*. **Archives of Biological Sciences**, 62, 611-623.
- Wang, W., de Silva, D.D., Moslemi, A., Edwards, J., Ades, P.K., Crous, P.W. and Taylor, P.W.J. 2021. *Colletotrichum* Species Causing Anthracnose of Citrus in Australia. **Journal of Fungi**, 7, 47.
- Wisniewski, M.E., Biles, C. and Droby, S., 1990. The use of the yeast *Pichia guilliermondii* as a biocontrol agent: characterization of attachment to *Botrytis cinerea*. **Biological Control of Postharvest Diseases of Fruit and Vegetables Workshop Proceedings, Shepherdstown, West Winginia**, Sept. 12-14, pp: 167-
- Xu, W.F., Wang, F., Zhang, M., Ou, T., Wang, R.L., Strobel, G., Xiang, Z.H., Zhou, Z.Y. and Xie, J., 2019. Diversity of cultivable endophytic bacteria in mulberry and their

potential for antimicrobial and plant growth-promoting activities. **Microbiological Research**, 229, 126328.



EKLER

Bakteri ve Fungal etmenlerin geliştirilmesinde kullanılan besi yerleri ve içerikleri

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

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

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

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

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

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

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

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

Patates Dekstroza Agar (PDA) (Merck, Darmstadt, Germany. Katalog No:110130)

Potato infusion	4 g/L (infusion 200 gr potato)
D(+)-glucose	20 g/l
Agar-Agar	15 g/l