



T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SERT KABUKLU MEYVE AĞAÇLARINDA SORUN OLAN
BOTRYOSPHERA GERİYE ÖLÜM HASTALIK ETMENLERİNE
KARŞI ENDOFİT VE EPİFİT BAKTERİYEL İZOLATLARIN *in vitro*
BİYOKONTROL ETKİNLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

NUDEM KUŞTOĞAN

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

HATAY
EYLÜL-2022



T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SERT KABUKLU MEYVE AĞAÇLARINDA SORUN OLAN
BOTRYOSPHERA GERİYE ÖLÜM HASTALIK ETMENLERİNE KARŞI
ENDOFİT VE EPIFİT BAKTERİYEL İZOLATLARIN *in vitro*
BİYOKONTROL ETKİNLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

Nudem KUŞTOĞAN
ORCID:0000-0002-9140-6174

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Danışman
Prof. Dr. Soner SOYLU
ORCID:0000-0003-1002-8958

HATAY
EYLÜL-2022

08/09/2022

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.

Nudem KUŞTOĞAN

ÖZET

SERT KABUKLU MEYVE AĞAÇLARINDA SORUN OLAN BOTRYOSPHERIA GERİYE ÖLÜM HASTALIK ETMENLERİNE KARŞI ENDOFİT VE EPIFİT BAKTERİYEL İZOLATLARIN *in vitro* BİYOKONTROL ETKİNLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

İnsanların sağlıklı beslenme konusunda bilinçlenmesinin bir sonucu olarak günümüzde sert kabuklu meyvelere olan ilgi giderek artmaktadır. Ülkemizde ekonomik öneme sahip yetiştiriciliği yapılan sert kabuklu meyvelerin başında Antep fıstığı (*Pistacia vera* L.), ceviz (*Juglans regia* L.), fındık (*Corylus avellana* L.) ve badem (*Prunus dulcis* L.) gelmektedir. Son yıllarda ülkemizde yetiştiriciliği yapılan ceviz, badem, fındık ve Antep fıstığı ağaçlarında geriye doğru ölüm, gövde, dal ve yapraklarda kurumalar şeklinde hastalık belirtilerine *Botryosphaeria*, *Cytospora*, *Diplodia*, *Lasiodiplodia*, *Neofusicoccum* ve *Phomopsis* cinslerine ait fungal etmenlerin neden olduğu bildirilmiştir. Sert kabuklu meyvelerde sorun olan bu etmenler konusunda çok sınırlı veri bulunduğundan, söz konusu hastalık etmenlere yönelik çalışmalara rastlanılmamıştır. Bu çalışmada, (i) ceviz, badem, Antep fıstığı ve fındık gibi farklı türlere ait sağlıklı sert kabuklu meyve ağaçlarının farklı bitki kısımlarından elde edilen endofit ve epifit bakteri izolatların izolasyonu, (ii) tanımlanması, (iii) bu ağaçlarda sorun olan *Botryosphaeria* geriye ölüm hastalık etmenlerinden *Botryosphaeria dothidea*, *Neofusicoccum parvum* ve *Neoscytalidium dimidiatum* hastalık etmenlerine karşı *in vitro* biyokontrol etkinlikleri, (iv) etkinlikte rol oynayan olası antagonistik ve bitki gelişimini teşvik eden (PGP) etki mekanizmaların karakterize edilmesi amaçlanmıştır. Sağlıklı ağaçların rizosfer ve endosfer bölgelerinden toplam 74 izolat elde edilmiş olup, bu izolatlar arasından seçilmiş 48 bakteri izolatı MALDI-TOF MS ile teşhisi edilmiş ve fungal etmenlere karşı antagonistik etkinlikleri karakterize edilmiştir. *In vitro* ikili kültür testlerinde fungal hastalık etmeni *Neoscytalidium dimidiatum*'un misel gelişimini *Pseudomonas chlororaphis* NKA10ep, *Botryosphaeria dothidea* ve *Neofusicoccum parvum*'un misel gelişimini ise *Bacillus mojavensis* NKA7en izolatları %80-84 gibi yüksek oranlarda engelleyen izolatlar olarak belirlenmişlerdir. Test edilen bakteri izolatları siderofor, proteaz, hidrojen siyanür [HCN], amonyak üretimi gibi antagonistik, indol asetik asit [IAA] ve fosfor çözme gibi bitki gelişimini teşvik eden (PGP) mekanizmalar bakımından istatistiksel olarak oldukça farklılıklar göstermiştir. Seçilerek test edilen 43 bakteri izolatın, 43 tanesi siderofor, 35 tanesi amonyak, 28 tanesi proteaz, 4 tanesi ise HCN üretiminde pozitif olarak kayıt edilmiştir. Siderofor, proteaz ve amonyak üretiminin misel gelişimin engellenmesinde (antagonizm) rol oynayan faktörler olabileceği düşünülmektedir. Test edilen tüm bakteriler değişen oranlarda IAA üretmiş olup, 17 izolat fosforu çözebilme yeteneğinde olduğu belirlenmiştir. İzolatlar arasında *Pseudomonas aeruginosa* NKC2ep ve *Acinetobacter dijkschoorniae* NKA8en en fazla IAA üreten ve fosforu çözen izolatlar olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak güçlü antagonistik (siderofor, proteaz, HCN, amonyak üretimi) ve PGP (IAA ve fosfor çözme) etkinlikleri gösteren, özellikle *Bacillus* spp. ve *Pseudomonas* spp. ait izolatların geriye doğru ölümlere neden olan *Botryosphaeria dothidea*, *Neofusicoccum parvum* ve *Neoscytalidium dimidiatum* hastalık etmenleri ile mücadelede biyokontrol ajanı olarak geliştirilebilme potansiyeline sahip olduğu belirlenmiştir. Bu çalışma antagonist bakteri türlerinin sert kabuklu meyve ağaçlarında sorun olan bazı geriye doğru ölüm hastalık etmenlerine karşı biyokontrol etkinliğinin ve etki mekanizmalarının araştırıldığı ilk çalışma niteliğindedir.

2022, 88 sayfa

Anahtar kelimeler: Sert kabuklu meyveler, *Botryosphaeria dothidea*, *Neofusicoccum parvum*, *Neoscytalidium dimidiatum*, Biyolojik mücadele

ABSTRACT

DETERMINATION of *in vitro* BIOCONTROL EFFICIENCIES of ENDOPHYTIC and EPIPHYTIC BACTERIAL AGENTS AGAINST BOTRYOSPHAERIA DIEBACK DISEASE AGENTS on NUT TREES

As a result of the awareness of people about healthy nutrition, the interest in nut fruits is increasing day by day. Pistachio (*Pistacia vera* L.), walnut (*Juglans regia* L.), hazelnut (*Corylus avellana* L.) and almond (*Prunus dulcis* L.) are the leading fruits that are cultivated with economic importance in our country. Very recently, fungal disease agents, belonging to *Botryosphaeria*, *Cytospora*, *Diplodia*, *Lasiodiplodia*, *Neofusicoccum* and *Phomopsis*, have been reported to cause symptoms of disease in the form of dieback, dryness of stems, branches and leaves in walnut, almond, pistachio and hazelnut trees in different region of our country. Since, there are very limited information available on the disease factors on walnut, almond, pistachio and hazelnut trees, studies on disease control is not currently available. Therefore, this study aimed for (i) isolation and (ii) identification of endophytic and epiphytic bacterial isolates from different healthy nut trees such as walnut, almond, pistachio and hazelnut and (iii) characterize *in vitro* biocontrol activities and (iv) possible antagonistic and plant growth promoting (PGP) mechanisms that play a role against *Botryosphaeria dothidea*, *Neofusicoccum parvum* and *Neoscytalidium dimidiatum* disease agents. A total of 74 bacterial isolates were obtained from the rhizosphere and endosphere of healthy trees, 48 of these isolates were identified by MALDI-TOF MS analysis and selected for antagonistic potential against fungal isolates. In dual culture assay, *Pseudomonas chlororaphis* NKA10ep and *Bacillus mojavensis* NKA7en isolates were found as the most effective antagonistic bacterial isolates inhibiting mycelial growth of *Neoscytalidium dimidiatum*, *Botryosphaeria dothidea* and *Neofusicoccum parvum* by 80-84%. Bacterial isolates significantly varied in the production of siderophore, protease, hydrogen cyanide [HCN], ammonia, indole acetic acid [IAA], phosphate solubilization. Among the tested 43 bacterial isolates, 43 were positive for siderophore production, 35 for ammonium production, 28 for protease and 4 for HCN production. The production of siderophore, protease and ammonium by these isolates may be the contributing factor(s) for their antagonistic properties against the suppression of the mycelial growth. All selected bacterial isolates produced IAA in a relatively varying amounts but 17 isolates solubilized the phosphate. Among the isolates, *Pseudomonas aeruginosa* NKC2ep and *Acinetobacter dijkschoorniae* NKA8en produced a relatively large amount of extracellular IAA and solubilised phosphate. In conclusion, the strong antagonistic (siderophore, protease, ammonium production) and PGP traits (IAA and phosphate solubilization potentials) displayed by effective isolates belonging to *Bacillus* spp and *Pseudomonas* spp. may be considered a good alternative as a biocontrol agent and have the potential to be developed as biological control agent for suppressing dieback plant pathogens tested in this study. This is the first study to investigate the biocontrol effect and mode of action of some of the antagonist bacterial species on dieback fungal disease agents of nuts tested in the present study.

2022, 88 pages

Keywords: Nuts, *Botryosphaeria dothidea*, *Neofusicoccum parvum*, *Neoscytalidium dimidiatum*, Biological control

TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesi, planlanması, yürütülmesi, laboratuvar çalışmaları ve 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. Soner SOYLU'ya, bölümde yer alan deneyimlerini paylaşan değerli hocalarım Prof. Dr. Şener KURT, Prof. Dr. E. Mine SOYLU'ya, tez çalışmalarım sırasında tüm bölüm imkânlarından yararlanmamı sağlayan HMKÜ Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölüm Başkanlığı'na, maddi destek veren HMKÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne (Proje No: 20.YL.025) ve lisansüstü eğitimimin tüm aşamalarında yardımcı olan FBE idari ve akademik kadrosuna teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca bakteri ve fungus izolatlarımın tanısında ve *in vitro* etkinliklerin belirlenmesi aşamasında yardımcı olan Ar. Gör. Dr. Merve KARA, Öğr. Gör. Dr. Aysun UYSAL, Ar. Gör. Yusuf GÜMÜŞ, Zir. Yük. Müh. Murat KARACA ve Zir. Müh. Mehmet KOÇ'a teşekkür ederim.

Beni her zaman en iyisini yapabileceğime inandıran, bu günlere gelmemi sağlayan, maddi manevi her türlü desteklerini esirgemeyen ailem ve kardeşlerim Eylül ve Murşide'ye en içten teşekkürlerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER	IV
ÇİZELGELER DİZİNİ	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VII
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	X
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	8
2.1. Hastalık Etmenlerinin Dünya ve Ülkemiz Genelindeki Durumu.....	8
2.2. Hastalık Etmenleri ile İlgili Yapılan Biyolojik Mücadele Çalışmaları	17
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	24
3.1. Materyal.....	24
3.1.1. Çalışmada Kullanılan Fungal ve Bakteriyel İzolatlar, Kimyasal, Alet ve Ekipmanlar	24
3.1.2. Çalışmada Kullanılan Besi Yerleri	24
3.2. Yöntem	25
3.2.1. Fungal Hastalık Etmenlerinin İzolasyonu ve Tanılanması.....	25
3.2.2. Aday Epifit ve Endofit Bakterilerin Sağlıklı Ağaçların Farklı Kısımlarından İzolasyonu ve Tanılanması.....	26
3.2.2.1. Aday Epifit ve Endofit Bakterilerin İzolasyonu.....	27
3.2.2.2. Aday Epifit ve Endofit Bakteri İzolatlarının Seçimi.....	28
3.2.2.3. Aday Epifit ve Endofit Bakteri İzolatlarının Tanılanması	30
3.2.3. Aday Epifit ve Endofit Bakteri İzolatlarının Fungal Hastalık Etmenlerine Karşı <i>in vitro</i> Antagonistik Etkinliğinin Değerlendirilmesi.....	31
3.2.4. Antagonist Epifit ve Endofit Bakteri İzolatlarının Fungal Etmenlerin Misel Gelişimini Engelleyen Bölgelerinin Fungisidal ve Fungistatik Özelliklerinin Belirlenmesi	32
3.2.5. Fungal Etmenlerin Misel Gelişimi Üzerine Epifit ve Endofit Bakteri İzolatlarının Uçucu Bileşenlerinin <i>in vitro</i> Antagonistik Etkinliğinin Belirlenmesi.....	32
3.2.6. Aday Epifit ve Endofit Bakteri İzolatlarının Hastalık Etmenlerini Engellemede Kullandıkları Olası Biyokontrol ve Bitki Gelişimini Teşvik Eden Mekanizmalarının Belirlenmesi	33
3.2.6.1. Aday Epifit ve Endofit Bakteri İzolatlarının Siderofor, Proteolitik, Hidrojen Siyanür (HCN) ve Amonyak (NH ₃) Üretme Potansiyellerinin Belirlenmesi	33
3.2.6.2. Aday Epifit ve Endofit Bakteri izolatlarının İndol Asetik Asit (IAA) Üretme ve Fosforu Çözme Potansiyellerinin Belirlenmesi	35
3.2.7. Deneme Deseni ve İstatistik Analizler	37
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA	38
4.1. Sağlıklı Sert Kabuklu Meyve Ağaçların Farklı Bitki Kısımlarından Aday Epifit ve Endofit Bakteri İzolatlarının İzolasyonu ve Tanılanması	38
4.2. Epifit ve Endofit Bakteri İzolatlarının Fungal Etmenlerin <i>in vitro</i> Misel Gelişiminin Engellenmesi üzerine Antagonistlik Etkinliklerinin Belirlenmesi	41

4.2.1. Epifit ve Endofit Bakteri İzolatlarının <i>Neoscytalidium dimidiatum</i> Misel Gelişiminin Engellenmesi üzerine <i>in vitro</i> Antagonistik Etkinliklerinin Belirlenmesi	42
4.2.2. Epifit ve Endofit Bakteri İzolatlarının <i>Neofusicoccum parvum</i> 'un Misel Gelişiminin Engellenmesi üzerine <i>in vitro</i> Antagonistik Etkinliklerinin Belirlenmesi	45
4.2.3. Epifit ve Endofit Bakteri İzolatlarının <i>Botryosphaeria dothidea</i> 'nın Misel Gelişiminin Engellenmesi üzerine <i>in vitro</i> Antagonistik Etkinliklerinin Belirlenmesi	47
4.3. Epifit ve Endofit Bakteri İzolatlarının Fungal Etmenlerin Misel Gelişiminin Engellenmesinden (Antagonistik) Sorumlu Olası Biyokontrol Etki Mekanizmalarının Belirlenmesi	55
4.4. Epifit ve Endofit Bakteri İzolatlarının Bitki Büyüme Gelişimini Teşvik Eden Mekanizmalarının Belirlenmesi	62
4.5. Antagonist Epifit ve Endofit Bakteri İzolatlarının Fungal Etmenlerin Misel Gelişimini Engelleyen Bölgelerinin Fungisidal ve Fungistatik Özelliklerinin Belirlenmesi	66
4.6. Antagonist Bakteri İzolatlarının Uçucu Bileşenlerinin Fungal Etmenlerin Misel Gelişimi Üzerine <i>in vitro</i> Antagonistik Etkinliğinin Belirlenmesi	67
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	75
KAYNAKLAR	78
ÖZGEÇMİŞ	87
EKLER	88

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. Farklı konukçu türlerinden izole edilen epifit ve endofit bakteri izolatların tanı sonuçları ve genel özellikleri.....	39
Çizelge 4.2. Farklı konukçulardan elde edilen endofit ve epifit antagonist bakteri izolatların <i>in vitro</i> ikili kültür testlerinde <i>Neoscytalidium dimidiatum</i> 'un misel gelişimini engelleme potansiyelleri	43
Çizelge 4.3. Farklı konukçulardan elde edilen endofit ve epifit antagonist bakteri izolatların <i>in vitro</i> ikili kültür testlerinde <i>Neofusicoccum parvum</i> 'un misel gelişimini engelleme potansiyelleri.....	46
Çizelge 4.4. Farklı konukçulardan elde edilen endofit ve epifit antagonist bakteri izolatların <i>in vitro</i> ikili kültür testlerinde <i>Botryosphaeria dothidea</i> 'nın misel gelişimini engelleme potansiyelleri.....	49
Çizelge 4.5. Antagonist bakteri izolatların test edildikleri fungal etmenlere karşı antagonistik etkinliklerinin karşılaştırılması	51
Çizelge 4.6. Farklı endofit ve epifit antagonist bakteri izolatların hastalık etmenlerini engellemede kullandıkları olası biyokontrol (antagonistik) mekanizmaları ^a	55
Çizelge 4.7. Farklı epifit ve endofit antagonist bakteri izolatların bitki büyümesini teşvik edilmesinde kullandıkları olası mekanizmalar.	64
Çizelge 4.8. Farklı antagonist bakteri izolatların uçucu bileşenlerinin <i>in vitro</i> ikili kültür testlerinde fungal etmenlerin misel gelişimi (mm)üzerine etkinliği	68
Çizelge 4.9. Farklı fungal hastalık etmenlerine karşı yüksek düzeyde antagonistik etkinlik gösteren endofit/epifit bakteri izolatların <i>in vitro</i> biyoetkinlik/bitki gelişimini teşvik edici mekanizmaları.....	74

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Dünya genelinde 2019 yılında en fazla sert kabuklu meyve üretimi (ton) yapan ülkeler (Anonymous, 2019).....	3
Şekil 1.2. (A-H) Ceviz ağaçlarının gövde ve dallarında <i>Botryosphaeria dothidea</i> ve <i>Neofusicoccum parvum</i> hastalık etmenleri tarafından neden olunan tipik sulanma, kahverengi akıntı, kabuğun dışı doğru kabarması ve dal kurumaları şeklinde ortaya çıkmış hastalık belirtileri (ok). (I-L) Antep fıstığı ağaçlarında dal ve gövdelerde <i>Neoscytalidium dimidiatum</i> tarafından neden olunan tipik yaprak ve dal kurumaları, gövde dokusundaki kararma belirtileri (ok)	5
Şekil 3.1. Hastalıklı ceviz gövdesinden (A) hastalık etmenin PDA besi yeri üzerine izolasyonu (B ve C). <i>Neoscytalidium dimidiatum</i> (D), <i>Neofusicoccum parvum</i> (E) ve <i>Botryosphaeria dothidea</i> (F) izolatların tek spor kültürleri .	26
Şekil 3.2. Sağlıklı Antep fıstığı, ceviz, badem gibi sert kabuklu meyve ağaçlarının kök, gövde, dal, yaprak ve meyvelerinden besi yeri üzerine epifit ve endofit bakteri izolatların izolasyonu	28
Şekil 3.3. (A ve B) Endofit ve epifit bakteri izolatlarla yapılan (A) tütün yaprağında aşırı duyarlılık testi. Enjekte edilen yerlerde (*) sadece patojen izolat HR reaksiyonuna (ok) neden olurken diğer izolatlar herhangi bir reaksiyona neden olmamıştır. (C) patates dilimleri üzerinde yumuşak çürüklük testi. İnokulasyon noktalarında (*) sadece patojen yumuşak çürüklük belirtisi (ok) oluşturmuştur.....	29
Şekil 3.4. (A) Epifit veya endofit bakteri izolatının (*) fungal hastalık etmenin misel gelişiminin ikili kültür testleri ile <i>in vitro</i> koşullarda engellenmesi (ok). (B) Kontrol petrisinde normal misel gelişimi.....	32
Şekil 3.5. Epifit ve endofit bakterilerin (A, B) siderofor, (C, D) proteaz enzimi (proteolitik), (E) hidrojen siyanür (HCN) ve (F) amonyak üretme potansiyellerinin belirlenmesi. Siderofor ve proteaz bileşiklerin indeks değerleri oluşan zon çapı (ok) büyüklüğünün bakteri koloni çapına (*) kıyaslanmak suretiyle kantitatif olarak hesaplanmıştır. HCN ve amonyak birikimi, petri kapağındaki filtre kağıdı (E) ile eppendorf içindeki besi yeri (D) renk değişim şiddetine göre kalitatif olarak belirlenmiştir	35
Şekil 3.6. Endofit ve epifit bakteri izolatları tarafından IAA üretme ve fosforu çözme potansiyellerinin belirlenmesi. (A) Farklı konsantrasyonlardaki IAA'nin besi yerinde oluşturduğu renk değişimi. (B) <i>Enterobacter cloacae</i> NKC8en tarafından üretilen IAA spektrumu (C ve D) Endofit ve epifit bakteri izolatları tarafından besi yerinde fosforu çözme potansiyellerinin belirlenmesi. fosforu çözme indeks değerleri zon çapı (ok) büyüklüğü bakteri koloni çapına (*) kıyaslanmak suretiyle kantitatif olarak hesaplanmıştır.....	37
Şekil 4.1. İkili kültür testlemeleri ile farklı türlere ait epifit ve endofit bakteri izolatlarının fungal etmen <i>Neoscytalidium dimidiatum</i> 'un misel gelişimini engelleme potansiyelleri.....	44
Şekil 4.2. İkili kültür testlemeleri ile farklı epifit ve endofit bakteri izolatlarının fungal etmen <i>Neofusicoccum parvum</i> 'un misel gelişimini engelleme potansiyelleri	46

Şekil 4.3. İkili kültür testlemeleri ile farklı epifit ve endofit bakteri izolatlarının fungal etmen <i>Botryosphaeria dothidea</i> 'nın misel gelişimini engelleme potansiyelleri	48
Şekil 4.4. Antagonist bakterilerin CAS Agar üzerinde siderofor üretme potansiyelleri. (A) Aynı petride farklı türlere ait bakteri izolatlar tarafından oluşturulan engelleme bölgeleri (ok). (B) <i>Pseudomonas chlororaphis</i> NKA10ep tarafından oluşturulan engelleme bölgesi.....	57
Şekil 4.5. (A ve B) Farklı antagonist bakteri izolatlarının SMLBA besi yerinde proteaz enzim üretme potansiyellerinin belirlenmesi. Bakteri izolatlarınca üretilen proteaz besi yeri üzerinde farklı çaplarda oluşturulan engelleme bölgeleri (ok) ile karakterize edilmiştir	59
Şekil 4.6. Farklı antagonist bakteri izolatlarının amonyak üretme potansiyellerinin belirlenmesi. Bakteri antagonist izolatlarınca besi yeri içerisinde oluşturulan amonyak üretimi tüplerdeki besi yeri renginin açık sarıdan koyu sarı-kahverengine (ok) dönüşmesiyle belirginleşmiştir	60
Şekil 4.7. Antagonist bakterilerin glycine içeren TSA besi yerinde hidrojen siyanür (HCN) üretme potansiyelleri. Bakteri izolatı tarafından artan şiddette üretilen HCN sonucu petri kapağındaki filtre kâğıdı kırmızı-turuncu renge (ok) dönüşmüştür.....	61
Şekil 4.8. Antagonist bakterilerin tryptophane içeren LB besi yerinde IAA üretme potansiyelleri. (A) Farklı bakteri izolatı tarafından üretilen IAA sonucu besi yerinin kırmızı-pembe renge dönüşmüştür. (B) Farklı türlere ait bakteri izolatları tarafından üretilen ve bitki büyümesini teşvik eden IAA konsantrasyonlarına bağlı renk (sarı renkten koyu kırmızı-pembe) değişimleri (ok)	63
Şekil 4.9. (A ve B) Farklı antagonist bakteri izolatlarının PVK besi yerinde fosforu çözebilme potansiyellerinin belirlenmesi. (A) Bazı izolatların fosforu çözemediği (ok) gözlenmiştir. (B) Bakteri izolatlarınca çözülen fosfor antagonist türüne bağlı olarak besi yeri üzerinde farklı çaplarda oluşturulan engelleme bölgeleri (ok) ile karakterize edilmiştir (ok).....	66
Şekil 4.10. Engelleme bölgesindeki bileşiklerin fungusidal etkinliğinin belirlenmesi. (a) Engelleme bölgesindeki (*) misel disklerinden gelişme görülmemesi bu bölgelerde üretilen bileşiklerin fungusidal etkinliğini göstermektedir. Engelleme bölgesine uzak yerden alınan diskin (b) yakın yerden alınan yapısal bozukluğun olduğu diskin misel gelişimine (c) kıyasla daha hızlı gelişme göstermiştir	67
Şekil 4.11. Farklı antagonist bakteri izolatlarının uçucu bileşenlerin <i>Botryosphaeria dothidea</i> (A) ve <i>Neofusicoccum parvum</i> (B) misel gelişimi üzerine antagonistik etkinlikleri.....	69
Şekil 4.12. <i>Pseudomonas chlororaphis</i> NKA10ep izolatının uçucu bileşenlerin <i>Botryosphaeria dothidea</i> misel gelişiminin engellenmesi (ok) üzerine antagonistik etkinlikleri.....	69
Şekil 4.13. Antagonist bakteri izolatlarının engelleme bölgesine yakın noktalardaki (daire içinde gösterilen) fungal etmenlerden <i>Neoscytalidium dimidiatum</i> (A-C) ve <i>Neofusicoccum parvum</i> (D) hifleri üzerinde neden oldukları morfolojik deformasyonlar. (A) Kontrol petrilerinde gelişen kalın duvarlı sağlıklı fungus hifleri. (B) <i>Pseudomonas chlororaphis</i> NKA10ep izolatı tarafından neden olunan hiflerde beyaz topaklaşma, (C ve D) <i>B. mojavensis</i>	

- NKP7en* ve *Bacillus pumilus* NKC3en izolatları tarafından neden olunan hif uçlarında şeffaf ve kararmış erime belirtileri (daire içinde gösterilen) 70
- Şekil 4.14. Antagonist bakteri izolatlarının engelleme bölgesine yakın noktalardaki *Neoscytalidium dimidiatum* hifleri üzerinde neden oldukları morfolojik deformasyonlar. (A) Kontrol petrilerinde gelişen kalın duvarlı sağlıklı fungus hifleri. (B) *Bacillus pumilus* NKC3en izolatın tarafından neden olunan hiflerde boğumlaşma (ok) ve hif uçlarında kısıalma belirtileri. (C) *B. mojavensis* *NKP7en* izolatı tarafından neden olunan sitoplazmik pıhtılaşma (ok) ve hiflerden sitoplazmik içeriğin hücre dışına boşalma belirtileri 72
- Şekil 4.15. Antagonist bakteri izolatlarının engelleme bölgesine yakın noktalardaki *Neofusicoccum parvum* hifleri üzerinde neden oldukları morfolojik deformasyonlar. (A) Kontrol petrilerinde gelişen kalın duvarlı sağlıklı fungus hifleri. (B) *Bacillus pumilus* NKC3en izolatın tarafından neden olunan hiflerde boğumlaşma (ok), hif uçlarında kısıalma ve sitoplazmik içeriğin pıhtılaşması şeklinde neden olduğu belirtileri. (C) *B. mojavensis* *NKP2ep* izolatı tarafından neden olunan sitoplazmik pıhtılaşma (ok) ve hiflerden sitoplazmik içeriğin hücre dışına boşalma belirtileri 73

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

SİMGELER

°C	: Derece Celsius
Ha	: hektar
Da	: dekar
µg	: mikrogram
mg	: miligram
G	: gram
Kg	: kilogram
mL	: mililitre
µm	: mikrometre
min	: Dakika
ppm	: part per million (milyon birimde bir birim)
rpm	: rotation per minute (dakikadaki dönme sayısı)

KISALTMALAR

TÜİK	: T ürkiye İ statistik K urumu
FAO	: Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (F ood and A griculture O rganisation of The United Nations)
PW	: P epton W ater
UV	: U ltraviyole
HCN	: H ydrogen C yanide (Hidrojen Siyanür)
CAS	: C hrom A zurol- S A gar Besi yeri
SMLBA	: S M L uria B roth A gar Besi yeri
NH ₃	: Amonyak
KB	: K ing's B A gar Besi yeri
LB	: L uria B ertani A gar Besi yeri
NA	: N utrient A gar Besi yeri
PDA	: P atates D ekstroz A gar Besi yeri
TSA	: T rypic S oybean A gar Besi Yeri
HR	: H ypersensitive T est (Tütün aşırı duyarlık testi)
MALDI-TOF	: M atriks A ssisted L aser D esorption I onization T ime o f F light M ass S pectrometry
ITS	: I nternal T ranscribed S pacer
IAA	: I ndol A setik A sit
PVK	: P ikovskaya A gar Besi yeri
MG	: M ycelial G rowth (Misel Gelişimi)
MGI	: M ycelial G rowth I nhibition (Misel Gelişimin Engellenmesi)
rDNA	: R ibosomal D N
rRNA	: R ibosomal R N
PCR	: P olimeraz C hain R eaction
PGPB	: P lant G rowth P romoting B acteria (Bitki Gelişimini Teşvik eden Bakteri)
YEA	: Y east E xtract A gar (Maya Bazlı Agar)

VOC
SPSS

: **V**olatile **O**rganic **C**ompounds (Uçucu Organik Bileşikler)
: **S**tatistical **P**ackage for the **S**ocial **S**ciences



1. GİRİŞ

İnsanların sağlıklı beslenme konusunda bilinçlenmesinin bir sonucu olarak günümüzde sert kabuklu meyvelere olan ilgisi de giderek artmaktadır. Dünya’da sert çekirdekli (Nut) grubuna ait 10’dan fazla meyve türü, ekonomik anlamda yetiştirilmektedir. Ülkemizde ekonomik öneme sahip yetiştiriciliği yapılan sert kabuklu meyvelerin başında Antep fıstığı (*Pistacia vera* L.), ceviz (*Juglans regia* L.), fındık (*Corylus avellana* L.) ve badem (*Prunus dulcis* L.) gelmektedir.

Sakız ağacıgiller (Anacardiaceae) familyasından bir meyve türü olan Antep fıstığı ekonomik önemi nedeniyle Güneydoğu Anadolu Bölgesi’nde altın ağacı olarak adlandırılmaktadır (Özbek, 1978). Sulama yapılmadan taşlık kayalık alanlarda ve fakir topraklarda bile ekonomik anlamda yetiştirilebilen bu lezzetli ve besin değeri yüksek meyve “altın ağacı”, “yeşil altın” ve “meyvelerin kralı” ve “kralların meyvesi” olarak da tanınır (Ayfer, 1990). Odunsu bir ağaç türü olan Antep fıstığı, tohumları yüksek besin içeriğine ve ekonomik değere sahiptir. Özellikle proteinler ve esansiyel yağ asitleri açısından önemli bir besin kaynağıdır. Türkiye, Antep fıstığının başlıca gen merkezlerinden biri olup, Yakınoğu Gen Merkezi’nin içinde yer almaktadır. Türkiye Antep fıstığı yetiştiriciliği açısından ekolojik koşullara bağlı olarak, en verimli ürün alınabilen ülkeler arasında yer almaktadır (Ertürk ve ark., 2015; Aslan, 2019).

Ceviz (*Juglans regia* L.), botanikte Dicotyledoneae sınıfı Juglandales takımı, Juglandaceae familyası ve Juglans cinsinde yer alır. Juglans cinsi içerisinde günümüzde özellikleri belirlenen 18 türden en önemlisi ve üstün meyve kalitesi ile ceviz denildiğinde ilk akla gelen, “Anadolu cevizi”, “İran cevizi” ve “İngiliz cevizi” olarak da adlandırılan *J. regia*’dır. Siyah ceviz (*Juglans nigra*) ve İngiliz cevizi (*J. regia*), dünya genelinde en yaygın tarımı yapılan ceviz türleridir. Yabani formdaki ceviz türleri dünyanın birçok yerinde yayılma alanı bulmuştur. Ancak, cevizin anavatanı, bazı araştırmacılara göre İran’ın Ghilan Bölgesi, bazı araştırmacılara göre ise Çin’dir. Bunlara karşılık daha büyük bir çoğunluk ise cevizin anavatanı olarak çok daha geniş bir alanı göstermektedirler. Bunu savunan gruba göre ceviz Karpat dağlarından Türkiye, Irak, İran, Afganistan, Güney Rusya, Hindistan, Mançurya ve Kore’ye kadar uzanan geniş bir bölgenin doğal bitkisidir. Ceviz sağlık ve beslenme bakımından çok önemli bir meyve türüdür. Genel olarak cevizde %3.5 su, %15-30 protein, %55-77 yağ, %1.5-3 kül ve %5-15 oranında da

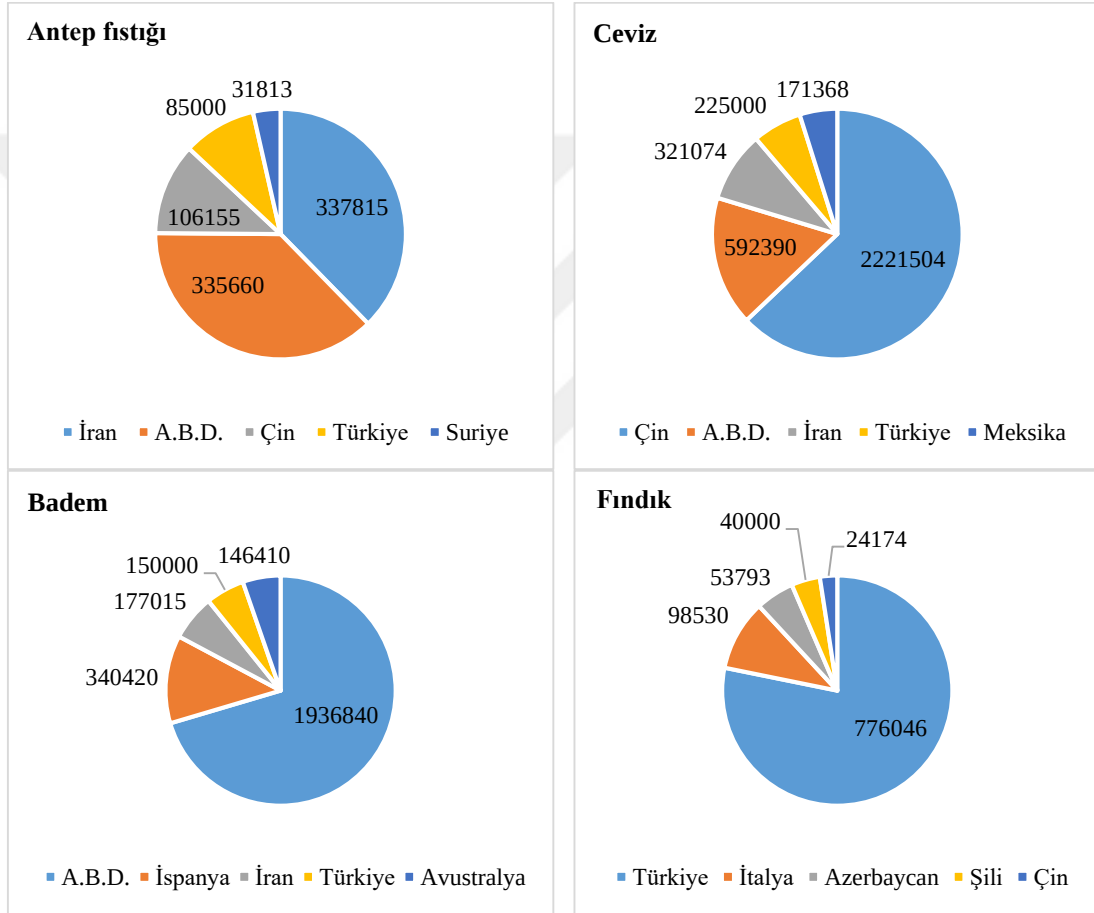
karbonhidrat (ağırlık selüloz) bulunmaktadır. Ayrıca cevizin meyvesi, Ca, P, Mg, Fe, Na, K gibi mineral maddeler bakımından zengin olduğu gibi A, B1, B2, B6, C vitaminlerini de içermektedir. 1 kg ceviz yaklaşık 7.000 kalori enerji sağlamaktadır. Ceviz çok değişik şekillerde tüketilmektedir. Çerez olarak, pasta ve bisküvi sanayinde, parfüm sanayinde, reçel, helva yapımında, boya, tane, plastik ve kauçuk endüstrisinde, yağ olarak, ilaç sanayinde, sucuk, samsa, pestil yapımında tüketilmektedir. Ayrıca kerestesinin son derece kıymetli olmasından dolayı da oymacılıkta bu yönde aranan materyallerin başında ceviz gelmektedir (Anonim, 2014).

Badem ülkemiz ekonomisinde önemli bir yere sahip, besin içeriği açısından sağlıklı bir diğer ürünümüzdür. Badem, tatlı badem (*Prunus amygdalus communis var. dulcis*) ve acı badem (*Prunus dulcis, var. amara*) olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Acı bademin uçucu yağı, iyi bir koku ve tat giderici olarak (balık yağına ilave edilir) ve dezenfektan olarak kullanılır. Acı bademin tohumları, badem şurubu hazırlanmasında, kremlerde ve halk arasında boğaz ağrılarına karşı kullanılmaktadır. Tatlı badem tohumları ise genellikle kuruyemiş olarak tüketilmekle birlikte badem yağı elde edilmektedir. Badem karbonhidrat, protein, doymamış yağ, lif, fosfor, kalsiyum, demir, potasyum, magnezyum, çinko, A, B, C ve E vitamini içerir. Badem, LDL (kötü huylu) kolesterolü düşürücü etkiye sahiptir. Badem için, yazları kurak ve sıcak, kışları ılık ve yağışlı Akdeniz iklimi idealdir. Bununla beraber, odun kısmının kış soğuklarına dayanıklı olması sebebiyle, aşırı soğuk iklimde de yetişebilmektedir. Badem ağacının odun kısmı -20°C ile -30°C'ye kadar soğuğa dayanabilir. Türkiye'nin en önemli badem üretim bölgesi olan Ege'de yıllık ortalama yağış 700 mm. civarındadır (Anonim, 2017). Antep fıstığında olduğu gibi, ülkemiz ceviz, badem ve fındık yetiştiriciliği açısından önemli gen merkezlerinden biridir.

Sert kabuklu bir diğer önemli meyvelerden biri olan fındık (*Corylus avellana L.*), Fagales takımının Betulaceae familyasında yer alan *Corylus* cinsine aittir. Yetiştiriciliği M.Ö. 2838 yıllarına dayandığı ifade edilen fındığın, ilk kaynağının Çin üzerinden İran'a geçtiği ve oradan da Anadolu'nun Karadeniz kıyılarında yetiştiriciliğinin yapılmaya başlandığı bildirilmiştir (Sobutay, 2006). Fındık ülkemizin en önemli ihraç ürünü olup, üretimin büyük bir kısmı Karadeniz bölgesinde yapılmaktadır.

Dünya genelinde ülkemiz söz konusu bu 4 stratejik öneme sahip ürünün yetiştiriciliğinde önemli bir yere sahiptir. Dünya üretim toplamı, 9.000.000 ton

civarındadır. Bu üretimin %77'si; Çin, ABD, İran ve Türkiye tarafından gerçekleştirilmektedir (Kurt, 2014). Dünyada tarımı yapılan bu 4 ürünün 2019 yılı üretim miktarlarına bakıldığında; Türkiye, fındık yetiştiriciliğinde 776.046 ton üretimle 1., Antep fıstığı yetiştiriciliğinde İran ve A.B.D.'den sonra 240.000 ton üretim miktarı ile 3., badem yetiştiriciliğinde A.B.D, İspanya, Avustralya ve İran'dan sonra 150.000 ton üretim miktarı ile 5., ceviz yetiştiriciliğinde Çin, A.B.D ve İran'dan sonra 225.000 ton üretim miktarıyla 4. sırada yer almıştır (Anonymous, 2019).



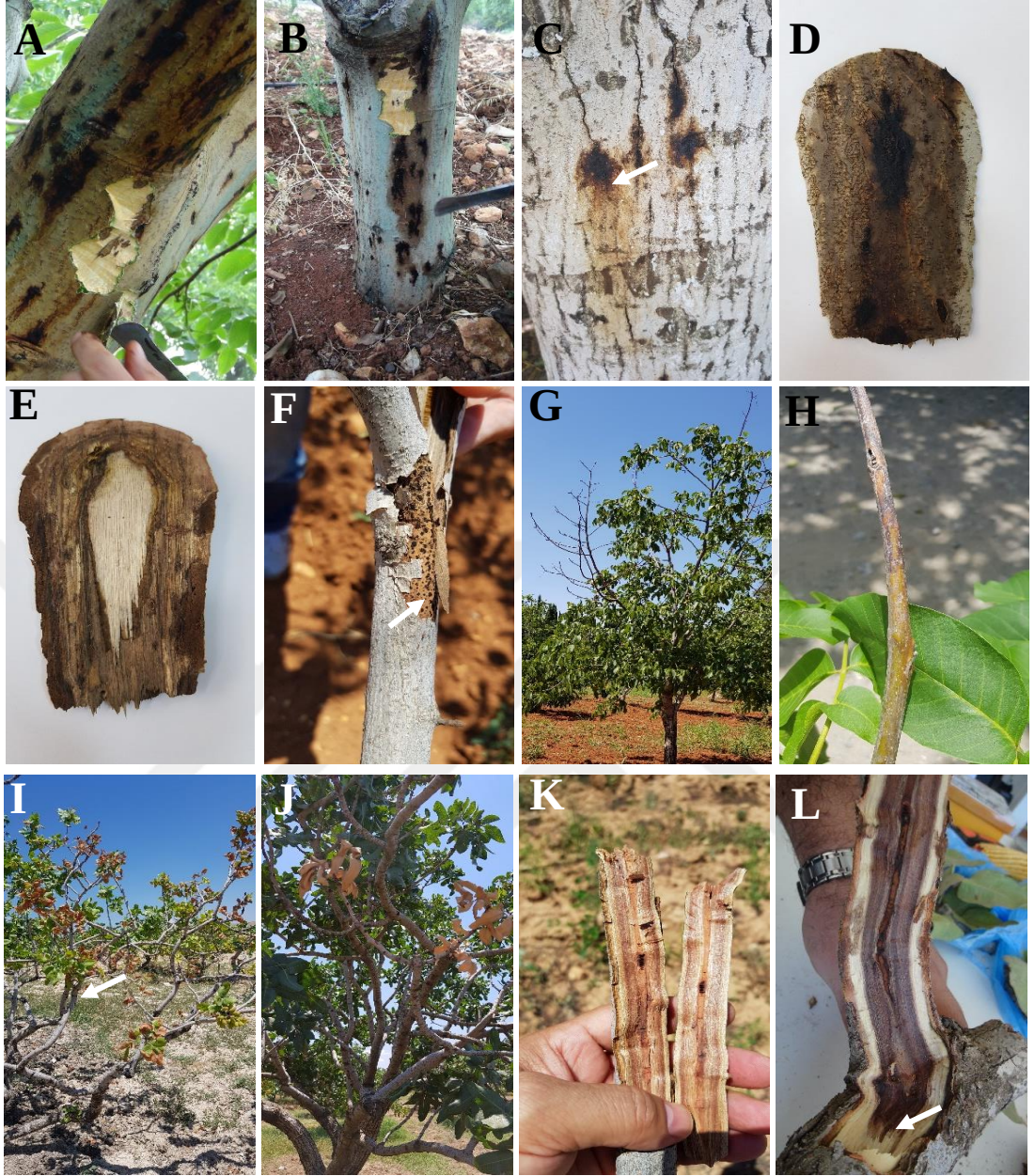
Şekil 1.1. Dünya genelinde 2019 yılında en fazla sert kabuklu meyve üretimi (ton) yapan ülkeler (Anonymous, 2019)

Söz konusu sert kabuklu meyvelerin ülke ekonomisine katkısı küçümsenmeyecek düzeyde yüksek oranlarda seyretmektedir. Ülkemizde Karadeniz Bölgesi'nde yoğun olarak yetiştiriciliği yapılan fındık dışında kalan 3 ürünün yetiştiriciliği özellikle Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde çok eski yıllardan beri yapılmaktadır. Kendine özgü doğal bir tat ve bunun yanında besin değeri açısından oldukça zengin olan sert kabuklu

meyveler başta tatlılarda ve birçok yöresel yemekte kullanılmasının yanı sıra, büyük miktarda çerez olarak da tüketilmektedir. Besin içeriği bakımından badem, fındık ve yerfıstığı gibi yağlı meyveler ile karşılaştırıldığında Antep fıstığı; protein, karbonhidrat ve kalori değerleri açısından birinci sırada iken yağ oranı açısından ise fındık meyvesinden sonra ikinci sırada bulunmaktadır (Gezginç ve Duman, 2004).

Ülkemizde üretimi yapılan sert kabuklu meyvelere olan ilgi son yıllarda artarken, üretim yapılan alanlarda tarımsal mücadele, gübreleme, sulama, ilaçlama, budama gibi üretici yanlışlıkları oldukça fazla görülmekte ve bu durum bitkilerde hastalıkların oluşumuna ve dolayısıyla verimin düşmesine, kalitenin azalmasına sebep olmaktadır (Satıl, 1995). Dünyada olduğu gibi ülkemizde yetiştiriciliği yapılan ceviz, badem, fındık ve Antep fıstığı ağaçlarının verim ve ürün kalitesi fungal, bakteriyel ve viral hastalık etmenleri tarafından ciddi şekilde etkilenir.

Son yıllarda dünya genelinde yetiştiriciliği yapılan başta ceviz ağaçları olmak üzere, Antep fıstığı, badem ve fındık ağaçlarında etiyolojileri yeni araştırılmaya başlayan geriye doğru ölüm, gövde, dal ve yapraklarda kurumalar şeklinde hastalık belirtilerine neden olan birçok fungal etmenler tarafından etkilendiği bildirilmiştir (Şekil 1.4.2). Farklı morfolojik yapıdaki fungal türler tarafından sürgün ve dal ve ana gövdelerde gerçekleşen enfeksiyonlar sonucunda hastalık etmeni gövde, dal ve sürgünlerde kurumalar şeklinde görülen geriye doğru ölüm belirtilerine neden olmuştur. Dünyada ve ülkemizdeki çok sayıda kültür bitkisi, orman ağaçları ve çalılarda Dothideales takımı Botryosphaeriaceae familyasına ait fungal etmenler, dünya çapında geniş konukçu dağılışı göstermekte ve çok çeşitli odunsu meyve ağaçlarında değişik hastalıklara sebep olmaktadır (Barr, 1987; Slippers ve Wingfield, 2007). Bu familyaya ait fungal türlerin dünya çapında yetiştiriciliği yapılan ceviz, badem, Antep fıstığı ve fındık gibi sert kabuklu meyvelerin yanı sıra, avokado, asma, zeytin ve diğer birçok önemli meyve ağacında yıkıcı hastalıklara sebep olduğu bildirilmiştir (Michailides, 1991; Johnson ve ark., 2002; Ma ve Michailides, 2002; McDonald ve ark., 2009; Úrbez-Torres ve ark., 2006; Armengol ve ark., 2008; Úrbez-Torres ve ark., 2009; Inderbitzin ve ark., 2010; Moral ve ark., 2010; McDonald ve Eskalen, 2011; Wunderlich ve ark., 2012; Phillips ve ark., 2013; Úrbez-Torres ve ark., 2013; Bakhshizadeh ve ark., 2014; Chen ve ark., 2014; Luo ve ark., 2019).



Şekil 1.2. (A-H) Ceviz ağaçlarının gövde ve dallarında *Botryosphaeria dothidea* ve *Neofusicoccum parvum* hastalık etmenleri tarafından neden olunan tipik sulanma, kahverengi akıntı, kabuğun dışa doğru kabarması ve dal kurumaları şeklinde ortaya çıkmış hastalık belirtileri (ok). (I-L) Antep fıstığı ağaçlarında dal ve gövdelerde *Neoscytalidium dimidiatum* tarafından neden olunan tipik yaprak ve dal kurumaları, gövde dokusundaki kararma belirtileri (ok)

Ülkemizde son yıllarda sert kabuklu meyvelerden ceviz, Antep fıstığı ve badem yetiştiriciliğinin yapıldığı alanlardaki meyve ağaçlarında gövde, dal ve yapraklarda kurumalar, gövdelerde kararmalar, akıntı ve kanser oluşumları, sürgünlerde geriye doğru ölüm ve kurumalar şeklinde ortaya çıkan hastalık belirtileri rapor edilmeye başlanmış,

yapılan izolasyon, morfolojik ve moleküler tanılama çalışmaları sonucunda, *Botryosphaeria*, *Neofusicoccum*, *Neoscytalidium* cinslerine ait hastalık etmenleri belirlenmiştir. Akdeniz ve Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde yapılan çalışmalarda söz konusu meyve ağaçlarda kuruma ve geriye doğru ölümlerden bu cinslere dahil *Botryosphaeria dothidea*, *Neofusicoccum parvum*, *Neoscytalidium dimidiatum*, *Neoscytalidium novaehollandiae* hastalık etmeni türlerin neden olduğu bildirilmiştir (Derviş ve ark. 2019ab; Kurt ve ark., 2019; Kurt ve ark., 2020; Kara ve ark., 2021). Söz konusu türlerden *Neoscytalidium dimidiatum* ve *Botryosphaeria dothidea* hastalık etmenlerinin sert kabuklu meyve ağaçların yanı sıra, turuncgiller, elma, incir, kaysı, asma gibi daha birçok meyve ağaçlarının yanı sıra, çam ve söğüt gibi orman ağaçlarında da sorun olduğu yapılan önceki çalışmalarda da bildirilmiştir (Akgül ve ark., 2014; Akgül ve ark., 2015; Türkölmez ve ark., 2016; Türkölmez ve ark., 2019ab; Oksal ve ark., 2020; Farr and Rossman, 2020).

Söz konusu hastalık etmenleri ile mücadelede genelde kısıtlı sayıda yapılan çalışmalarda bazı fungusitlerin etkinliği araştırılmış olup, hastalık etmenine karşı test edilen fungusitlerin etkinliği değişken olmakla birlikte oldukça düşük düzeylerde olduğu bildirilmiştir (Anonim, 2016; Kurt ve ark., 2020). Sert kabuklu meyve ağaçlarında sorun oluşturan fungal etmenlerle kimyasal mücadele oldukça zor olmakla birlikte, kullanılan pestisitlerin insan, hayvan ve çevreye verdiği önemli zararların yanı sıra kullanıldığı patojenlerin dayanıklılık geliştirmesi bu tür uygulamalardan beklenen başarıyı getirmemektedir (Singh ve ark., 2008; Sonker ve ark., 2014; Ramdial ve ark., 2017).

Günümüzde bilinçli tüketicilerin sentetik kimyasalların insan sağlığına ve çevreye verdiği zarar hususunda bilinçli olmasının yanı sıra, gelişmiş ülkelerde pestisit uygulamalarına getirilen çeşitli yaptırım ve sınırlamalar, kullanılan kimyasallara karşı fungusların kısa sürede dayanıklılık geliştiren yeni ırk/izolatların ortaya çıkması gibi olumsuzluklarından dolayı söz konusu fungal etmenlerle mücadelede, kimyasal tarım ilaçlarına alternatif olabilecek, çevreye, faydalı canlılara, hayvan ve insanlara yan etkisi olmayan, sürdürülebilir tarımı destekleyen yeni mücadele yöntemlerinin araştırılması zorunluluğunu ortaya çıkarmıştır (Soliman ve Badeaa, 2002).

Son yıllarda gerek ülkemizde ve dünya genelinde farklı konukçu-patojen ilişkilerinin araştırıldığı çalışmalarda, bitkilerde ekonomik anlamda ciddi kayıplara neden olan farklı türlere ait fungal ve bakteriyel hastalık etmenlerine karşı kimyasal mücadeleye

alternatif çevre dostu güvenilir yeni mücadele yolları arasında, (i) sağlıklı bitkilerin farklı kısımlarından izole edilip tanımlanan antagonist ve bitki büyümesini teşvik eden bakteriyel ve fungal kökenli biyokontrol etmenlerin kullanıldığı “**biyolojik mücadele**”; (ii) avirulent mikroorganizmalar (biyotik) ve doğrudan antimikrobiyal etkinliği olmayan kimyasal (abiyotik) uyarıcıların (elisitör) kullanıldığı “**teşvik edilmiş dayanıklılık**”; (iii) farklı türlere ait tıbbi ve aromatik bitkilerden elde edilmiş “**bitki ekstrakt ve uçucu yağlar ve ana bileşenleri**” gerek, depolarda, gerekse doğal koşullarda yetiştiriciliği yapılan tohum, toprak, hasat sonu ve yaprak kökenli önemli bitki hastalık etmenleri ile mücadelede kimyasallara alternatif yeni mücadele yöntemleri olarak kullanılan yöntemler olarak karşımıza çıkmaktadır.

Yapılan literatür araştırmasında ülkemizde farklı türlere ait bakteriyel ve fungal biyolojik mücadele etmenlerinin antifungal ve antibakteriyel etkinliği birçok hasat sonu depo, toprak, yaprak, tohum kökenli bitki fungal ve bakteriyel hastalık etmenlerine karşı araştırılmış olmakla birlikte, *Botryosphaeria dothidea*, *Neofusicoccum parvum*, *Neoscytalidium dimidiatum*, hastalık etmenleri üzerine gerek fungal gerekse bakteriyel kökenli biyolojik mücadele etmenlerinin antifungal etkinliği konusunda herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

Yapılan bu çalışmada, bölge ve ülkemiz ekonomisine önemli düzeyde katkısı olan ceviz, badem, Antep fıstığı ve fındık gibi sert kabuklu meyve ağaçlarının farklı sağlıklı bitki kısımlarından (i) endofit ve epifit bakteri izolatların izolasyonu, (ii) tanımlanması; (iii) bakteri izolatlarının başta ceviz, badem, Antep fıstığı ve fındık olmak üzere ekonomik öneme sahip sert kabuklu meyve ağaçlarında sorun olan *Botryosphaeria dothidea*, *Neofusicoccum parvum* ve *Neoscytalidium dimidiatum* türlerini içine alan *Botryosphaeria* geriye ölüm hastalık etmenlerine karşı *in vitro* antifungal etkinliklerinin belirlenmesi ve (iv) bakteriyel izolatların fungus gelişiminin engellenmesinde ve bitki büyümesinin gelişiminde rol oynayan olası etki mekanizmalarının karakterize edilmesi amaçlanmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Hastalık Etmenlerinin Dünya ve Ülkemiz Genelindeki Durumu

Ülkemizde ekonomik öneme sahip yetiştiriciliği yapılan sert kabuklu meyvelerin başında ceviz (*Juglans regia* L.), badem (*Prunus dulcis* L.), Antep fıstığı (*Pistacia vera* L.) ve fındık (*Corylus avellana* L.) gelmektedir. Dünya genelinde ülkemiz söz konusu bu 4 stratejik öneme sahip ürünün yetiştiriciliğinde önemli bir yere sahiptir. Söz konusu meyve ağaçlarından özellikle ceviz, badem ve Antep fıstığında ağaçlarında tez çalışmalarımıza konu olan *Botryosphaeria dothidea*, *Neofusicoccum parvum* ve *Neoscytalidium dimidiatum* türlerini içine alan *Botryosphaeria* geriye ölüm hastalık etmenleri ülkemizde olduğu kadar dünyanın birçok ülkesinde ciddi ekonomik kayıplara neden olduğu bildirilmiştir.

Moral ve ark. (2010), tarafından İspanya ve Kaliforniya’da yetişen zeytin ve farklı türlere ait diğer önemli meyve ağaçlarından yapılan izolasyon çalışmalarında, 150 *Botryosphaeriaceae* izolatu elde edilmiştir. Elde edilen türlerin moleküler analizlerinde ITS, tubulin, ve EF gen bölgelerine spesifik primerler kullanılmış ve dizi analizleri yapılmıştır. Filogenetik çalışmalar sonucunda tanımlanan 3 farklı türden; *Neofusicoccum mediterraneum*’un hastalıklı zeytin ve Antep fıstığı ağaçlarındaki dal kurumalarından, *Diplodia seriata*’nın hastalıklı zeytin ağaçlarındaki meyve ve dal kurumalarından, *Botryosphaeria dothidea*’nın ise hastalıklı zeytin ağaçlarındaki olgunlaşmamış zeytin meyvelerinin kurumalarından sorumlu fungal hastalık etmenleri olduğu belirlenmiştir. Zeytinde ham meyve ve dallarda yapılan patojenite testlerinde 4 tür içinde en az saldırgan türün *D. seriata* olduğu bildirilirken, *Botryosphaeria dothidea*’nın zeytin dallarında genelde hastalık belirtilerine neden olmadığı fakat meyvede zayıf patojen olduğu, zeytin meyve sineklerinin (*Bactrocera oleae*) açmış olduğu yaraların hastalık girişinde önemli rol oynadığı, hastalığın ortaya çıkması için misel gelişiminde optimum sıcaklığın 26 °C, spor çimlenmesi için optimal sıcaklığın ise 30 °C olduğu bildirilmiştir.

Gramaje ve ark. (2012), İspanya’nın Mallorca adasında yetişen badem ağaçlarında oldukça şiddetli kurumaların gözlemlendiği bahçelerde 2008-2010 yılları arasında yaptıkları surveylerde hastalık belirtisi gösteren bitkilerden izolasyon çalışmaları yapmışlardır. Yapılan morfolojik, fenotipik ve moleküler tanılama çalışmaları sonucunda elde edilen

izolatların, 5 farklı Botryosphaeriaceae türü (*Botryosphaeria dothidea*, *Diplodia olivarium*, *D. seriata*, *Neofusicoccum australe* ve *Neofusicoccum parvum*)’nün yanı sıra, *Eutypa lata*, *Phaeoacremonium iranimum* ve *Phomopsis amygdali* türlerine ait olduğu belirlenmiştir. Tanılaması yapılan türler arasında, *Neofusicoccum parvum* en yaygın ve dominant tür olup bu türü sırasıyla *E. lata*, *D. olivarium* ve *N. australe* türleri izlemiştir. İzolatlar arasında *Collophora hispanica* sp. nov. ve *Phaeoacremonium amygdalinum* sp. nov. ilk kez bu çalışmada taksonomik olarak tanımlanmıştır.

Abdollahzadeh ve ark. (2013), Botryosphaeriaceae ait fungal türlerin orman ve meyve ağaçlarında önemli endofit kökenli hastalık etmenlerini içerdiğini, *Botryosphaeria* ve *Neofusicoccum* spp. bu kompleks içinde en önemli türler olduğunu bildirdikleri çalışmalarında, İran’ının farklı bölgelerinde yetişen hastalık belirtisi gösteren orman ağaçlarının yanısıra 20 farklı meyve ağaçlarından toplam 125 fungal izolat elde etmişlerdir. Elde edilen izolatlarla yapılan MSP-PCR profil ve DNA dizi analizleri (ITS ve tef1-a) sonucunda *Botryosphaeria dothidea*, *Neofusicoccum mediterraneum*, *Neofusicoccum parvum* ve *Botryosphaeria scharifii* türleri tanımlanmıştır. Bu 4 tür içinde, *Botryosphaeria dothidea*, *Neofusicoccum mediterraneum* ve *Neofusicoccum parvum*’un ülkedeki varlığı daha önceden bilinmekte olup, *Botryosphaeria scharifii*’nin survey alanlarındaki ağaçlarda hastalık etmeni olarak İran için ilk kez bu çalışma ile ortaya konulduğu bildirilmiştir.

Chen ve ark. (2013), Kaliforniya’da yetişen ceviz ağaçlarında dal, sürgün kuruma ve geriye doğru ölüm belirtilerinin gözlemlendiği bahçelerden aldıkları hastalıklı bitki örneklerinden yapmış oldukları fungal izolasyonlar sonucunda, morfolojik ve fenotipik farklılık gösteren 2 izolatın yapılan moleküler ve patojenite test çalışmaları sonucunda, *Lasiodiplodia citricola* ve *Neoscytalidium dimidiatum* olarak belirlemişlerdir. Her iki hastalığın A.B.D’nin Kaliforniya eyaleti için ilk kez hastalık etmeni olarak belirlenen türler olduğu bildirilmiştir.

Latorre ve ark. (2013), tarafından yapılan çalışmada, yaban mersin (*Vaccinium corymbosum*) bitkisinin köklerinde kök kanseri hastalığına *Neofusicoccum parvum*’un neden olduğu belirlenmiştir. Hastalık etmeninin yaban mersini bitkisindeki belirtileri, bitkinin gövde tabanında ortaya çıkan yaygın kırmızımsı kahverengi kanser lezyonlar ile yaprakların kısmen veya tamamen ölmesi şeklinde karakterize edilmiştir. Budama yaraları, hastalık etmeninin bitkiye girişte rol oynayan primer enfeksiyon yolu olarak

değerlendirilmiştir. Bu çalışmada, farklı fungusitler ile biyolojik mücadele ajanlarının *Neofusicoccum parvum*'a karşı etkinliği budama yaralarından koruyucu etkinliği açısından değerlendirilmiştir. *Neofusicoccum parvum*'un miselyum gelişmesinin engellenmesinde benomil, tebuconazole ve iprodion'a fungusitleri tarafından gösterilen EC₅₀ değerlerinin ortalama 0.15-0.25, 0.26-0.33 ve 0.52-0.68 µg/mL olduğu tespit edilmiştir. Test edilen fungusitlerden, %0.1 oranında benomil, %0.5 oranında tebuconazole ve %0.06 oranında iprodione uygulamalarının ayrıca arazi koşullarında yaban mersini dalları üzerindeki *Neofusicoccum parvum*'a karşı budama yaralarının önemli ölçüde koruduğu belirlenmiştir. Test edilen fungusitler arasında pyraclostrobin'nin etkisiz olduğu, bunun yanında biyolojik kontrol uygulamalarından olan %75 turunçgil ekstraktı (Citrus SL), *Bacillus subtilis* QST713 (Serenade Max), ve *Trichoderma* spp. (*Trichonativa*) de hastalığa karşı etkili olmadığı yapılan uygulamalarda ortaya konulmuştur.

Sakalidis ve ark. (2013), *Neofusicoccum parvum*, *Neofusicoccum ribis* tür kompleksi üzerine Avustralya, Brezilya, Kamerun, Şili, Çin, Kolombiya, Etiyopya, Fransa, Yunanistan, Hindistan, Endonezya, İran, İtalya, Japan, Kenya, Meksika, Yeni Zelanda, Panama, Portekiz, Puerto Rico, Güney Afrika, Güney Kore, İspanya, İsveç, Tayvan, Tayland, Uganda, A.B.D, Uruguay, Zambiya ve Zimbabwe ülkelerinde elde edilip tanımlanan izolatların durum analizini yapmışlardır. Yapılan durum analizi sonucunda, *Neofusicoccum parvum* etmeninin 6 farklı kıtada yer alan 29 farklı ülkede yetişen 90 farklı konukçuda; *Neofusicoccum kwambonambiense* 4 farklı kıtada yer alan 6 farklı ülkede yetişen 14 farklı konukçuda; *Neofusicoccum umdonicola* 2 farklı kıtada yer alan 2 farklı ülkede yetişen 2 farklı konukçuda; *Neofusicoccum cordaticola* 3 farklı kıtada yer alan 3 farklı ülkede yetişen 3 farklı konukçuda; *Neofusicoccum batangarum* 2 farklı kıtada yer alan 3 farklı ülkede yetişen 3 farklı konukçuda; *Neofusicoccum ribis* 1 ülkede yetişen 1 konukçuda bildirilmiştir.

Akgül ve ark. (2014), Ülkemizin önemli asma yetiştiriciliği yapılan alanlarında yürüttükleri hastalık surveyi sonucunda, gözlem yapılan bağlardaki ağaçların gövde ve dallarında kurumlar ve gövde kanseri belirtileri gözlemlenmiştir. Bölgedeki hasta bağ alanlarında bu tür belirtilerden sorumlu hastalık etmenlerinin belirlenmesine yönelik izolasyon, morfolojik, moleküler tanılama ve patojenite test çalışmaları sonucunda *Botryosphaeria* geriye doğru ölüm hastalık kompleksine ait türlerden *Botryosphaeria*

dothidea, *Diplodia seriata*, *Neofusicoccum parvum* ve *Lasiodiplodia theobromae* tanımlanmışlardır. Araştırmacılar ülkede yetiştirilen asma ağaçlarında hastalık etmenlerinin varlığını ilk kez bu çalışma ile ortaya konduğunu bildirmişlerdir.

Chen ve ark. (2014), Kaliforniya’da İngiliz çeşidi cevizlerde Botryosphaeriaceae ve Diaporthaceae türlerinin belirlenmesi konusunda yaptıkları çalışma ile Botryosphaeriaceae’ya ait 10, Diaporthaceae’ya ait 2 farklı tür elde etmişlerdir. Bu türleri *Botryosphaeria dothidea*, *Diplodia mutila*, *D. seriata*, *Dothiorella iberica*, *Lasiodiplodia citricola*, *Neofusicoccum mediterraneum*, *N. nonquaesitum*, *Neofusicoccum parvum*, *N. vitifusiforme*, *Neoscytalidium dimidiatum*, *Diaporthe neotheicola* and *D. rhusicola* olarak tanımlamışlardır. Elde edilen fungus türlerinin patojenisite çalışmalarında, miselyum disk yöntemi kullanılarak üç İngiliz ceviz çeşidine (Chandler, Tulare ve Vina) inokulasyon yapmışlardır. İnokulasyon sonrası *Lasiodiplodia citricola* ve *Neofusicoccum parvum*, *Neofusicoccum mediterraneum*, *Neoscytalidium dimidiatum* ve *Botryosphaeria dothidea*’ya kıyasla daha şiddetli hastalık belirtilerinin gelişmesine neden olduğunu bildirmişlerdir.

Luque ve ark. (2014), tarafından yapılan çalışmada İspanya’nın Katalanya bölgesinde iki farklı yörede yer alan bağlarda iki farklı budama döneminde görülen hastalıkların surveyleri yapılmıştır. Yapılan surveylerde, örnekleme yapılan bitki sürgünlerinden toplam 250 örnek alınmış ve bu örneklerden elde edilen hastalık etmenlerinin, *Eutypa lata* (0-%0.4), *Neofusicoccum parvum* (0-%1.2), *Botryosphaeria dothidea* (0-%1.6), *Phomopsis* spp. (0-%1.6), *Cryptovalsa ampelina* (0-%3.2), *Phaeomoniella chlamydospora* (0-%12.0) ve *Diplodia seriata* (%0.4-68.4) olduğu belirlenmiştir. Hastalık etmenlerinin sonbaharda yapılan erken budamalarda bitkiye bulaşma potansiyellerinin ilkbaharda yapılan geç budamaya kıyasla daha düşük olduğu görülmüştür. Yapılan gözlemler erken budama tedbirlerine ilave kimyasal mücadelenin hastalık çıkışının engellenmesinde büyük öneme sahip olduğunu göstermiştir.

Türkölmez ve ark. (2016), Ülkemizin önemli meyvelerinden olan elmalarda sorun hastalık surveyi sonucunda, elma ağaçlarında geriye doğru ölüm, sürgün ve dallarında kurumlar ve gövde kanseri belirtilerine neden olan hastalık etmenlerinin belirlenmesine yönelik izolasyon, morfolojik, moleküler tanılama ve patojenite test çalışmaları yapmışlardır. Elde edilen çalışmalar sonucunda elma ağaçlarında söz konusu belirtilerden sorumlu hastalık etmenini *Botryosphaeria dothidea* olarak tanımlanmıştır. Araştırmacılar

funga1 türün ülkede yetiştirilen elma aēaēlarında hastalık etmeni olduēunu ilk kez bu çalışma ile bildirilmiştir.

Dissanayake ve ark. (2016), tarafından dünya genelinde 2013 yılına kadar yapılan taksonomik, yaygınlık ve survey çalışmalarının derlendiēi yayında, Botryosphaeriaceae hastalık kompleksinin bünyesinde birçok endofit, saprofit ve bitki patojeni türleri i erdiēi, hastalık kompleksinin bünyesinde 23 cins düzeyinde 187 farklı türü barındırıldıēının belirtildiēi çalışmada, bu türlere ait tanılamada kullanılan özel primer ve DNA dizi analizleri ve filogenetik çalışma sonuçları içeren bilgiler derlenmiştir.

Li ve ark. (2016), Çin'de yetiřtiriciliēi yapılan İngiliz  eşidi ceviz aēaēlarında ciddi kurumlara neden olan funga1 hastalık etmenlerinin belirlenmesine yönelik survey çalışmalarında, hastalık belirtileri gösteren dal ve sürgünlerden birçok funga1 izolat elde etmişler, elde edilen izolatların genomik DNA'larının ITS rDNA ve translation elongation factor 1-alpha (TEF-1a) gen bölgeleri spesifik primerler kullanılarak  oēaltılmıřtır. Moleküler çalışmalarda elde edilen izolatlar *Botryosphaeria dothidea* ve *Lasiodiplodia pseudotheobromae* olarak tanılanmıştır.

Olmo ve ark. (2016), 2009-2014 yılları arasında İspanya'nın Mallorca adasında 31 farklı badem bahçesinde yapılan survey çalışmasında 45 farklı Botryosphaeriaceae izolatı elde etmiş olup, tek spor olarak saflaştırılan funga1 izolatların morfolojik, fenotipik ve DNA dizi analizleri sonucunda *Diplodia olivarum*, *D. seriata*, *Neofusicoccum luteum*, *N. mediterraneum*, ve *Neofusicoccum parvum* olmak üzere 5 farklı türe ait olduēunu belirlemişlerdir. Yapılan patojenite test sonuçlarına göre *Neofusicoccum* spp. ait izolatlarının *Diplodia* spp. ait izolatlarla kıyasla daha virülent ve agrasif izolatlar olduēu belirlenmiş, *N. mediterraneum* ve *N. luteum* türlerinin İspanya için bademlerde ilk kez bildirilen hastalık etmeni olduēunu belirlemişlerdir.

Luo ve ark. (2019), ABD'nin Kaliforniya eyaletinde yetişen kabuklu sert çekirdekli meyve aēaēlarındaki kurumlara *Botryosphaeria dothidea* türünün yanı sıra, *Cytospora*, *Diplodia*, *Lasiodiplodia*, *Neofusicoccum* ve *Phomopsis* spp. türlerine ait funga1 etmenlerin neden olduēunu belirlemişlerdir. Söz konusu bölgede yapılan detaylı survey ve tanılama çalışmalar sonucunda; bu etmenlerden *Phomopsis* ve *Diplodia* spp. düşük, *Botryosphaeria dothidea* ve *Lasiodiplodia* spp. yüksek ve *Neofusicoccum* spp. ise orta düzeyde yaygınlık g sterdiēini bildirmişlerdir. Sonuçta 6 farklı etmenin genel durumu deēerlendirildiēinde, *Phomopsis* ve *Diplodia* spp. bölgede kanser hastalıkları arasında

düşük öneme sahipken, *Lasioidiplodia* spp. en saldırgan ve iyi gelişen populasyon, *Cytospora* spp. 1-2 erik bahçesinde baskın tür olduğu, *Botryosphaeria dothidea* ve *Neofusicoccum* spp.'nin bölgede farklı meyve ağaçlarında yüksek yaygınlık eğilimi gösteren hastalıklar olarak değerlendirilmiştir.

Moral ve ark. (2017), Antep fıstığı ağaçlarında kurumalara neden olan bir başka hastalık etmeni olarak *Neofusicoccum mediterraneum*'un olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar, hastalık etmenin Antep fıstığı ağaçlarının farklı dokularında yapılan *in vitro* patojenite testlerinde virülensliklerinin dokulara, yaralama yöntemi, sıcaklık ve inokulum yoğunluklarına göre değişiklik gösterdiğini belirlemişlerdir.

Nouri ve ark. (2019), ABD'nin Kaliforniya eyaletinde önemli badem üretim alanlarındaki badem ağaçlarında, kabuk dokusunda nekroz, iletim (ksilemlerde) demetlerinde dikine doğru yayılan renk değişimi, dallardaki nekrotik alanların etrafında sakızlanma, sürgünlerde yanma ve dallardaki meyvelerde kurumalar şeklinde görülen hastalık belirtilerini gözlemlemişlerdir. Bu tür belirti gösteren ağaçlardan yapılan fungal hastalık etmen izolasyonu sonucunda elde edilen izolatin morfolojik ve moleküler tanılama çalışmalarını müteakiben yapılan patojenite test çalışmaları sonucunda *Neoscytalidium dimidiatum* olduğu belirlenmiştir.

Derviş ve ark. (2019a), Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde yetiştiriciliği yapılan ceviz ağaçlarında kök çürüklüğü, meyve yanıklığı ve kanser şeklinde hastalık belirtilerinin gözlemlendiğini, bu tür belirti gösteren ağaçlardan hastalık etmeninin belirlenmesine yönelik olarak fungal izolasyonların yapıldığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar, yapılan izolasyon çalışmalarında elde ettikleri fungal izolatu, morfolojik ve moleküler çalışmaların yanı sıra patojenite test çalışmaları sonucunda *Neoscytalidium dimidiatum* olarak tanılamışlardır. Hastalık etmeninin ülkede yetiştirilen ceviz ağaçlarında hastalık etmeni olduğu ilk kez bu çalışma ile ortaya konulmuştur.

Derviş ve ark. (2019b), tarafından yapılan çalışmada, Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde yetiştiriciliği yapılan Antep fıstığı ağaçlarında sürgün yanıklığı, kanser, kök çürüklüğü belirtilerinin gözlemlendiği, tipik hastalık belirtileri gösteren ağaçlardan örnekler alınarak hastalıklı dokulardan fungal etmenin izolasyonları yapıldığı bildirilmiştir. Yapılan izolasyon çalışmalarında elde edilen fungal izolat, morfolojik ve moleküler çalışmaların yanı sıra patojenite test çalışmaları sonucunda fungal etmen *Neoscytalidium*

dimidiatum olarak tanımlanmıştır. Hastalık etmeninin ülkede yetiştirilen ceviz ağaçlarında hastalık etmeni olduğu ilk kez bu çalışma ile bildirilmiştir.

Kurt ve ark. (2019), Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde yetiştiriciliği yapılan Antep fıstığı ağaçlarında dal ve sürgün kurumalarının yanı sıra meyve salkımlarında yanıklık belirtileri gösteren ağaçların hastalıklı dokularında izolasyonlar yapmışlardır. Yapılan izolasyon çalışmalarında elde edilen fungal izolatın morfolojik ve moleküler tanılama çalışmalarının yanı sıra, patojenite test çalışmaları sonucunda hastalığa neden olan fungal etmen *Neoscytalidium novaehollandiae* olarak tanımlanmıştır. Hastalık etmeninin ülkede yetiştirilen Antep fıstığı ağaçlarında hastalık etmeni olduğu ilk kez bu çalışma ile bildirilmiştir.

Mohammadi ve Firoozjah (2019), tarafından İran'da yetişen fındık ağaçlarında dal kanseri ve kurumlara belirtileri gösteren hastalıklı bitki kısımlarından toplam 31 izolat elde edilmiş olup, bu izolatlarla yapılan morfolojik ve tef-1 α primerinin kullanıldığı moleküler tanılama çalışmaları sonucunda tüm fungal hastalık etmeni izolatların *Botryosphaeria dothidea* olarak teşhis edildiği bildirilmiştir.

Türkölmez ve ark. (2019a), Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde yetişen söğüt ağaçlarında, sürgün yanıklığı, dal kanseri ve geriye doğru ölüm belirtileri şeklinde gözlenen hastalığın sorumlusu olan etmenin belirlenmesine yönelik izolasyon, morfolojik, moleküler tanılama ve patojenite test çalışmaları yapmışlardır. Elde edilen çalışmalar sonucunda söğüt ağaçlarında söz konusu belirtilerden sorumlu hastalık etmenini *Neoscytalidium dimidiatum* olarak tanımlamışlardır. Araştırmacılar fungal türün ülkede yetiştirilen söğüt ağaçlarında hastalık etmeni olduğunu ilk kez bu çalışma ile bildirilmişlerdir.

Türkölmez ve ark. (2019b), Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde yetiştiriciliği yapılan ülkemizin önemli sebzelerinden olan domates bitkilerinde, ciddi dal, yaprak ve meyve yanıklığı, bitki solgunluk ve sonucunda ölüm belirtileri kayıt etmişler, bu belirtilere neden olan hastalık etmeninin belirlenmesine yönelik izolasyon, morfolojik, moleküler tanılama ve patojenite test çalışmaları yapmışlardır. Elde edilen çalışmalar sonucunda domates bitkilerinde söz konusu belirtilerden sorumlu hastalık etmenini *Neoscytalidium dimidiatum* olarak tanımlamışlardır. Araştırmacılar fungal türün ülkede yetiştirilen domates bitkilerinde hastalık etmeni olduğunu ilk kez bu çalışma ile bildirilmişlerdir.

Zlatkovic ve ark. (2019), Batı Balkan’larda yetişen orman ağaçları ve çalılarda kuruma, kanser ve geriye doğru ölüm hastalıklarına neden olan Botryosphaeriaceae familyasına dahil hastalık etmenlerinin belirlenmesine yönelik survey çalışmalarında en önemli 2 türün yapılan fenolojik, morfolojik, moleküler analizler ve patojenite testler sonucunda *Neofusicoccum parvum* ve *Diplodia sapinea* olduğunu belirlemişlerdir.

Kurt ve ark. (2020), Hatay ilinin İskenderun ilçesinde yetiştirilen ceviz ağaçlarında tipik geriye doğru ölüm ve dal kurumaları, ana gövdelerde nekrotik lekeler ve bu lekelerden siyah akıntılar şeklinde belirtilerin gözlemlendiğini bildirmişler, belirti gösteren ağaçlardan alınan hastalıklı dokulardan izolasyonlar yapmışlardır. Yapılan izolasyon çalışmalarında elde edilen fungal izolatin morfolojik ve moleküler tanılama çalışmalarının yanı sıra, patojenite test çalışmaları sonucunda hastalığa neden olan fungal etmen *Botryosphaeria dothidea* olarak tanılanmıştır. Hastalık etmeninin ülkede yetiştirilen ceviz ağaçlarında hastalık etmeni olduğu ilk kez bu çalışma ile bildirilmiştir.

Lopez-Moral ve ark. (2020), İspanyanın güney kıyılarında yoğun olarak yetiştiriciliği yapılan bölgelerin en önemli sert kabuklu meyvelerinden biri olan ceviz ağaçlarında görülen dal kurumalarının nedenlerini belirlemek amacıyla, 2017-2018 yıllarında 10 farklı ticari fıstık bahçelerinde surveyler yapmışlardır. Hastalıklı bitkilerden önemli sayıda *Botryosphaeriaceae* ve *Diaporthe* izolatları elde edilmiş olup, bu izolatların yanı sıra kurumuş dallardan önemsiz sayılabilecek sayıda *Cytospora* izolatlarının elde edildiğini bildirmişlerdir. ITS, LSU, EF, TUB2, ve ACT gen bölgelerinin DNA dizilimlerine yönelik moleküler çalışmalar sonucunda dal kurumalarından sorumlu fungal hastalık etmenlerinin Botryosphaeriaceae grubu üyelerinden: *Botryosphaeria dothidea*, *Diplodia seriata*, *Dothiorella sarmentorum*, *Dothiorella* sp., *Neofusicoccum mediterraneum* ve *Neofusiccocum parvum*; Diaporthe grubu üyelerinden: *Diaporthe neotheicola*, *Dia. rhusicola*, *Diaporthe* sp., ve *Phomopsis amygdali* türleri belirlenmiş olup, yalnızca 1 izolat *Cytospora* sp. olarak tanılanmıştır. Patojenite testlerinde, izolatlar arasında Botryosphaeriaceae izolatlarının dallarda büyük lezyonlar şeklinde ortaya çıkan kurumalara neden olduğu, bu izolatları sırasıyla Diaporthe ve Cytospora sp. ait izolatlar izlemiştir. Test edilen türler arasından ise *Neofusiccocum parvum* en virulent izolat olup, bu izolatu *Botryosphaeria dothidea* ve *N. mediterraneum* izolatları izlemiştir. Yapılan patojenite testlerinde izolatlar arasında önemli düzeylerde farklılığın gözlemlendiği bildirilmiştir.

Sohrabi ve ark. (2020), tarafından İran'ın önemli sert kabuklu meyve bahçelerinin bulunduğu bölgelerdeki 58 badem, 43 Antep fıstığı ve 80 farklı ceviz bahçesinde 2015-2018 yılları arasında hastalık survey çalışmaları yapılmış, olup hastalık belirtisi gösteren ağaçlardan 156 farklı fungal izolat morfolojik ve DNA dizilimlerinin filogenetik analizleri sonucunda seçilerek tanılanmıştır. Yapılan analizler sonucunda *Collophorina hispanica*, *Pleurostoma richardsiae*, *Phaeoacremonium* spp (*P. angustius*, *P. cinereum*, *P. italicum*, *P. fraxinopennsylvanicum*, *P. minimum*, *P. parasiticum*, *P. scolymus*, *P. tuscanum* ve *P. viticola*), Botryosphaeriaceae türleri (*Botryosphaeria dothidea*, *Diplodia gallae*, *D. mutila*, *D. seriata*, *Dothiorella plurivora*, *Do. sarmentorum*, *Do. viticola*, *Lasiodyplodia citricola*, *L. mahajangana*, *L. theobromae* ve *Neofusicoccum parvum*), Diatrypaceae türleri (*Cryptosphaeria pullmanensis*, *Diatrype whitmanensis*, *Eutypella citricola* ve *E. vitis*) *Eutypella* spp. (*Eutypella* sp. 1 ve *Eutypella* sp. 2) söz konusu ağaçlarda kurumlardan sorumlu hastalık etmeni türler olarak bildirilmiştir.

Lopez-Moral ve ark. (2020), 2017-2018 yıllarında İspanyanın güney kıyılarında yoğun olarak yetiştiriciliği yapılan Akdeniz kıyı kuşağının en önemli sert kabuklu meyvelerinden biri olan Antep fıstıklarında görülen dal kurumalarının nedenlerini araştırdıkları çalışmalarında 10 farklı ticari fıstık bahçelerinde surveyler yapmışlardır. Hastalıklı bitkilerden elde edilen farklı morfolojik yapılara sahip izolatların ITS, LSU, EF, TUB2, ve ACT gen bölgelerinin DNA dizilimlerine yönelik moleküler çalışmalar yapmışlardır. Yapılan çalışmalar sonucunda dal kurumlardan sorumlu hastalık etmenlerini *Botryosphaeria dothidea*, *Lasiodyplodia pseudotheobromae*, *Neofusicoccum mediterraneum*, *Neofusicoccum parvum*, *Diaporthe neotheicola*, *Diaporthe* sp., *Eutypa lata*, *Eutypa* sp., *Cytospora* sp., ve *Phaeoacremonium* olarak tanımlanmışlardır. Yapılan patojenite testlerinde, izolatlar arasında Botryosphaeriaceae izolatlarının dallarda büyük lezyonlar şeklinde ortaya çıkan kurumlara neden olduğu, bu izolatlardan en saldırgan türün *L. pseudotheobromae* olduğu bu türü, *Neofusicoccum* spp. takip ettiği bildirilmiştir. Fıstık salkımlarının *N. mediterraneum* etmeni ile bulaştırılmasından 6 hafta sonra, salkımlarda hastalık belirtilerinin gözlemlendiği, yapılan patojenite testlerinde izolatlar arasında önemli düzeylerde farklılığın olduğu belirlenmiştir.

Kara ve ark. (2021), Hatay ili genelinde yetiştirilen ceviz ağaçlarında tipik geriye doğru ölüm ve dal kurumaları, ana gövdelerde nekrotik lekeler ve bu lekelerden siyah akıntılar şeklinde belirtileri gösteren ağaçlardan örnekler alarak ve izolasyonlar

yapmışlardır. Yapılan izolasyon çalışmalarında elde edilen fungal izolatu, morfolojik ve moleküler tanılama çalışmalarının yanı sıra, patojenite test çalışmaları sonucunda *Neofusicoccum parvum* olarak tanılamışlardır. Hastalık etmeninin ülkede yetiştirilen ceviz ağaçlarında hastalık etmeni olduğu ilk kez bu çalışma ile bildirilmiştir.

2.2. Hastalık Etmenleri ile İlgili Yapılan Biyolojik Mücadele Çalışmaları

Chen ve ark. (2003), tarafından yapılan çalışmada, sağlıklı fıstık yapraklarından elde edilen ve potansiyel mikrobiyal fungusit etmeni olarak belirlenen *Paenibacillus lentimorbus* CBCA-2 izolatının, fıstık salkımı ve sürgün yanıklığı etmeni *Botryosphaeria dothidea* ya karşı antifungal etkinliği *in vitro* ve *in vivo* koşullarda araştırılmıştır. *Paenibacillus lentimorbus* CBCA-2 izolatı, 25 °C'de 24 saat inkübasyondan sonra hastalık etmeninin piknidiospor çimlenmesini %100 oranında engellemiştir. Bakteri izolatının hücre kültür filtratlarının ayrıca fungal etmenin piknidiospor ve hiflerinde erime ve şişme şeklinde orataya çıkan morfolojik anormalliklere neden olmuştur. Test edilen beş farklı besi yeri arasında, Nutrient Yeast Dextrose Broth besi yeri fungal hifi engelleyen bileşiklerin üretiminin en fazla olduğu besi yeri olarak bildirilmiştir. CBCA-2 kültür filtratlarının uygulandığı koparılmış yaprak testinde kültür filtratın hastalık çıkışını ciddi oranda baskıladığı, ancak lezyon oluşumunu engelleyemediği bildirilmiştir. Azoksistrobin (Abound), benomil (Benlate), tebuconazole (Elite), propikonazol (Break) veya trifloksistrobin (Flint) ile ilaçlanmış dallarda bakteri izolatı CBCA-2'nin hayatta kalması etkilenmezken, iprodion (Rovral) uygulaması bakteri canlılığı üzerine etkide bulunmuştur. *Botryosphaeria dothidea*'nın piknidiosporlarının bulaştırılmasından önce budama yaralarına CBCA-2 süspansiyonunun püskürtülmesi, püskürtülmemiş kontrollere kıyasla enfeksiyonu önemli ölçüde azalttığı belirlenmiştir.

Bester ve ark. (2007), tarafından yapılan çalışmada Güney Afrika'daki üzüm bağlarında sorun olan *Phaeomoniella chlamydospora*, *Phaeoacremonium* spp., *Phomopsis* spp. ve *Botryosphaeriaceae* familyasına dahil (*B. obtusa*, *Neofusicoccum australe*, *Neofusicoccum parvum* ve *Lasiodiplodia theobromae*) hastalık etmenlerine karşı farklı fungusitlerle mücadele olanaklarını araştırılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda fungusitlerden iprodine, pyrimethanil, bakır amonyum asetat, kresoxim-methyl ve boscalid etken maddeli fungusitlerin test edildikleri en yüksek konsantrasyonlarda, hastalık etmenlerinin misel gelişimlerini engellemediğini

gözlemlenmiştir. Diğer yandan Benomyl, tebuconazole, prochloraz manganese chloride etken maddeli fungusitlerin ise Botryosphaeriaceae misellerin gelişmesinin engellenmesi üzerinde etkili olduğu belirlenmiştir. Test edilen fungusitlerden Benomyl, tebuconazole, prochloraz manganese chloride ve flusilazole asmalarda budamalardan sonra açılan yaralardan Botryosphaeriaceae türlerine karşı koruyucu etkinliğe sahip fungusitler olarak kayıt edilmiştir.

Kotze ve ark. (2011), tarafından asma ağaçlarında sorun olan gövde hastalık etmenlerinin belirlenmesine yönelik yapılan çalışmada, *Eutypa lata*, *Phaeomoniella chlamydospora*, *Botryosphaeriaceae* türleri (*Botryosphaeria* ve diğer saldırgan cinsler dahil), *Phomopsis* ve *Phaeoacremonium* dahil olmak üzere çok sayıda hastalık etmeni belirlenmiştir. Söz konusu çalışmada, makroskopik ve mikroskopik etkileşimleri belirlemek için gövde hastalık etmenlerine karşı çeşitli biyokontrol ajanlarının etkinliği *in vitro* ikili kültür testleri ile değerlendirilmiştir. *In vitro*'da en iyi etkinlik gösteren biyokontrol ajanları aynı zamanda iki farklı bahçede test edilmiştir. *Neofusicoccum australe*, *Neofusicoccum parvum*, *Diplodia seriata*, *Lasioidiplodia theobromae*, *Eutypa lata*, *Phaeomoniella chlamydospora* veya *Phomopsis viticola* spor süspansiyonları püskürtülerek bulaştırılmıştır budama yaralarına benomyl, *Trichoderma* preparatı (Biotricho), Vinevax ve ECO 77 gibi ticari preparat uygulamalarının yanı sıra *T. atroviride* (USPP-T1 ve T2 izolatları) ile *Bacillus subtilis* izolatları püskürtme şeklinde uygulanmıştır. Bulaştırmadan sekiz ay sonra, hastalıklı kısımlardan PDA besiyeri üzerine hastalık izolasyonu yapılmış ve değerlendirilmiştir. Sonuç olarak biyolojik mücadele etmenlerinin etkinliğinin benomil tarafından gösterilen etkinlik kadar yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Test edilen biyolojik mücadele etmenleri arasında, *Ph. viticola*, *E. lata*, *Pa. chlamydospora*, *N. australe*, *Neofusicoccum parvum*, *D. seriata* ve *L. theobromae* tarafından neden olunan hastalık çıkışı *T. atroviride* USPP-T1 izolatı tarafından sırasıyla %69, %76, %77 ve %78 oranında engellendiği belirlenmiştir.

Yin ve ark. (2011), tarafından yapılan çalışmada, kavak ağaçlarında kanser hastalığına neden olan *Botryosphaeria dothidea*'nın mücadelesinde kullanılmak üzere kavak ağaçlarından birçok türe ait endofitik kökenli bakteri izolatları izole etmişlerdir. Yüksek düzeyde etkinlik gösteren bakteri izolatlarından olan PEBA20 izolatı, 16S rRNA geninin klasik bakteriyolojik testleri ve dizi analizi sonuçlarına göre *Bacillus amyloliquefaciens* olarak tanımlanmıştır. Yapılan *in vitro* antifungal etkinlik

alışmalarında, *Bacillus amyloliquefaciens* PEBA20 izolatının kavakların kesilmiş filizlerinde *Botryosphaeria dothidea*'nın miselyum gelişimini ve kanser hastalığının çıkışını %60-100 oranında engellediğı belirlenmiştir. Antagonist bakteri izolatının, fungus, maya, gram-pozitif ve gram-negatif bakteriler dahil olmak üzere bir dizi mikroorganizmaya karşı antifungal ve antibakteriyel aktivite gösterdiği bildirilmiştir. Çalışma sonuçları, *B. amyloliquefaciens* PEBA20 izolatının, *Botryosphaeria dothidea*'nın neden olduğu kavak kanseri hastalığının yanı sıra diğerk fitopatojen türler tarafından neden olunan hastalıklara karşı biyolojik mücadele etmeni olarak biyokontrol potansiyele sahip olduğu belirlenmiştir.

Latorre ve ark. (2013), tarafından yapılan çalışmada, yaban mersin (*Vaccinium corymbosum*) bitkisinin köklerinde kök kanseri hastalığına *Neofusicoccum parvum*'un neden olduğu belirlenmiştir. Hastalık etmeninin yaban mersini bitkisindeki belirtileri, bitkinin gövde tabanında ortaya çıkan yaygın kırmızımsı kahverengi kanser lezyonlar ile yaprakların kısmen veya tamamen ölmesi şeklinde karakterize edilmiştir. Budama yaraları, hastalık etmeninin bitkiye girişte rol oynayan primer enfeksiyon yolu olarak değerlendirilmiştir. Bu çalışmada, farklı fungusitler ile biyolojik mücadele ajanlarının *Neofusicoccum parvum*'a karşı etkinliği budama yaralarından koruyucu etkinliği açısından değerlendirilmiştir. *Neofusicoccum parvum*'un miselyum gelişmesinin engellenmesinde benomil, tebuconazole ve iprodion'a fungusitleri tarafından gösterilen EC₅₀ değerlerinin ortalama 0.15-0.25, 0.26-0.33 ve 0.52-0.68 µg/mL olduğu tespit edilmiştir. Test edilen fungusitlerden, %0.1 oranında benomil, %0.5 oranında tebuconazole ve %0.06 oranında iprodione uygulamalarının ayrıca arazi koşullarında yaban mersini sapları üzerindeki *Neofusicoccum parvum*'a karşı budama yaralarının önemli ölçüde koruduğı belirlenmiştir. Test edilen fungusitler arasında pyraclostrobin'nin etkisiz olduğu, bunun yanında biyolojik kontrol uygulamalarından olan %75 turunçgil ekstraktı (Citrus SL), *Bacillus subtilis* QST713 (Serenade Max), ve *Trichoderma* spp. (*Trichonativa*) de hastalığa karşı etkili olmadığı yapılan uygulamalarda ortaya konulmuştur.

Jiang ve ark. (2015), tarafından yapılan çalışmada kavak kanserinin mücadelesinde kavak kök bölgesinden izole edilmiş mikrobiyolojik kontrol ajanı *Brevibacillus laterosporus* JX-5'in kullanılması olanakları araştırılmıştır. Yapılan *in vitro* ikili kültür testlerinde elde edilen bakteri izolatının birçok patojenik fungus gelişimini önemli

derecede engellediği tespit edilmiştir. Ayrıca yapılan çalışmalar sonucunda *Brevibacillus laterosporus* JX-5 izolatı tarafından üretilen antifungal bileşenler izole edilerek tanımlanmıştır. *Brevibacillus laterosporus* JX-5'in antifungal bileşen B olarak belirtilen fermantasyon sıvısı, kavak dalında *Botryosphaeria dothidea* kanserini %70-90 oranında azalttığı bildirilmiştir. Bileşen B'nin, büyük ölçüde ısıya dayanıklı olduğunu, geniş bir pH aralığına uyarlanabildiğini ve UV'ye dayanıklı olduğunu tespit etmişlerdir. Bileşenin ayrıca, *Botryosphaeria dothidea* fungus zarına nüfuz ettiğini, çekirdekleri parçaladığını, hücre duvarına zarar verdiğini ve sonuç olarak patojenik fungusun ölümüne neden olmuştur. Elde edilen sonuçlar, *Brevibacillus laterosporus* JX-5 izolatı ve biyoaktif metabolik ürünleri tarafından sergilenen antifungal aktivitenin bitki hastalıkları ile mücadelede kimyasallara alternatif potansiyele sahip olduğunu göstermiştir.

Haidar ve ark. (2016), asmaların yıkıcı fungal hastalık etmenlerinden olan *Botrytis cinerea* ve *Neofusicoccum parvum*'un biyolojik mücadelesinde asmalardan izole edilen toplam 46 bakteri türünün antagonistik etkinliklerini araştırmışlardır. Asma yaprağı üzerinde *B. cinerea*'ya karşı yapılan *in vivo* testlerde, izole edilen bakteri türleri arasında en etkili tür olan *Bacillus ginsengihumi*'nin hastalık etmenini %80 oranında engelleyen antagonistik izolat olarak belirlenmiştir. Antagonist türleri arasında özellikle *Pantoea agglomerans*'ın *Neofusicoccum parvum* tarafından gövde üzerinde neden olunan hastalık belirtilerini önemli ölçüde azaltabildiği bildirilmiştir. Antagonist bakteri türlerinin test edildikleri iki farklı fungal hastalık etmenlerinin üzerine olan etkinliklerinin değişiklik gösterdiği çalışmalarda, bazı antagonist türlerin *B. cinerea*'ya karşı oldukça etkili olurken, bazı antagonist türlerin *Neofusicoccum parvum*'a karşı yüksek etkinlik gösterdiği gözlenmiştir. Antagonist izolatlardan *Paenibacillus* spp. yaprak üzerinde yüksek düzeyde antifungal etkinlik gösterirken, üzüm daneleri üzerinde gösterilen etkinlik düşük oranda ortaya konulmuştur. Diğer yandan, *Bacillus licheniformis* gibi bazı türlerin *B. cinerea* tarafından sağlıklı ve yaralı asma daneleri üzerinde neden olunan hastalığı önemli düzeyde baskıladığı belirlenirken, aynı türün asma gövdesi üzerinde *Neofusicoccum parvum* tarafından neden olunan enfeksiyonun artışına neden olmuştur.

Xu ve ark. (2018), tarafından yapılan çalışmada, *Botryosphaeria* gövde kanseri, Çin'de yetişen *Carya cathayensis*'in (Çin hikori) zarar veren hastalıklardan biri olduğu bildirilmiştir. Her ne kadar genellikle hastalığı kontrol altına almak için fungusitler kullanılmakta olsada, kullanılan fungusitlerin ciddi çevresel sorunlara neden olduğu

bildirilmiştir. Bu çalışmada, *C. cathayensis* üzerinde *Botryosphaeria* gövde kanseri hastalığının çıkışını önlemek için Gram-pozitif bakteri *Paenibacillus polymyxa* CF05 izolatının etkinliği kimyasal mücadeleye alternatif çözüm olarak değerlendirilmiştir. Yapılan *in vitro* çalışmalarda, bakteri izolatının gövde kanserine neden olan *Botryosphaeria dothidea*'nın gelişimini engellediği tespit edilmiştir. İzolatın karboksimetilselüloz karışımında yapılan endospor formülasyonunun 12 aylık süre boyunca yüksek stabilite gösterdiği kanıtlanmıştır. İki yıllık bir saha deneyi sonucunda, söz konusu bakteri preparatının, gerek yeni kanser oluşumlarını gerekse daha önceden oluşmuş yerleşik kanserleri azalttığı, denemelerde kullanılan standart fungusit thiophanate-methyl ile benzer bir etkinlik sergilediği belirlenmiştir. Ayrıca, bakteri preparatının etkinliği, *C. cathayensis* fidelerinde fenilalanin amonyak liyaz (PAL), polifenol oksidaz (PPO) ve peroksidaz (POX) üretimini büyük ölçüde teşvik ettiği, bu enzimlerin uygulamadan 2 gün sonra maksimum seviyelere ulaştığı, deneysel değerlendirme dönemi boyunca gövde içindeki fenol içeriklerini arttığı gözlemlenmiştir. Özetle, *P. polymyxa* cinsi CF05 izolatının karboksimetilselüloz formülasyonunun, *C. cathayensis* gövde kanserinin engellenmesinde güçlü, çevre dostu ve etkili biyokontrol yöntemi olduğu bildirilmiştir.

Andreolli ve ark. (2019), Kuzey İtalya Bölgesinde yer alan Brescia ormanlarının topraklarından elde ettikleri *Pseudomonas* sp. MP12 izolatını yaptıkları moleküler analizler sonucunda *Pseudomonas protegens* olarak tanılamışlardır. Elde edilen *Pseudomonas protegens* MP12 izolatının bağlarda sorun olan fungal hastalık etmenlerinden *Botrytis cinerea*, *Alternaria ternata*, *Aspergillus niger*, *Penicillium expansum* ve *Neofusicoccum parvum*'a karşı geniş spektrulu antifungal etkinlik gösterdiğini belirlemişlerdir. Bakteri tarafından fungal etmenlere karşı gösterilen antifungal etkinlikten sorumlu bileşiklerin, 2,4-diacetylphloroglucinol (2,4-DAPG), pyoluteorin ve pyrrolnitrin'in sorumlu olduğunu, antagonist bakteri izolatının ayrıca siderophore, amonyak, indole-3-asetik asit ürettiği ve fosforu çözmede etkinlik gösterdiğini belirlemişlerdir. Antagonist bakteri izolatının bu fungal etmenlerin yanı sıra kimyasal mücadelesi olmayan esca hastalık etmenlerinden *Phaeomoniella chlamydospora* ve *Phaeoacremonium aleophilum*'ya etkili olması nedeni ile endofit bakterinin bağlarda sorun olan bu fungal hastalıklara karşı potansiyel biyokontrol ajanı olduğunu ve hastalıkla mücadelede kullanılabileceğini önermişlerdir.

Trotel-Aziz ve ark. (2019), asmada yıkıcı hastalığa neden olan *Botryosphaeria* geriye ölüm hastalık kompleksi etmenlerinden *Neofusicoccum parvum*'un mücadelesinde biyokontrol etmeni olarak *Bacillus subtilis* PTA-271 izolatını kullandıkları çalışmalarında, bakteri izolatının uygulandığı asma ağaçlarında hastalık etmenine karşı β -1,3-glukanaz'ı aktive eden PR2 geninin uyarılması sonucunda bitkide dayanıklılığın yüksek düzeyde teşvik edildiğini belirlemişlerdir. Yapılan *in vitro* çalışmalarında PR2 geninin yanısıra salisilik asit-jasmonik asit geni ile GST1 (glutathione-S-transferase) geninde harekete geçirildiği görülmüştür. Elde edilen sonuçlara göre, söz konusu bakteri izolatı bitkide dayanıklılık genlerini uyarmasının yanı sıra, fungal etmen tarafından oluşturulan fitotoksinleri detoksifiye etmek suretiyle etkinlik göstermiştir.

Castro ve ark. (2020), mango meyvelerinde hasat sonrası çürümelere neden olan *Botryosphaeria* hastalık etmenlerinden *Lasiodiplodia theobromae* ve *Neofusicoccum parvum*'a karşı hasat öncesinde *Saccharomyces cerevisiae* ESA45, *Saccharomyces* sp. ESA46, *Saccharomyces* sp. ESA47 ve *Pichia kudriavzevii* CMIAT171 olmak üzere 4 farklı antagonist maya izolatının bahçe koşullarında uygulanmasının hasat sonrası meyve çürümelerine olan etkisini araştırdıkları çalışmalarında, 4 maya izolatının hasat sonrası hastalık çıkışının engellenmesinde oldukça etkili olduklarını, maya izolatları içinde *Pichia kudriavzevii* CMIAT171 izolatın hastalık şiddetini %69.4 oranında azaltan en etkili izolat olduğunu belirlemişlerdir.

Khan ve ark. (2020), tarafından yapılan çalışmada, *Lilium wardii* bitkisinin soğanlarından *Bacillus stratosphericus* türüne ait yeni bir endofit bakteri izolatı (*Bacillus stratosphericus* LW-03) izole etmişler ve bu türe ait bakteri izolatın, *Fusarium oxysporum*, *Botryosphaeria dothidea*, *Botrytis cinerea* ve *Fusarium fujikuroi* gibi yaygın bitki patojenlerine karşı antifungal etkinlik sergilediğini belirlemişlerdir. Söz konusu izolatın test edilen fungal etmenlerden *Botryosphaeria dothidea*'ı %74.56, *Botrytis cinerea*'yı %71.91, *Fusarium fujikuroi*'ı %69.54 ve *Fusarium oxysporum*'u %65.13 oranlarında engellediği tespit edilmiştir. *Bacillus stratosphericus* LW-03 izolatının organik asit üretimi, ACC deaminaz, indol-3-asetik asit (IAA), siderofor ve nitrojen fiksasyon aktivitesi dahil olmak üzere birçok bitki büyümesini teşvik edici özellik sergilediği belirlenmiştir. Araştırmacılar ayrıca sera koşullarında iki zambak çeşidinin üzerinde endofit bakteri izolatının bitki gelişimi üzerine olan etkileri değerlendirmişlerdir. Sonuç olarak, muamele edilmemiş kontrol bitkilerine kıyasla

bakteri ile muamele edilmiş bitkilerde bitki büyümesinin teşvik edildiği ortaya konulmuştur. *Bacillus stratosphericus* LW-03'ün geniş spektrumlu antifungal aktivitesinin yanısıra bitki büyümesini çeşitli mekanizmalarla teşvik edici özelliklerinden dolayı söz konusu izolatın sürdürülebilir tarımda gerek biyolojik gübre olarak gerekse biyolojik kontrol etmeni olarak kullanılabileceği belirlenmiştir.



3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

Çalışmanın temel araştırma materyallerini; hastalıklı ceviz, Antep fıstığı ve badem ağaçlarından izole edilen fungal hastalık etmenleri *Botryosphaeria dothidea*, *Neofusicoccum parvum*, *Neoscytalidium dimidiatum* izolatları, sağlıklı bitkilerden izole edilen bakteri izolatları, çeşitli laboratuvar malzemeleri ve besi yerleri oluşturmuştur.

3.1.1. Çalışmada Kullanılan Fungal ve Bakteriyel İzolatlar, Kimyasal, Alet ve Ekipmanlar

Çalışmanın ana materyalini oluşturan fungal *Botryosphaeria dothidea* ve *Neofusicoccum parvum* Hatay ilinde yetişen ceviz ağaçlarından *Neoscytalidium dimidiatum* Nizip ilçesinde yetişen Antep fıstığı ağaçlarından alınan hastalık belirtisi gösteren dokulardan Patates Dekstroz Agar (PDA) besi yeri üzerine daha önceden yapılan çalışmalarda izole edilmiştir (Kurt ve ark., 2020; Kara ve ark., 2021). Rutin *in vitro* çalışmalarda kullanılan hastalık etmenlerin tek spor izolatları PDA besi yerinde, +4 °C de muhafaza edilmiştir. Çalışmanın bir diğer ana materyalini oluşturan, hastalık etmenlere karşı etkinliği araştırılmış antagonist endofit ve epifit bakteri izolatları hastalık etmeninin yoğun görüldüğü Antep fıstığı, ceviz ve badem ağaçlarının yetiştirildikleri bahçelerdeki sağlıklı ağaçlardan, fındık izolatları ise gerek Karabük ve Giresun illerinden Bölüme gönderilen bitki örneklerinden, gerekse Erzin ilçesinin dağlık alanlarında doğal olarak yetişen sağlıklı ağaçların yaprak, gövde ve kök bölgelerinden içsel (endofit) ve yüzeysel (epifit) dokulardan izole edilmiştir.

Çalışmanın diğer materyallerini mikoloji ve bakteriyoloji laboratuvarında rutin olarak kullanılan alet-ekipmanlar, çeşitli cam ve plastik laboratuvar malzemeleri ve kimyasal maddeler oluşturmuştur.

3.1.2. Çalışmada Kullanılan Besi Yerleri

Fungal hastalık etmenleri ile antagonist bakteriyel etmenlerin izolasyonu, tanımları ve etkinliklerinin belirlendiği çalışmalarda kullanılan besi yerleri arasında

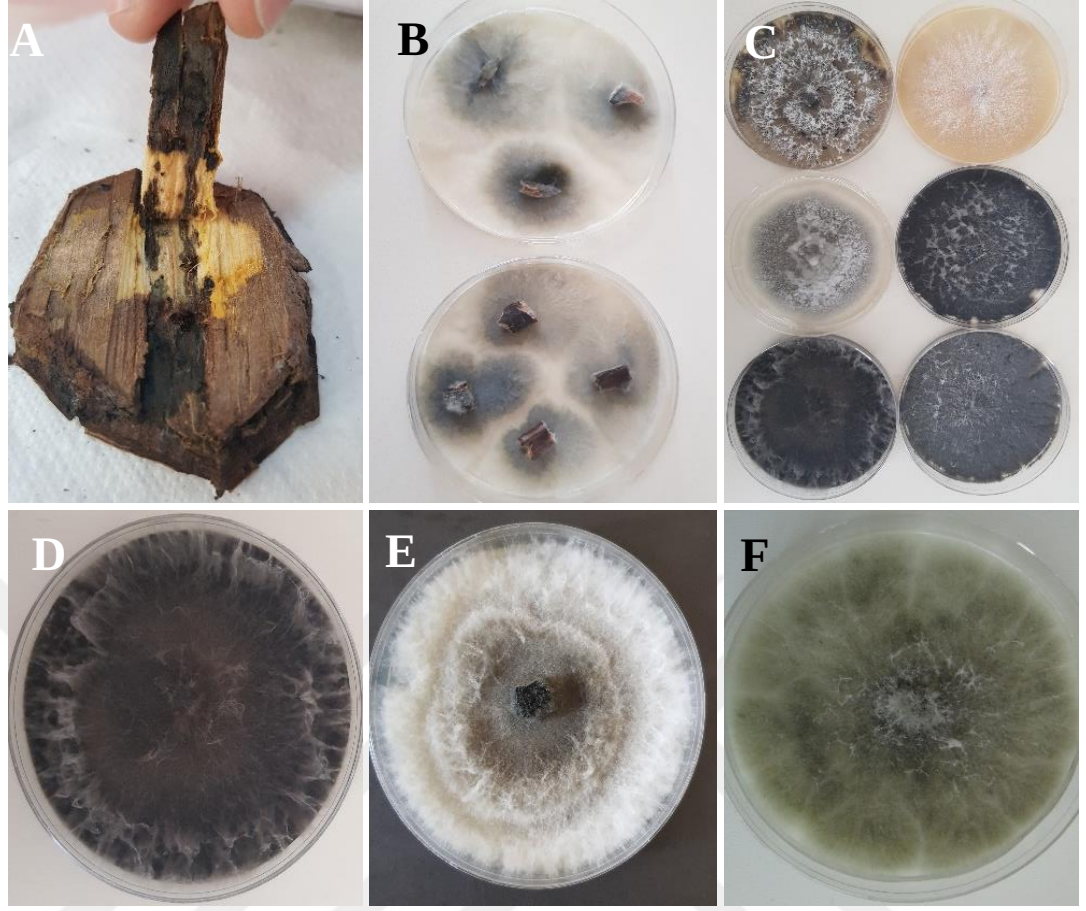
Patates Dekstroz Agar (**PDA**), King's B Agar (**KB**), Trypic Soybean Agar (**TSA**), Luria Broth (**LB**) ve Pepton Water (**PW**) ticari olarak (Merck, Darmstad, Germany) satın alınmak suretiyle laboratuvar çalışmalarında kullanılmıştır. Denemelerde kullanılan besi yerlerinin kimyasal içerikleri ayrıca Ek-1 de verilmiştir.

3.2. Yöntem

3.2.1. Fungal Hastalık Etmenlerinin İzolasyonu ve Tanılanması

Çalışmalarda kullanılan fungal hastalık etmenleri *Botryosphaeria dothidea* ve *Neofusicoccum parvum* Hatay ilinde yetişen ceviz ağaçlarından, *Neoscytalidium dimidiatum* Nizip ilçesinde yetişen Antep fıstığı ağaçlarından alınan hastalık belirtisi gösteren dokulardan (Şekil 3.1) Patates Dekstroz Agar (**PDA**) besi yeri üzerinde izole edilmiş olup, tür teşhisleri gerek morfolojik gerekse moleküler yöntemlerle yapılmıştır (Kurt ve ark., 2020; Kara ve ark., 2021).

Hastalıklı bölgelerden temin edilen şüpheli belirti gösteren dallar steril kabin içerisinde aseptik olarak ikiye ayrılmış, enfekteli doku parçaları, sağlam dokuyu da içerecek şekilde 5-10 mm büyüklükte kesilerek içerisinde 50 µg ml⁻¹ streptomisin sülfat antibiyotik bulunan PDA besi yeri üzerinde izole edilmişlerdir. Ekimi yapılan petriler 24°C'de 3-5 gün inkubasyona bırakılmıştır. Besi yerleri üzerinde dokulardan gelişen fungal izolatların uç kısmından alınan misel parçaları yeni besi yerlerine aktarmak suretiyle saflaştırılmıştır. Hastalık etmeninin morfolojik ve moleküler tanılamaları türe spesifik morfolojik tanılama anahtarlarının (Crous ve ark., 2006; Qiu ve ark., 2008; Slippers et al. 2004; yanısıra Internal Transcribed Spacers (**ITS**) rDNA ve β-Tubulin (**TUB2**) gen bölgelerine spesifik ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') ve ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') primer çifti ile Bt2a (5'-GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC-3') ve Bt2b (5'-ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC-3') primer çifti (White ve ark., 1990; Glass ve Donaldson, 1995) kullanılmak suretiyle gerçekleştirilmiştir (Kurt ve ark., 2020; Kara ve ark., 2021). Denemelerde, morfolojik ve moleküler tanılamaları yapılmış 3 fungal izolatın tek spordan elde edilmiş kültürleri kullanılmıştır.



Şekil 3.1. Hastalıklı ceviz gövdesinden (A) hastalık etmenin PDA besi yeri üzerine izolasyonu (B ve C). *Neoscytalidium dimidiatum* (D), *Neofusicoccum parvum* (E) ve *Botryosphaeria dothidea* (F) izolatların tek spor kültürleri

3.2.2. Aday Epifit ve Endofit Bakterilerin Sağlıklı Ağaçların Farklı Kısımlarından İzolasyonu ve Tanılanması

Biyolojik mücadele etkinliği araştırılan aday epifit ve endofit antagonist/PGPB karakterli bakteriler sağlıklı ceviz, badem, Antep fıstığı ve fındık gibi sert kabuklu meyve ağaçların kök, gövde, dal, ham meyve ve yapraklarından elde edilmiştir (Şekil 3.2). Özellikle hastalık belirtilerin gözlemlendiği ağaçların yanında hastalığın görülmediği ağaçlardan güdümlü örneklemeler yapılmıştır. Hastalığın gözlemlendiği bahçelerdeki sağlıklı ağaçlardan temin edilen örnekler laboratuvara getirilip aşağıdaki izolasyon yöntemleri kullanmak suretiyle aday epifitik ve endofitik bakteri izolatları izole edilmiştir

3.2.2.1. Aday Epifit ve Endofit Bakterilerin İzolasyonu

Etkinliği araştırılan aday endofit ve epifit bakterilerin izolasyonunda kullanılan sağlıklı bitki örnekleri araziden temin edildikten sonra, farklı bitki kısımlarına göre ayrıştırılıp kodlanmıştır. Aday endofit bakteri izolasyonundan önce, bitki materyalleri yüzey kontaminantlarından arındırmak amacıyla ilk aşamada temiz çeşme suyu ile iyice yıkanıp ardından, 3 dakika %70'lik etil alkolde, daha sonrada 2 dakika %2'lik sodyum hipoklorit solüsyonunda bekletilmiştir. Üzerindeki çamaşır suyu/alkolü uzaklaştırmak için örnekler 5 kez steril saf su ile yıkanarak yüzey dezenfeksiyonu aşaması tamamlanmıştır. Yüzey dezenfeksiyonu yapılan bitki kısımlarından alınan sağlıklı bitki dokuları steril 0.05 mM MgCl₂ tampon çözeltisi içinde steril havan içerisinde iyice ezildikten sonra 5 dak. bekletilmiştir. Daha sonra buradan alınan süspansiyon seri olarak sulandırıldıktan (10², 10³, 10⁴, 10⁵ ve 10⁶) sonra seçici KB besi yeri içeren petri kaplarına bagetle yayılmıştır. Klasik izolasyonların yanı sıra, meyve ve gövde içerisinden yapılan endofit izolasyonlarında imprint (baskılama) yöntemi kullanılarak doğrudan bitki dokularından izolasyonlar yapılmıştır. Bu yöntemde, yüzey dezenfeksiyonu yapılmış meyve, dal ve gövdeler aseptik olarak ikiye ortadan kesilmiş, dokuların iç yüzeyleri doğrudan besi yerlerine sürülerek izolasyonları yapılmıştır (Atay, 2019).

Aday epifit bakterilerin izolasyonunda endofitlerin izolasyonundan farklı yöntem izlenmiştir. Ayrı ayrı kodlanmış sağlıklı bitki kökleri, yaprak, gövde, dal ve ham meyveleri alındıktan sonra, dezenfeksiyon amaçlı herhangi bir ön yıkama işlemine tabi tutulmadan, 1-2 cm boyunda kesildikten sonra (5 gr) doğrudan steril 0.05 mM MgCl₂ tampon çözeltisi (yaklaşık 50 ml) içine konulup, 30 dak. 200 rpm orbitaı çalkalayıcı içerisinde çalkalamaya bırakılmış, daha sonra buradan alınan süspansiyonlar seri olarak sulandırıldıktan (10², 10³, 10⁴, 10⁵ ve 10⁶) sonra KB besi içeren petri kaplarına bagetle yayılmıştır.

Bakterilerin ekimlerinin yapıldığı tüm petriler 26 °C'de 2 gün inkübasyona bırakıldıktan sonra, seçici besi yerlerinde gelişen bitki örneğini/bölgeyi temsil edecek sayıda morfolojik olarak birbirinden farklı görünüşteki tek bakteri kolonilerden daha sonra teşhis ve biyoetkinlik denemelerinde kullanılmak üzere TSA besi yerleri üzerinde saflaştırmalar yapılmıştır. Seçilmiş her bir izolat, rutin çalışmalar için uygun besi yeri

içeren petri kabında (6 cm) veya eğik Agarda +4 °C de kısa süreli veya steril %40 lık steril Gliserol içeren Cryo Eppendorf tüpler içerisinde -80 °C de saklanmıştır.

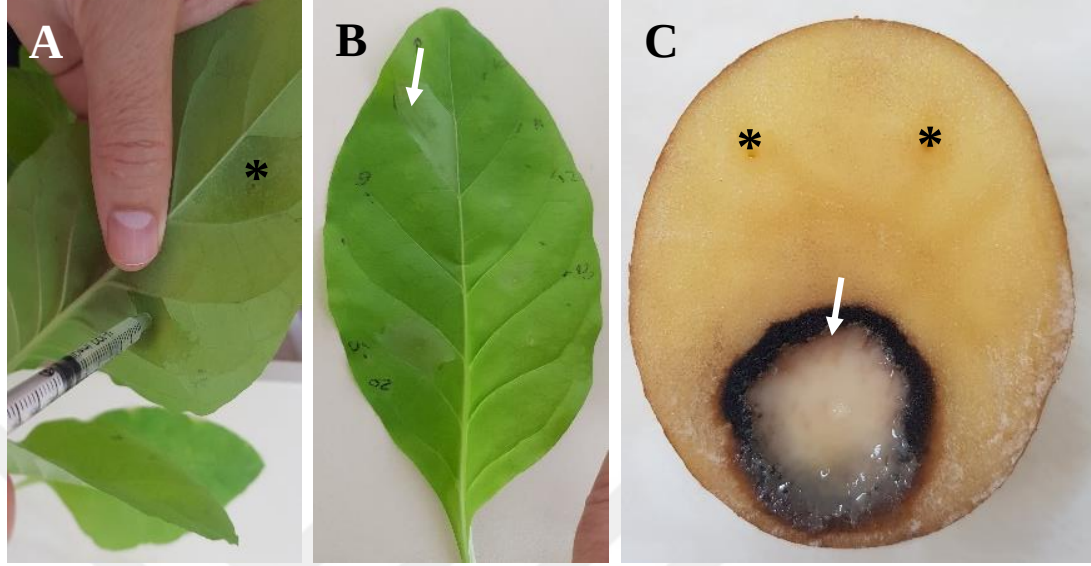


Şekil 3.2. Sağlıklı Antep fıstığı, ceviz, badem gibi sert kabuklu meyve ağaçlarının kök, gövde, dal, yaprak ve meyvelerinden besi yeri üzerine epifit ve endofit bakteri izolatların izolasyonu

3.2.2.2. Aday Epifit ve Endofit Bakteri İzolatlarının Seçimi

Farklı konukçu bitkilerinden elde edilen, bölgeyi/bitki örneğini temsil edecek şekilde seçilmiş olan aday tüm epifit ve endofit bakteri izolatları çalışma öncesinde tütün bitkisinde aşırı duyarlılık (HR) testine tabi tutulmak suretiyle bitki patojeni olup olmadığını belirlenmiştir (Şekil 3.3A,B). TSA besi ortamında gelişen 2 günlük saf aday bakteri izolatları ile bitki patojeni *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* Php12 kültürlerinden 0.05 mM MgCl₂ tampon çözeltisi içinde 10⁸ hücre/ml yoğunluğunda bakteri süspansiyonları hazırlanmıştır. Süspansiyonlar 8 haftalık genç tütün (*Nicotiana*

tobaccum) yapraklarındaki damar aralarının alt yüzeylerine steril enjektör ile enjekte edilmiştir.



Şekil 3.3. (A ve B) Endofit ve epifit bakteri izolatlarla yapılan (A) tütün yaprağında aşırı duyarlılık testi. Enjekte edilen yerlerde (*) sadece patojen izolat HR reaksiyonuna (ok) neden olurken diğer izolatlar herhangi bir reaksiyona neden olmamıştır. (C) patates dilimleri üzerinde yumuşak çürüklük testi. İnokulasyon noktalarında (*) sadece patojen yumuşak çürüklük belirtisi (ok) oluşturmuştur

İnokule edilen bitkiler 25 °C, İnokulasyondan 24-48 saat sonra inokule edilen alanlarda oluşan nekrotik görünüm pozitif (test edilecek izolatın bitki patojeni olduğunu gösterir) olarak kabul edilmiştir (Lelliot ve Stead, 1987).

Tütünde HR negatif sonuç veren aday bakteri izolatları ile patates dilimi üzerinde yumuşak çürüklük testi yapılmıştır. Sağlıklı patates yumruları öncelikle %3'lük NaOCl'de 1 dakika bekletilerek yüzey dezenfeksiyonu yapıldıktan sonra kabukları soyulmuş ve steril bistürü ile 2 cm kalınlığında dilimlenmiştir. Aseptik olarak elde edilen patates dilimleri steril nemli filtre kâğıdı içeren plastik saklama kaplarında bulunan steril petri kapakları üzerine yerleştirildikten sonra üzerlerine steril kürdan ile 2 günlük taze HR negatif bakteri izolatları bulaştırılmıştır (Şekil 3.3C). Bulaştırılan dilimleri bulunduğu petriler 26 °C'de 2 günlük inkübasyona bırakıldıktan sonra inokulasyon noktasında yumuşak çürüklük belirtileri yönünden değerlendirilmiştir (Lelliot ve Stead, 1987). Kontrol olarak Bitki Sağlığı Kliniği Kültür Koleksiyon Merkezinden temin edilen *Pectobacterium caratovororum* izolatı kullanılmıştır.

Gerek Tütün HR gerekse patates yumuşak çürüklüğü testinde negatif sonuç veren izolatların aynı zamanda insan patojeni olup olmadığının belirlenmesi amacıyla, izolatlar TSA besisi 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 bakteri izolatları olarak kullanılmıştır.

3.2.2.3. Aday Epifit ve Endofit Bakteri İzolatlarının Tanılanması

Tütün bitkisinde HR ve patates dilimleri üzerinde yumuşak çürüklük testlerinde negatif reaksiyon veren, 37 °C gelişmeyen aday bakteri izolatlarının Gram reaksiyonları klasik KOH testi ile belirlendikten sonra, kesin tür teşhisleri Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Bitki Sağlığı Kliniği Araştırma Merkezinde, MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany) cihazında tavsiye edilen yöntemler kullanılarak yapılmıştır (Aktan ve Soylu, 2020). Tryptic Soy Agar (TSA) besisi ortamında gelişmiş 2 günlük saf bakteri kolonisinden steril kürdan yardımıyla alınan bakteri kütlesi 300 µl steril su içeren eppendorf tüplerine eklenmek suretiyle bakteri süspansiyonu elde edilmiştir. Bu tüplerin üzerine 900 µl saf etanol (Merck, Damstrad, Germany) eklendikten sonra karışım 13.000 rpm’de 2 dak. süreyle santrifüj edilmiş, üsteki alkolün (süpernatant) tamamı pipet yardımıyla alındıktan sonra altta kalan pellet oda sıcaklığında yaklaşık 5 dak. bekletilmek suretiyle kurumaya bırakılmıştır. Pellet kuruduktan sonra üzerine üzerine %70 formik asit’ten 30 µl eklenerek vortekslenmiş, vortekslenen tüplere bu kez 30 µl acetonitril eklendikten sonra karışım tekrar vortekslenmiştir ve 13.000 rpm’de 2 dak. süreyle santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası üst sıvıdan (süpernatant) dan 1 µl alınan bakteri ekstraktı cihazın metal örnek plakasındaki (target) noktalara iki tekrarlı olacak şekilde mikropipetle eklendikten sonra oda sıcaklığında yaklaşık 3-5 dak. bekletilmek suretiyle kuruması sağlanmıştır. Kuruyan örneklerin üzerine 1 µl HCCA Matrix (α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid) solüsyonu eklendikten sonra analiz için tekrar 2-3 dak. daha oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Kuruma işlemi tamamlanmış örnekler MALDI-TOF MS (Microflex LT; Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany) cihazına yüklendikten sonra elde edilen protein spektralleri cihazın mikroganizma kütüphanesinde yüklü olan kesin tür tanısı moleküler olarak belirlenmiş bakteri türlerin spektralleriyle cihazın yazılımı (BIOTYPER™ 1.1 software (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany) ile eşleştirilmek suretiyle tür tanılamaları

yapılmıştır (Aktan ve Soylu, 2020). MALDI-TOF cihazı tarafından belirlenen bakteri izolatların teşhisleri firma tarafından önerilen değerlere göre; skor değeri 2.30-3.0 aralığında belirlenen bakteri izolatının “*tür düzeyinde oldukça güvenilir olduğu*”; 2.00-2.299 aralığında “*cins düzeyinde güvenilir, tür düzeyinde yüksek güvenilir olduğu*”; 1.70-1.999 arasında tanının “*cins düzeyinde güvenilir, tür olarak muhtemel düzeyde olduğu*”; 1.70 değerinden aşağı olan değerler ise “*güvensiz tanı*” olarak değerlendirilmiştir.

3.2.3. Aday Epifit ve Endofit Bakteri İzolatlarının Fungal Hastalık Etmenlerine Karşı *in vitro* Antagonistik Etkinliğinin Değerlendirilmesi

Farklı sağlıklı sert kabuklu meyve ağaçlardan elde edilip tanılması yapılan aday bakteri izolatlarının hastalık etmenleri, *Neoscytalidium dimidiatum*, *Neofusicoccum parvum* ve *Botryosphaeria dothidea* izolatlarının misel gelişimini engelleme (antagonistik) potansiyelleri PDA içeren petri kaplarında (90 mm çapında) önceden bildirildiği gibi ikili kültür testleriyle belirlenmiştir (Aktan, 2018). Tanılaması yapılan aday bakteri izolatları, çizgi ekim yöntemi ile petrinin üst noktasından 2 cm gerisine çizilerek ve 25 °C’de 2 gün süre ile ön inkübasyona bırakılmıştır. Bu sürenin sonunda gelişen bakteri kolonisinden 4 cm gerisine test edilecek 5 günlük fungal kültürlerinden alınan 6 mm çaplı fungus misel diskleri yerleştirilmiştir (Şekil 3.4). Kontrol olarak kullanılan PDA petrilere herhangi bir bakteri izolatı çizilmemiştir. İkili kültür Petrilere 25 °C’de inkübasyona bırakılmış, kontrol petrilinde bulunan fungal hastalık etmeninin petriyi tamamen kaplamasıyla birlikte (fungal etmenlerin gelişmesine bağlı olarak inokulasyondan 4-5 gün sonra), bakterilerin geliştiği tüm petrilere fungal etmenlerin bakteriye doğru yönelen misel gelişimi (MGu) ölçülerek kontrol petrilereki misel (MGk) gelişmesine göre bakteriler tarafından neden olunan %engelleme oranları (%Abbot Formülü) hesaplanmıştır (Ahmed ve ark., 1999).

Aday bakterilerin biyoetkinliği için ölçümlerinde 3 farklı petri kabı kullanılmış olup, etkinlik denemeleri 2 farklı zamanda tekrar edilmiştir.



Şekil 3.4. (A) Epifit veya endofit bakteri izolatının (*) fungal hastalık etmenin misel gelişiminin ikili kültür testleri ile *in vitro* koşullarda engellenmesi (ok). (B) Kontrol petrisinde normal misel gelişimi

3.2.4. Antagonist Epifit ve Endofit Bakteri İzolatlarının Fungal Etmenlerin Misel Gelişimini Engelleyen Bölgelerinin Fungisidal ve Fungistatik Özelliklerinin Belirlenmesi

Fungal etmenlerin misel gelişimini engelleyen antagonist bakterilerin engelleme bölgelerindeki etkinliğin fungisidal veya fungistatik özelliklerinin belirlenmesi amacıyla fungus miseli ile bakteri arasında kalan engelleme bölgesi üzerine 5 günlük sağlıklı fungal misel diskleri (6 mm çapında) yerleştirilmiş ve 3-5 gün tekrar inkübasyona bırakılmıştır. Yerleştirilen sağlıklı misel diski engelleme bölgesinde gelişme göstermemiş ise bu bölgedeki antagonisten ürettiği antimikrobiyal bileşiklerin etkinliği **fungisidal**, gelişme göstermiş ise bu bölgedeki antagonisten ürettiği antimikrobiyal bileşiklerin etkinliği **fungistatik** olarak kayıt edilmiştir.

3.2.5. Fungal Etmenlerin Misel Gelişimi Üzerine Epifit ve Endofit Bakteri İzolatlarının Uçucu Bileşenlerinin *in vitro* Antagonistik Etkinliğinin Belirlenmesi

İkili kültür testlerinde yüksek antagonistik etkinlik gösteren bazı izolatların oluşturdukları uçucu bileşen(ler)in hastalık etmenlerinin misel gelişimini engelleme (antagonistik) potansiyelleri “kapalı ikili kültür” testlemeleriyle (sealed plate method)

daha önceden bildirilmiş yöntemle göre belirlenmiştir (Fiddman ve Rossall, 1993). Petri kapaklarının birine PDA, diğerine TSA besi yeri dökülüp donduktan sonra bakteri izolatları, zig zak çizgi ekim yöntemi ile TSA besi yeri içeren petrinin üst kapağına çizilmiş, bakteri çizimi yapılan petrinin PDA içeren alt kapağına test edilen funguslardan alınan 5 günlük 6 mm çaplı fungus misel diskleri yerleştirilmiş ve 2 kapak birbirlerine bakacak şekilde birleştirilip petri kapaklarının kenarları parafilm ile sarılmak suretiyle oluşan uçucu bileşenlerin ortamdan uzaklaşması engellenmiştir. Kontrol petrilere herhangi bir bakteri izolatu çizilmemiştir. Uygulama sonrası petriler 25 °C de inkübasyona bırakılmıştır. Kontrol petrilinde hastalık etmenleri petriyi tamamen kaplamasını müteakiben (fungal etmenlerin gelişmesine bağlı olarak inokulasyondan 4-7 gün sonra), fungal etmenlerin misel gelişimi (MGu) ölçülmüş ve kontrol petrilindeki miselyal (MGk) gelişmeye göre engelleme oranlarının %si hesaplanmıştır (Ahmed ve ark., 1999). Her bakteri-fungus kombinasyonu için ölçümler 3 farklı petri kabında yapılmış, deneme 2 farklı zamanda tekrar edilmiştir.

3.2.6. Aday Epifit ve Endofit Bakteri İzolatlarının Hastalık Etmenlerini Engellemede Kullandıkları Olası Biyokontrol ve Bitki Gelişimini Teşvik Eden Mekanizmalarının Belirlenmesi

In vitro misel gelişimini engelleme etkinliklerine göre bölgeyi/konukçu bitkiyi ve türü temsil edecek şekilde seçilmiş aday bakteri izolatlarının misel gelişiminin engellenmesinde rol oynayan olası mekanizmalardan siderofor, proleatik aktivite (proteaz enzim üretimi), hidrojen siyanür (HCN) ve amonyak (NH₃) üretilmesi gibi biyokontrol etki mekanizmalarının yanı sıra, indol asetik asit (IAA) üretme ve fosforu çözme gibi bitki gelişimini teşvik eden mekanizmaları bölüm 3.2.6.1’de detaylı bir şekilde açıklanan yöntemlere göre belirlenmiştir.

3.2.6.1. Aday Epifit ve Endofit Bakteri İzolatlarının Siderofor, Proteolitik, Hidrojen Siyanür (HCN) ve Amonyak (NH₃) Üretme Potansiyellerinin Belirlenmesi

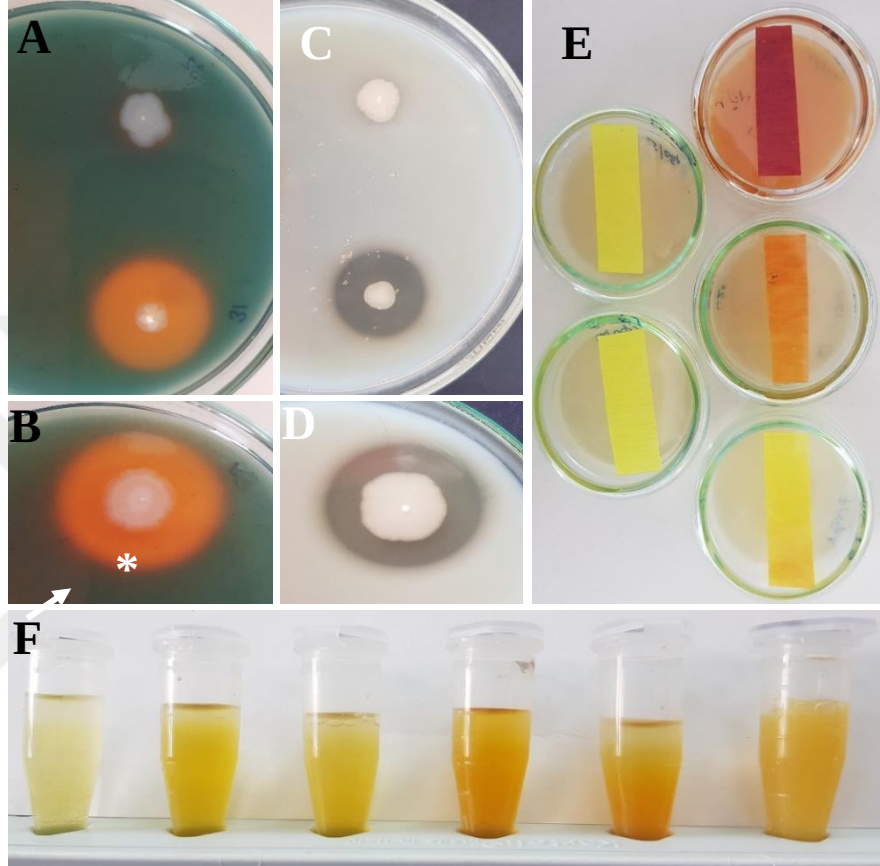
Aday epifit ve endofit bakteri izolatların siderofor üretim potansiyelleri Chrom Azurol-S Agar (CAS) besi yeri üzerinde (Schwyn ve Neilands, 1987), proteaz enzimi üretim potansiyelleri ise içerisinde %2 yağı alınmış süt tozu (Skimmed Milk Powder,

Merck, Darmstadt, Germany) bulunan Luria Broth Agar (SMLBA) besi yeri üzerinde belirlenmiştir (Perneel ve ark., 2007). Her 2 etkinlik belirleme çalışmalarında; test edilen 2 günlük aday bakteri izolat kültüründen steril kürdan ile alınan bakteri inokulumu, CAS ve SMLBA besi yerleri üzerine 3 farklı noktaya nokta ekim şeklinde ekimleri yapıldıktan sonra, 26 °C'de 2 gün inkübasyona bırakılmıştır (Şekil 3.5A,B). İnokulasyondan 2 gün sonra CAS besi yeri üzerine inokule edilmiş bakteri kolonisi etrafında oluşan sarı-turuncu renkteki engelleme bölgesi ile SMLBA besi yeri üzerine inokule edilmiş bakteri kolonisi etrafında gelişen şeffaf engelleme bölgesi bakterinin siderofor ve proteolitik aktivitesi yönünden pozitif olarak kabul edilmiştir. Oluşan zon ile inokulasyon noktasında gelişen bakteri kolonisinin çapları ayrı ayrı ölçüldükten sonra, engelleme zon çapının bakteri koloni çapına oranlanması suretiyle her izolat için Siderofor (Sid-indeks) ve Proteolitik (Pro-indeks) aktivite indeks değerleri ayrı ayrı hesaplanmıştır (Vazquez ve ark., 2000). Her bakteri izolatı için ölçümler 3 farklı petri kabında yapılmış olup, deneme 2 farklı zamanda tekrar edilmiştir.

Aday epifit ve endofit bakteri izolatlarının hidrojen siyanür (HCN) üretim potansiyelleri ise Castric (1977) tarafından bildirilen yöntemle göre belirlenmiştir. Öncelikle aday antagonist bakteri izolatlarının 2 günlük taze kültürlerden steril kürdan yardımıyla alınan bakteri izolatları, 4.4 gr/L glycine içeren TSA besi yeri (6 cm steril cam petrilerde) üzerine zig zak şeklinde tüm yüzeyi kaplayacak şekilde çizilmiştir. Bakteri izolatlarının çizildikleri petrilerin kapağına 1x3 cm şerit halinde kesilmiş steril kaba filtre kağıdı yerleştirildikten sonra filtre kağıtları yaklaşık 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 ıslatılmıştır. Uygulama yapılmış tüm petri kapları kapatıldıktan sonra etrafı parafilm ile sarılarak, petriler 26 °C'de 4 gün inkübasyona bırakılmıştır. Petri kabı kapağındaki filtre kağıdı renginin beyaz/açık sarı renkten kahverengi veya koyu kırmızıya dönüşmesi (Şekil 3.5C) ortamda HCN üretiminin oluştuğunu göstermiştir (Castric, 1977).

Aday epifit ve endofit bakteri izolatlarının geliştikleri sıvı Pepton Water (PW) besiyelerinde amonyak (NH_3) oluşturma potansiyelleri Nessler's çözeltisi ile belirlenmiştir (Cappuccino ve Sherman, 1992). Test edilen bakteri izolatlarının 2 günlük taze kültüründen steril kürdan ile alınan bakteri inokulumu, içerisinde steril 5 ml PW içeren cam tüplere bulaştırılmıştır. Bakteri ile bulaştırılmış tüpler 26 °C'de 150 rpm'e ayarlı inkübatörlü orbital çalkalayıcıda 4 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Sıvı besi

yerinde gelişen bakterilerin üzerlerine 250 µl Nessler's çözeltisi ilave edildikten sonra besi yeri içerisinde bakterilerce oluşturulan amonyak konsantrasyonu tüplerdeki besi yeri renginin açık sarıdan kahverengi-koyu sarı renge dönüşmesiyle belirginleşmiştir (Şekil 3.5D).



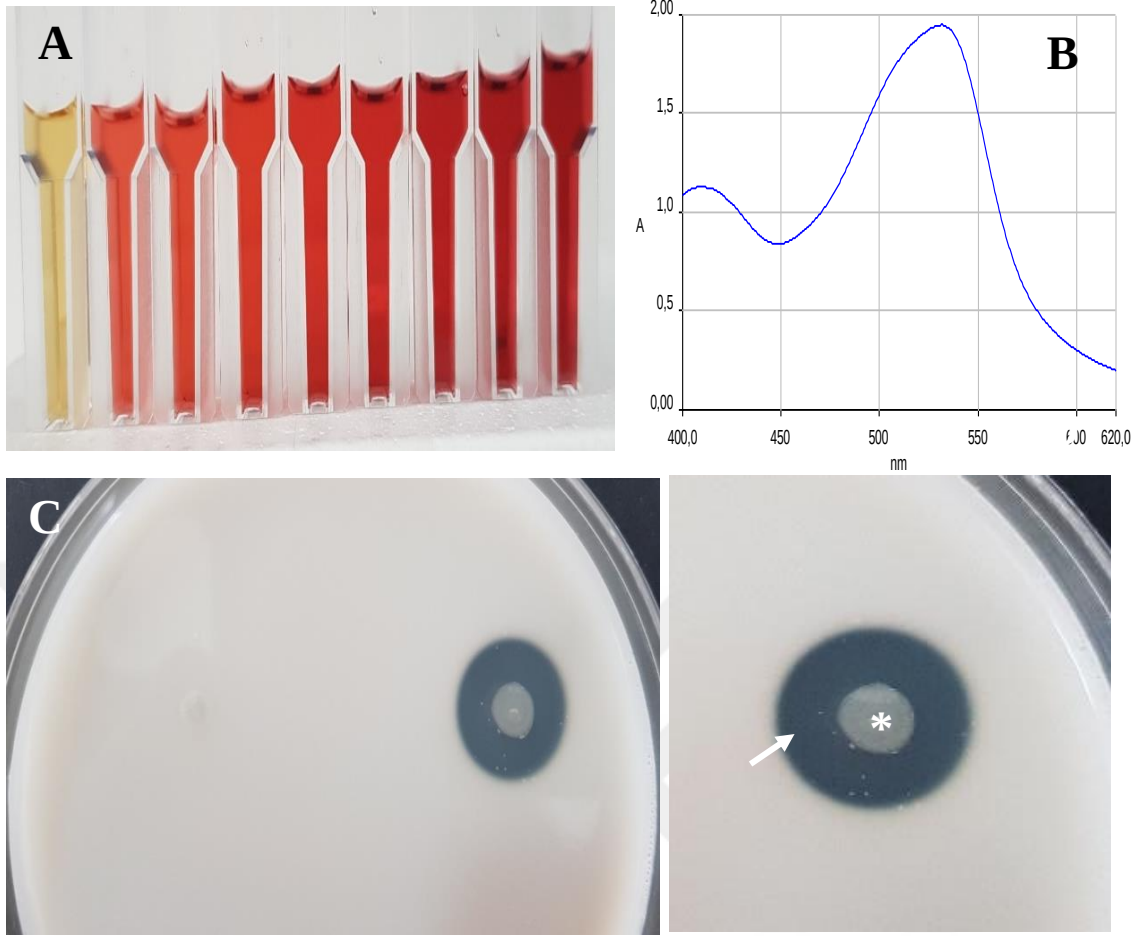
Şekil 3.5. Epifit ve endofit bakterilerin (A, B) siderofor, (C, D) proteaz enzimi (proteolitik), (E) hidrojen siyanür (HCN) ve (F) amonyak üretme potansiyellerinin belirlenmesi. Siderofor ve proteaz bileşiklerin indeks değerleri oluşan zon çapı (ok) büyüklüğünün bakteri koloni çapına (*) kıyaslanmak suretiyle kantitatif olarak hesaplanmıştır. HCN ve amonyak birikimi, petri kapağındaki filtre kağıdı (E) ile eppendorf içindeki besi yeri (D) renk değişim şiddetine göre kalitatif olarak belirlenmiştir

3.2.6.2. Aday Epifit ve Endofit Bakteri izolatlarının İndol Asetik Asit (IAA) Üretme ve Fosforu Çözme Potansiyellerinin Belirlenmesi

Aday epifit ve endofit bakteri izolatlarının bitki gelişimini teşvik etmede rol oynayan olası mekanizmalardan IAA üretme ve fosforu çözme potansiyellerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar, bu mekanizmalara spesifik besi ortamları üzerinde

yürütülmüştür. Aday bakteri izolatlarının IAA üretme potansiyelleri Salkowski yöntemi kullanılmak suretiyle belirlenmiştir (Glickman ve Dessaux, 1995). Bakteri izolatının 2 günlük taze kültürlerinden hazırlanan 500 µl bakteri süspansiyonu (10^8 hücre/ml) içerisinde L-tryptophan (3 mg ml^{-1}) içeren 5 ml steril LB besi yerlerine inokule edilmiştir. L-tryptophan içermeyen besi yeri kontrol uygulama olarak değerlendirilmiştir. Bakteri izolatları ile bulaştırılan tüpler 30°C 'de 200 rpm'e ayarlı inkübatörlü orbital çalkalayıcıda 4 gün inkübasyona bırakılmıştır. Sıvı besi yerinde gelişen bakteriler 5000 rpm'de 30 dak. santrifüj yapıldıktan sonra üstte kalan supernatant'tan 1 ml alınarak steril eppendorf tüplere aktarılmış, üzerlerine 2 damla (yaklaşık 40 µl) fosforik asit ilave edilmiştir. Hazırlanan bu karışımın tamamı daha sonra içerisinde 2 ml Salkowski çözeltisi (150 ml %98'lik H_2SO_4 , 250 ml of distile H_2O , 7.5 ml of 0.5 M $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) bulunan steril cam tüplere aktarılmış ve inkübatörler içerisinde karanlık ortamda 25°C 'de 30 dak. inkübasyona bırakılmıştır. Tüplerdeki besiyerlerinde IAA üretimi, besi yeri renginin açık sarıdan kırmızı-pembe renge dönüşmesiyle belirginleşmiş (Şekil 3.5A), oluşan IAA miktarları (beklemeden 30 dakika içinde) 535 nm dalga boyuna ayarlı UV-vis spektrofotometre (Perkin Elmer, Lamda 25, USA) kullanılarak kantitatif olarak belirlenmiştir (Patten ve Glick, 2002). Elde edilen absorbans değerleri, bilinen IAA (Merck, Darmstadt, Germany) çözeltisi ile hazırlanan standart IAA konsantrasyon eğrisiyle karşılaştırılmak suretiyle µg/ml (ppm) düzeyine dönüştürülmüştür.

Aday bakteri izolatlarının fosfor çözme etkinliği ise tri kalsiyum fosfat içeren Pikovskaya Agar (PVK) besi yeri içeren (Ek-2) petrilere belirlenmiştir (Kumar ve ark., 2012). Test edilecek olan bakteri izolatların 2 günlük taze kültüründen steril kürdan ile alınan bakteri inokulumu, PVK Agar ortamı üzerine aşılanmış ve petrilere 26°C 'de 7 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnokulasyondan 5 gün sonra bakteri kolonisi etrafında şeffaf bir zon (engelleme bölgesi), bakterinin fosfor çözme yeteneği için pozitif olarak kabul edilmiştir (Şekil 3.5B). Oluşan zon ile inokulasyon noktasında gelişen bakteri kolonisinin çapları ayrı ayrı ölçüldükten sonra, engelleme zon çapının bakteri koloni çapına oranlanması suretiyle her izolat için fosfor çözme (Fos-indeks) aktivite İndeks değerleri hesaplanmıştır (Vazquez ve ark., 2000). Her bakteri izolatı için ölçümler 3 farklı petri kabında yapılmış olup, deneme 2 farklı zamanda tekrar edilmiştir.



Şekil 3.6. Endofit ve epifit bakteri izolatları tarafından IAA üretme ve fosforu çözme potansiyellerinin belirlenmesi. (A) Farklı konsantrasyonlardaki IAA'ın besi yerinde oluşturduğu renk değişimi. (B) *Enterobacter cloacae* NKC8en tarafından üretilen IAA spektrumu (C ve D) Endofit ve epifit bakteri izolatları tarafından besi yerinde fosforu çözme potansiyellerinin belirlenmesi. fosforu çözme indeks değerleri zon çapı (ok) büyüklüğü bakteri koloni çapına (*) kıyaslanmak suretiyle kantitatif olarak hesaplanmıştır

3.2.7. Deneme Deseni ve İstatistik Analizler

Bakterilerle yapılan tüm *in vitro* biyoetkinlik denemeleri tesadüf parselleri deneme desenine göre, her bir bakteri izolatu için 3 tekerrür olacak şekilde kurulmuştur. Biyokontrol etkinlik çalışmalarının yapıldığı petrilerdeki misel gelişiminin engellenme oranları %oranlarına çevrilmeden IBM SPSS istatistik programı (SPSS Statistics 17.0) kullanılarak tek yönlü ANOVA ile varyans analizi yapılmış ve izolatlar/fungal etmenler arasındaki farklılık Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi ile analiz edilmiştir ($P \leq 0.05$).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. Sağlıklı Sert Kabuklu Meyve Ağaçların Farklı Bitki Kısımlarından Aday Epifit ve Endofit Bakteri İzolatlarının İzolasyonu ve Tanılanması

Botryosphaeria geriye ölüm hastalık etmenlerinden *Botryosphaeria dothidea*, *Neofusicoccum parvum* ve *Neoscytalidium dimidiatum* hastalık oluşturduğu bahçelerde bulunan sağlıklı ceviz ve Antep Fıstığı bahçelerinin yanı sıra, hastalık etmenlerin potansiyel konukçularından badem ve fındık ağaçlarının sağlıklı toprak altı (kök, kök boğazı ve köklere yakın topraklardan) ve toprak üstü (kök boğazına yakın gövde, dal, sürgün, yaprak ve ham meyve) aksamlarından elde edilen aday izolatlar, izole edildiği konukçu adı (**C**, ceviz; **B**, badem; **A**, Antep fıstığı; **F**, fındık) ve izole edildiği bölge (**En**, endofit; **Ep**, epifit) şeklinde kodlanmıştır. İzolasyonlar sonucunda, bölgeyi, konukçu bitki kısmı ve izole edildiği petriyi temsil edecek şekilde farklı morfolojik görünümlü 42 adeti endofit (%47.7), 46 adeti ise epifit (%52.3) olmak üzere toplam 88 bakteri izolatı elde edilmiştir (Şekil 3.2).

Elde edilen tüm izolatlarla biyoetkinlik çalışmalarına geçilmeden önce bitkilerde hastalık etmeni olup olmadığını belirlemek amacıyla sağlıklı tütün yapraklarında HR (Şekil 3.3A,B) ve patates dilimlerinde yumuşak çürüklük testleri (Şekil 3.3C) yapılmıştır. Yapılan patojenite testleri sonucunda ve her iki testte negatif sonuç veren 35 adet endofit, 39 adet, epifit olmak üzere 74 aday bakteri izolatın tür düzeyinde tanılamaları MALDI-TOF MS ile yapılmıştır.

Yapılan MALDI-TOF analizler sonucunda indeks değeri 1.7 ve üzerinde olan toplam 74 izolattan 41 tanesi (%55.4) Gram-negatif, 33 tanesininin (%44.6) Gram-pozitif olduğu KOH test çalışmaları sonucunda belirlenmiştir. Tür düzeyinde teşhisi yapılan 74 izolat arasında yer alan *Bordetella petrii*, *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp, *Klebsiella* spp., ve *Staphylococcus* spp, olarak teşhis edilen 24 adet farklı türlere ait izolatların literatürlerde insan patojeni olması nedeni ile denemelerden çıkartılmış ve geri kalan 48 izolat ile çalışılmaya karar verilmiştir.

Tür düzeyinde teşhisi yapılan ve denemelerde kullanılan 48 izolata ait sonuçlar Çizelge 4.1 de sunulmuştur. Elde edilen izolatın 16 tanesi dal-gövde, 15 tanesi kök, 8 tanesi ham meyve, 9 tanesi ise yapraktan izole edilmiştir. İzole edilen izolatların 33 tanesi

endofit, 15 tanesi epifit kökenlidir. Bu izolatların konukçu bitkilere göre dağılımlarına bakıldığında, 15 izolat ceviz ağacından, 14'er izolat Antep fıstığı ve badem ağaçlarından, 5 izolat ise fındık ağacından izole edilmiştir.

Çizelge 4.1. Farklı konukçu türlerinden izole edilen epifit ve endofit bakteri izolatların tanı sonuçları ve genel özellikleri

İzolat Adı	İzole Edildiği Kısım	Konukçu Bitkisi	Gram Reaksiyon*	MALDI Benzerlik İndeksi
<i>Acinetobacter radioresistens</i> NKB12en	Gövde	Badem	-	2.48
<i>Acinetobacter dijkschoorniae</i> NKA8en	Kök	A.fıstığı	-	2.37
<i>Acinetobacter johnsonii</i> NKA11en	Gövde	A.fıstığı	-	2.35
<i>Aurebasidium pullulans</i> NKC5en	Yaprak	Ceviz	Y	1.85
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> NKB6en	Kök	Badem	+	2.06
<i>Bacillus cereus</i> NKC4ep	Kök	Ceviz	+	2.34
<i>Bacillus endophyticus</i> NKB3en	Gövde	Badem	+	2.12
<i>Bacillus halosaccharovorans</i> NKB4en	Kök	Badem	+	2.38
<i>Bacillus mojavensis</i> NKB2ep	Gövde	Badem	+	2.16
<i>Bacillus atrophaeus</i> NKA2en	Meyve	A.fıstığı	+	1.74
<i>Bacillus atrophaeus</i> NKA3en	Gövde	A.Fıstığı	+	2.00
<i>Bacillus megaterium</i> NKA1ep	Gövde	A.fıstık	+	1.20
<i>Bacillus megaterium</i> NKB1ep	Yaprak	Badem	+	2.31
<i>Bacillus mojavensis</i> NKA7en	Kök	A.Fıstığı	+	1.89
<i>Bacillus mycoides</i> NKB9en	Gövde	Badem	+	2.35
<i>Bacillus pumilus</i> NKC14ep	Gövde	Ceviz	+	1.79
<i>bacillus pumilus</i> NKC3en	Kök	Ceviz	+	1.86
<i>Bacillus pumilus</i> NKC6en	Gövde	Ceviz	+	2.08
<i>Bacillus safensis</i> NKA12ep	Kök	A.fıstığı	+	1.74
<i>Bacillus simplex</i> NKA4en	Yaprak	A.fıstığı	+	2.15
<i>Bacillus subtilis</i> NKA5en	Gövde	A.Fıstığı	+	2.19
<i>Bacillus subtilis</i> NKA6en	Kök	A.fıstığı	+	1.96
<i>Burkholderia cepacia</i> NKC15en	Gövde	Ceviz	+	2.37
<i>Enterobacter asburiae</i> NKC11en	Yaprak	Ceviz	-	2.37
<i>Enterobacter bugandensis</i> NKA13en	Meyve	A.fıstığı	-	2.39
<i>Enterobacter bugandensis</i> NKC12ep	Gövde	Ceviz	-	2.03
<i>Enterobacter cancerogenus</i> NKC13ep	Kök	Ceviz	-	2.00
<i>Enterobacter cloacae</i> NKB13ep	Gövde	Badem	-	2.29
<i>Enterobacter cloacae</i> NKC8en	Kök	Ceviz	-	1.73
<i>Herbaspirillum aquaticum</i> NKB14en	Yaprak	Badem	-	2.16
<i>Lelliottia amnigena</i> NKA1en	Meyve	A.fıstığı	-	2.46

Çizelge 4.1. (Devam) Farklı konukçu türlerinden izole edilen epifit ve endofit bakteri izolatların tanı sonuçları ve genel özellikleri

İzolat Adı	İzole Edildiği Kısım	Konukçu Bitkisi	Gram Reaksiyon*	MALDI Benzerlik İndeksi
<i>Micrococcus luteus</i> NKC10en	Kök	Ceviz	+	2.11
<i>Pantoea agglomerans</i> NKC9en	Meyve	Ceviz	-	2.27
<i>Pseudomonas marginalis</i> NKF3en	Meyve	Fındık	-	1.83
<i>Pseudomonas rhodesiae</i> NKB10en	Gövde	Badem	-	2.36
<i>Pseudomonas rhodesiae</i> NKB11ep	Yaprak	Badem	-	2.44
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NKC2ep	Kök	Ceviz	-	2.41
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> NKA10ep	Gövde	A.fıstığı	-	2.30
<i>Pseudomonas cichorii</i> NKC7ep	Meyve	Ceviz	-	2.50
<i>Pseudomonas frederisbergensis</i> NKB7en	Kök	Badem	-	2.00
<i>Pseudomonas korensis</i> NKF2ep	Meyve	Fındık	-	2.40
<i>Pseudomonas migulae</i> NKB8en	Yaprak	Badem	-	1.84
<i>Pseudomonas orientalis</i> NKF1ep	Gövde	Fındık	-	2.15
<i>Rahnella aquatilis</i> NKF4en	Meyve	Fındık	-	2.03
<i>Rhizobium radiobacter</i> NKA9en	Kök	A.fıstığı	-	1.71
<i>Staphylococcus epidermidis</i> NKB5en	Yaprak	Badem	+	1.86
<i>Staphylococcus epidermidis</i> NKF5en	Kök	Fındık	+	2.26
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> NKC1en	Yaprak	Ceviz	-	1.99

* -:Gram negatif; +: Gram pozitif; Y: maya

Elde edilen 39 farklı türe ait bakteri izolatların cins düzeyinde dağılımı incelendiğinde en yaygın izolatların 18 adet ile *Bacillus* cinsine bağlı olduğu türler olup, bunu sırası ile 10 izolatla *Pseudomonas*, 6 izolatla *Enterobacter*, 3 izolatla *Acinetobacter*, 2 izolatla *Staphylococcus* ve 1'er izolatla *Aurebasidium*, *Burkholderia*, *Herbaspirillum*, *Lelliottia*, *Micrococcus*, *Pantoea*, *Rahnella*, *Rhizobium* ve *Stenotrophomonas* cinsleri takip etmiştir.

Tür düzeyinde teşhis edilen 48 izolatın 26 tanesi Gram-negatif (%54.2), 22 tanesi Gram-pozitif (%45.8) türlerinden oluşmuştur. Gram negatif olarak belirlenen toplam 26 izolat arasında, 10 izolat *Pseudomonas* spp. (%38.5), 6 izolat *Enterobacter* spp. (%23.1), 3 izolat *Acinetobacter* (%11.5), 1'er izolat ise (%3.8) *Aurebasidium pullulans*, *Herbaspirillum aquaticum*, *Lelliottia amnigena*, *Pantoea agglomerans*, *Rahnella aquatilis*, *Rhizobium radiobacter* ve *Stenotrophomonas maltophilia* izolatı tür düzeylerinde tanımlanmışlardır. Toplam 22 Gram pozitif izolat arasında, 18 izolat *Bacillus* spp. (%81.8) olarak belirlenirken, bunu 2 izolat ile *Staphylococcus epidermidis* (%11.1),

1'er izolat (%4.5) *Burkholderia cepacia* ve *Micrococcus luteus* olarak tür düzeylerinde tanımlanmışlardır. Söz konusu 48 izolat arasında 5 türün (*Bacillus pumilis*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter bugandensis* ve *Pseudomonas rhodesiae*) hem epifit hemde endofit izolatları elde edilmiştir.

Bitkilerin kök ve toprak bölgesi (rizosfer) ile toprak üstü aksamaları (phylosphere) gerek epifit gerekse endofit olarak yaşayan farklı türlere ait pek çok yararlı fungal, bakteriyel, viral mikrobiomlara konukçuluk eder. Bu tür bölgelerden farklı α , β ve γ Proteobacteria şubesinin yanısıra Firmicutes ve Actinobakteri türlerine ait epifit ve endofit bakteri izolatları elde edilmiş olup, yapılan tanılama çalışmalarında endofit bakteri izolatlarının aynı zamanda bitkilerin farklı kısımlarında epifit olarakta karşılaşılabileceği bildirilmiştir (Hallmann ve ark., 1997; Sturz ve ark., 2000; Rosenblueth ve Martínez-Romero, 2006; Sun ve ark., 2009; Romero ve ark., 2014; Shi ve ark., 2014; Santayo ve ark., 2016). Marquez-Santacruz ve ark. (2010) bitkilerin içsel dokularından izole edilen endofit bakteri izolatların tohum, çelik, aşı gözü gibi bitkisel üretim materyalleri içerisinde gelişebilen toprakta yaşayan rizosfer kökenli bakterilerin alt populasyon grubu olabileceğini bildirmiştir.

4.2. Epifit ve Endofit Bakteri İzolatlarının Fungal Etmenlerin *in vitro* Misel Gelişiminin Engellenmesi üzerine Antagonistlik Etkinliklerinin Belirlenmesi

Tütün yapraklarında ve patates dilimleri üzerinde yapılan patojenisite testlerinde (HR ve patates çürüklük testleri) negatif sonuç veren 48 endofit ve epifit bakteri izolatın *Neoscytalidium dimidiatum*, *Neofusicoccum parvum* ve *Botryosphaeria dothidea* etmenlerinin misel gelişimini engelleme (antagonistik) etkinlikleri PDA içeren petri kaplarında ikili kültür testlemeleriyle (Şekil 3.4) belirlenmiştir.

Bakteri izolatlarının test edildiği fungal etmenlerinin misel gelişimlerini engelleme oranları; (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 grup altında incelenmiştir (Dalal ve Kulkarni, 2013). *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).

4.2.1. Epifit ve Endofit Bakteri İzolatlarının *Neoscytalidium dimidiatum* Misel Gelişiminin Engellenmesi üzerine *in vitro* Antagonistik Etkinliklerinin Belirlenmesi

İkili kültür testlemelerinde test edilen 48 endofit ve epifit bakteri izolatının fungal hastalık etmeni *Neoscytalidium dimidiatum*'un misel gelişimini engelleme düzeyleri değerlendirildiğinde; 9 izolatın (%18.8) misel gelişimini %0.1-24.9 gibi değişen oranlarda **zayıf düzeyde** engellerken, 19 izolatın (%39.6) misel gelişimini %25.0-49.9 gibi değişen oranlarda **orta düzeyinde** engellediği, 20 izolatın (%41.7) ise misel gelişimini >%50 bir oranda olmak üzere **güçlü düzeyde** engellediği gözlenmiştir (Şekil 4.6). Yapılan istatistik analiz sonucunda izolatlar arasında önemli farklılıkların olduğu, *Pseudomonas chlororaphis* dışında Gram pozitif bakteri türlerinin (özellikle *Bacillus* spp bağlı izolatlar) hastalık etmeninin misel gelişimini etkili bir şekilde engellediği tespit edilmiştir (Çizelge 4.2).

Hastalık etmeninin misel gelişimini en güçlü engelleyen izolatın %80.55 engelleme oranı ile *Pseudomonas chlororaphis* NKA10ep izolatının olduğu, bu izolatı sırasıyla %70.55 ile *Bacillus pumilus* NKC3en, %68.33 ile *Bacillus mojavensis* NKA7en ve %67.22 ile *Staphylococcus epidermidis* NKB5en izolatları izlemiştir (Çizelge 4.2, Şekil 4.1). Misel gelişimini engellemede en etkili ilk 10 izolatın 7 tanesi endofit, 3 tanesi epifit karakterde izolat olduğu, izolatlar arasında olduğu kadar aynı türe ait izolatların antagonist etkinlikleri arasında istatistiksel olarak önemli düzeylerde farklılıklar tespit edilmiştir.

Hastalık etmenini en düşük düzeyde engelleyen izolat ise %0.55 engelleme oranı ile Gram pozitif bakterilerden *Bacillus megaterium* NKA1ep olurken, bu izolatı %1.12-2.78 engelleme oranı ile Gram negatif bakterilerden *Pseudomonas migulae* NKB8en, *Acinetobacter dijshoorniae* NKA8en ve *Rhizobium radiobacter* NKA9en izolatları izlemiştir. Yapılan istatistik analizlerde söz konusu bu izolatların kontrol grubu ile aynı istatistik grubunda olduğu görülmüştür.

Çizelge 4.2. Farklı konukçulardan elde edilen endofit ve epifit antagonist bakteri izolatların *in vitro* ikili kültür testlerinde *Neoscytalidium dimidiatum*'un misel gelişimini engelleme potansiyelleri

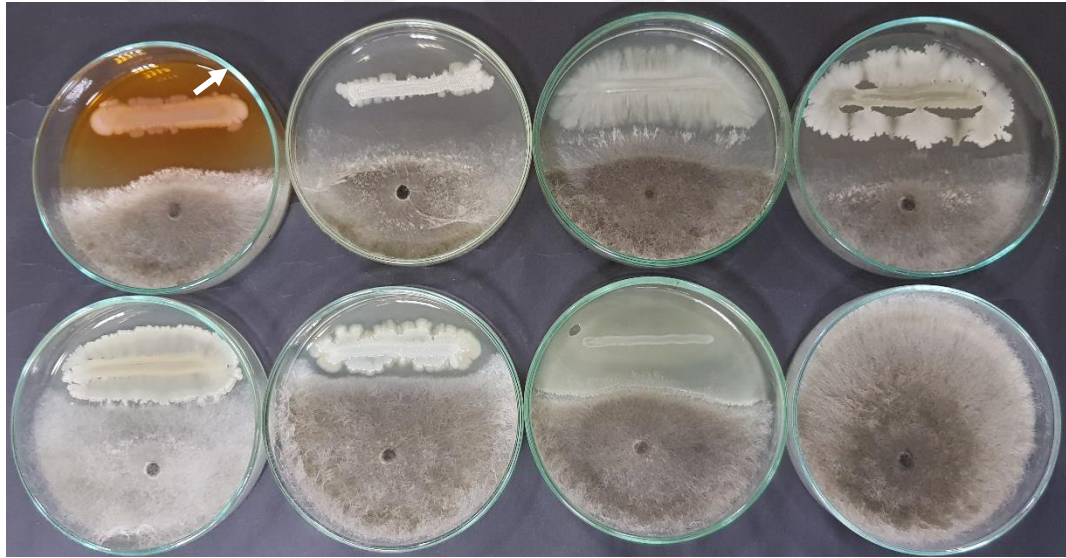
<i>İzolat</i>	Antagonistik Etki^a	
	MG	MGE
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> NKA10ep	11.67 ^a	80.55
<i>Bacillus pumilus</i> NKC3en	17.67 ^b	70.55
<i>Bacillus mojavensis</i> NKA7en	19.00 ^{bc}	68.33
<i>Staphylococcus epidermidis</i> NKB5en	19.67 ^{b-d}	67.22
<i>Bacillus mojavensis</i> NKB2ep	21.33 ^{c-e}	64.45
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> NKB6en	21.67 ^{c-f}	63.88
<i>Bacillus atrophaeus</i> NKA3en	22.33 ^{d-g}	62.78
<i>Bacillus pumilus</i> NKC14ep	22.67 ^{d-g}	62.22
<i>Staphylococcus epidermidis</i> NKF5en	23.00 ^{e-g}	61.67
<i>Bacillus subtilis</i> NKA5en	24.33 ^{e-h}	59.45
<i>Bacillus subtilis</i> NKA6en	24.67 ^{f-i}	58.88
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NKC2ep	25.00 ^{g-i}	58.33
<i>Bacillus mycoides</i> NKB9en	26.33 ^{h-j}	56.12
<i>Enterobacter cloacae</i> NKC8en	27.67 ^{i-k}	53.88
<i>Bacillus safensis</i> NKA12ep	27.67 ^{i-k}	53.88
<i>Bacillus atrophaeus</i> NKA2en	27.67 ^{i-k}	53.88
<i>Enterobacter bugandensis</i> NKC12ep	29.00 ^{j-l}	51.67
<i>Pseudomonas marginalis</i> NKF3en	29.67 ^{k-m}	50.55
<i>Lelliottia amnigena</i> NKA1en	30.00 ^{k-n}	50.00
<i>Enterobacter cancerogenus</i> NKC13ep	30.00 ^{k-n}	50.00
<i>Bacillus simplex</i> NKA4en	30.33 ^{k-n}	49.45
<i>Rahnella aquatilis</i> NKF4en	30.33 ^{k-n}	49.45
<i>Bacillus pumilus</i> NKC6en	31.00 ^{k-n}	48.33
<i>Burkholderia cepacia</i> NKC15en	32.00 ^{l-o}	46.67
<i>Pseudomonas cichorii</i> NKC7ep	32.67 ^{m-o}	45.55
<i>Herbaspirillum aquaticum</i> NKB14en	32.67 ^{m-o}	45.55
<i>Acinetobacter radioresistens</i> NKB12en	33.33 ^{n-p}	44.45
<i>Bacillus cereus</i> NKC4ep	34.67 ^{o-r}	42.22
<i>Enterobacter cloacae</i> NKB13ep	35.00 ^{o-r}	41.67
<i>Acinetobacter johnsonii</i> NKA11en	36.00 ^{p-s}	40.00
<i>Bacillus endophyticus</i> NKB3en	36.33 ^{p-s}	39.45
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> NKC1en	36.67 ^{rs}	38.88
<i>Aurebasidium pullulans</i> NKC5en	36.67 ^{rs}	38.88
<i>Pseudomonas korensis</i> NKF2ep	37.33 ^{rs}	37.78
<i>Enterobacter asburiae</i> NKC11en	37.33 ^{rs}	37.78
<i>Pseudomonas orientalis</i> NKF1ep	37.67 ^{rs}	37.22
<i>Bacillus halosaccharovorans</i> NKB4en	39.00 ^s	35.00
<i>Pseudomonas rhodesiae</i> NKB11ep	42.00 ^t	30.00
<i>Bacillus megaterium</i> NKB1ep	42.67 ^t	28.88

Çizelge 4.2. (Devam) Farklı konukçulardan elde edilen endofit ve epifit antagonist bakteri izolatların *in vitro* ikili kültür testlerinde *Neoscytalidium dimidiatum*'un misel gelişimini engelleme potansiyelleri

<i>İzolat</i>	Antagonistik Etki^a	
	MG	MGE
<i>Pseudomonas rhodesiae</i> NKB10en	50.00 ^u	16.67
<i>Micrococcus luteus</i> NKC10en	52.33 ^{uv}	12.78
<i>Enterobacter bugandensis</i> NKA13en	55.00 ^{vv}	8.33
<i>Pantoea agglomerans</i> NKC9en	55.33 ^y	7.78
<i>Pseudomonas frederisbergensis</i> NKB7en	55.67 ^{yz}	7.22
<i>Rhizobium radiobacter</i> NKA9en	58.33 ^{zx}	2.78
<i>Acinetobacter dijkschoorniae</i> NKA8en	58.67 ^x	2.22
<i>Pseudomonas migulae</i> NKB8en	59.33 ^x	1.12
<i>Bacillus megaterium</i> NKA1ep	59.67 ^x	0.55
<i>Kontrol (Neoscytalidium dimidiatum)</i>	60.00 ^x	-

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. İkili kültür testlemeleri ile farklı tütlere ait epifit ve endofit bakteri izolatlarının fungal etmen *Neoscytalidium dimidiatum*'un misel gelişimini engelleme potansiyelleri

4.2.2. Epifit ve Endofit Bakteri İzolatlarının *Neofusicoccum parvum*'un Misel Gelişiminin Engellenmesi üzerine *in vitro* Antagonistik Etkinliklerinin Belirlenmesi

İkili kültür testlemeleri sonucu test edilen 48 bakteri izolatının fungal etmen *Neofusicoccum parvum*'un misel gelişimini engelleme düzeyleri açısından değerlendirildiğinde; 5 izolatın (%10.4) misel gelişimini %0.1-24.99 gibi değişen oranlarda **zayıf düzeyde** engellerken, 20 izolatın (%41.7) misel gelişimini %25.0-49.9 gibi değişen oranlarda **orta düzeyinde** engellediği, geri kalan 23 izolatın (%47.9) ise misel gelişimini >%50 oranlarda olmak üzere **güçlü düzeyde** engellediği belirlenmiştir (Çizelge 4.3).

Hastalık etmeninin misel gelişimini güçlü düzeyde engelleyen ilk 3 istatistik grubuna düşen 7 izolattan 5 tanesinin Gram pozitif *Bacillus* spp. olduğu belirlenmiştir. Fungal etmenin misel gelişimini en güçlü engelleyen izolatın %83.88 engelleme oranı *Bacillus mojavensis* NKA7en izolatının olduğu, bu izolatı sırasıyla %74.45 engelleme oranı ile *Bacillus mycoides* NKB9en, %73.33 engelleme oranı ile *Pseudomonas aeruginosa* NKC2ep, %71.67 engelleme oranı ile *Pseudomonas orientalis* NKF1ep, %68.88 engelleme oranı ile *Bacillus mojavensis* NKB2ep, %65.55 engelleme oranı ile *Bacillus atrophaeus* NKA3en ve %65.0 engelleme oranı ile *Bacillus pumilus* NKC3en izolatları izlemiştir (Çizelge 4.3, Şekil 4.2).

Test edilen antagonist bakteri izolatları arasında *Bacillus megaterium* NKA1ep, *Bacillus halosaccharovorans* NKB4en, ve *Bacillus subtilis* NKA6en izolatlarının hastalık etmenini %0.0 ile 12.78 oranlarında engelleyerek kontrol ile aynı istatistik grupta yer alan izolatlar olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.3).



Şekil 4.2. İkili kültür testlemeleri ile farklı epifit ve endofit bakteri izolatlarının fungal etmen *Neofusicoccum parvum* 'un misel gelişimini engelleme potansiyelleri

Çizelge 4.3. Farklı konukçulardan elde edilen endofit ve epifit antagonist bakteri izolatların *in vitro* ikili kültür testlerinde *Neofusicoccum parvum* 'un misel gelişimini engelleme potansiyelleri

İzolat	Antagonistik Etki ^a	
	MG (mm)	MGE (%)
<i>Bacillus mojavensis</i> NKA7en	9.67 ^a	83.88
<i>Bacillus mycoides</i> NKB9en	15.33 ^b	74.45
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NKC2ep	16.00 ^b	73.33
<i>Pseudomonas orientalis</i> NKF1ep	17.00 ^{bc}	71.67
<i>Bacillus mojavensis</i> NKB2ep	18.67 ^{b-d}	68.88
<i>Bacillus atrophaeus</i> NKA3en	20.67 ^{c-e}	65.55
<i>Bacillus pumilus</i> NKC3en	21.00 ^{c-e}	65.00
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> NKA10ep	21.33 ^{de}	64.45
<i>Bacillus subtilis</i> NKA5en	22.33 ^{d-f}	62.78
<i>Bacillus pumilus</i> NKC14ep	23.67 ^{e-g}	60.55
<i>Staphylococcus epidermidis</i> NKB5en	24.00 ^{e-g}	60.00
<i>Acinetobacter radioresistens</i> NKB12en	26.00 ^{f-h}	56.67
<i>Enterobacter bugandensis</i> NKC12ep	26.00 ^{f-h}	56.67
<i>Enterobacter bugandensis</i> NKA13en	26.00 ^{f-h}	56.67
<i>Bacillus cereus</i> NKC4ep	26.33 ^{f-i}	56.12
<i>Pseudomonas cichorii</i> NKC7ep	26.33 ^{f-i}	56.12
<i>Bacillus atrophaeus</i> NKA2en	26.33 ^{f-i}	56.12
<i>Rahnella aquatilis</i> NKF4en	27.00 ^{g-i}	55.00
<i>Enterobacter asburiae</i> NKC11en	27.33 ^{g-j}	54.45
<i>Enterobacter cloacae</i> NKC8en	27.33 ^{g-j}	54.45
<i>Aurebasidium pullulans</i> NKC5en	29.00 ^{h-k}	51.67
<i>Bacillus endophyticus</i> NKB3en	29.00 ^{h-k}	51.67
<i>Staphylococcus epidermidis</i> NKF5en	29.00 ^{h-k}	51.67
<i>Micrococcus luteus</i> NKC10en	30.67 ^{i-l}	48.88

Çizelge 4.3. (Devam) Farklı konukçulardan elde edilen endofit ve epifit antagonist bakteri izolatların *in vitro* ikili kültür testlerinde *Neofusicoccum parvum*'un misel gelişimini engelleme potansiyelleri

İzolat	Antagonistik Etki ^a	
	MG (mm)	MGE (%)
<i>Bacillus safensis</i> NKA12ep	31.67 ^{j-m}	47.22
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> NKC1en	32.33 ^{k-n}	46.12
<i>Bacillus pumilus</i> NKC6en	32.33 ^{k-n}	46.12
<i>Enterobacter cancerogenus</i> NKC13ep	32.33 ^{k-n}	46.12
<i>Enterobacter cloacae</i> NKB13ep	32.67 ^{k-o}	45.55
<i>Bacillus simplex</i> NKA4en	33.00 ^{k-p}	45.00
<i>Pseudomonas frederisbergensis</i> NKB7en	33.33 ^{k-r}	44.45
<i>Pseudomonas marginalis</i> NKF3en	33.33 ^{k-r}	44.45
<i>Acinetobacter dijkschoorniae</i> NKA8en	33.67 ^{l-r}	43.88
<i>Herbaspirillum aquaticum</i> NKB14en	35.00 ^{l-r}	41.67
<i>Pseudomonas rhodesiae</i> NKB10en	36.00 ^{m-r}	40.00
<i>Pantoea agglomerans</i> NKC9en	36.67 ^{n-r}	38.88
<i>Burkholderia cepacia</i> NKC15en	36.67 ^{n-r}	38.88
<i>Lelliottia amnigena</i> NKA1en	36.67 ^{n-r}	38.88
<i>Pseudomonas korensis</i> NKF2ep	37.00 ^{o-r}	38.33
<i>Rhizobium radiobacter</i> NKA9en	37.33 ^{p-r}	37.78
<i>Acinetobacter johnsonii</i> NKA11en	37.67 ^r	37.22
<i>Pseudomonas migulae</i> NKB8en	43.33 ^s	27.78
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> NKB6en	43.33 ^s	27.78
<i>Pseudomonas rhodesiae</i> NKB11ep	47.33 st	21.12
<i>Bacillus megaterium</i> NKB1ep	50.33 ^{tu}	16.12
<i>Bacillus subtilis</i> NKA6en	52.33 ^{uv}	12.78
<i>Bacillus halosaccharovorans</i> NKB4en	57.33 ^v	4.45
<i>Bacillus megaterium</i> NKA1ep	60.00 ^v	0
Kontrol (<i>Neofusicoccum parvum</i>)	60.00 ^v	-

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)

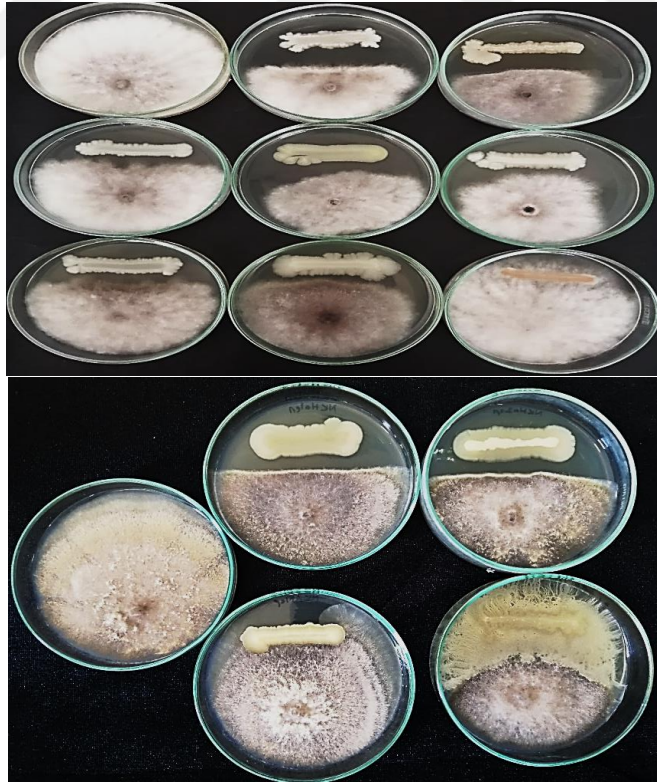
4.2.3. Epifit ve Endofit Bakteri İzolatlarının *Botryosphaeria dothidea*'nın Misel Gelişiminin Engellenmesi üzerine *in vitro* Antagonistik Etkinliklerinin Belirlenmesi

İkili kültür testlemeleri sonucu test edilen 48 bakteri izolatının fungal etmen *Botryosphaeria dothidea*'nın misel gelişimini engelleme düzeyleri açısından değerlendirildiğinde; 7 izolatın (%14.6) misel gelişimini %0.1-24.99 gibi değişen oranlarda **zayıf düzeyde** engellerken, 18 izolatın (%37.5) misel gelişimini %25.0-49.9 gibi değişen oranlarda **orta düzeyinde** engellediği, geri kalan 23 izolatın (%47.9) ise

misel gelişimini >%50 oranlarda olmak üzere **güçlü düzeyde** engellediği belirlenmiştir (Çizelge 4.4).

Hastalık etmeninin misel gelişimini güçlü düzeyde engelleyen ilk 3 istatistik grupta yer alan 7 izolattan 4 tanesi Gram pozitif *Bacillus* spp. olup, 3 tanesi *Pseudomonas* spp. dahil izolatlardan oluşmuştur. En yüksek antagonistik etkinlik %83.88 engelleme oranı ile *Bacillus mojavensis* NKA7en izolatı tarafından gösterilmiş olup, bu izolatı %77.78 engelleme oranı ile *Pseudomonas chlororaphis* NKA10ep, %75.0 engelleme oranı ile *Pseudomonas orientalis* NKF1ep ve *Bacillus pumilus* NKC3en, %73.33 engelleme oranı ile *Bacillus mycoides* NKB9en, %71.67 engelleme oranı ile *Pseudomonas aeruginosa* NKC2ep ve %68.88 engelleme oranı ile *Bacillus mojavensis* NKB2ep izolatları izlemiştir (Çizelge 4.4, Şekil 4.3).

Test edilen antagonist bakteri izolatları arasında *Rhizobium radiobacter* NKA9en, *Bacillus halosaccharovorans* NKB4en, *Bacillus megaterium* NKB1ep ve *Pseudomonas migulae* NKB8en izolatlarının hastalık etmenini %0.0 ile 6.12 oranlarında engelleyerek kontrol ile aynı istatistik grubuna düşmüş izolatlar olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.3).



Şekil 4.3. İkili kültür testlemeleri ile farklı epifit ve endofit bakteri izolatlarının fungal etmen *Botryosphaeria dothidea*'nın misel gelişimini engelleme potansiyelleri

Çizelge 4.4. Farklı konukçulardan elde edilen endofit ve epifit antagonist bakteri izolatların *in vitro* ikili kültür testlerinde *Botryosphaeria dothidea*'nın misel gelişimini engelleme potansiyelleri

İzolat	Antagonistik Etki ^a	
	MG (mm)	MGE (%)
<i>Bacillus mojavensis</i> NKA7en	9.67 ^a	83.88
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> NKA10ep	13.33 ^b	77.78
<i>Pseudomonas orientalis</i> NKF1ep	15.00 ^{bc}	75.00
<i>Bacillus pumilus</i> NKC3en	15.00 ^{bc}	75.00
<i>Bacillus mycoides</i> NKB9en	16.00 ^{b-d}	73.33
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NKC2ep	17.00 ^{b-d}	71.67
<i>Bacillus mojavensis</i> NKB2ep	18.67 ^{c-e}	68.88
<i>Bacillus atrophaeus</i> NKA2en	19.33 ^{d-f}	67.78
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> NKB6en	19.33 ^{d-f}	67.78
<i>Rahnella aquatilis</i> NKF4en	21.67 ^{ef}	63.88
<i>Bacillus pumilus</i> NKC14ep	22.00 ^{e-g}	63.33
<i>Pseudomonas marginalis</i> NKF3en	22.67 ^{f-i}	62.22
<i>Bacillus atrophaeus</i> NKA3en	23.00 ^{f-i}	61.67
<i>Bacillus subtilis</i> NKA5en	23.33 ^{e-i}	61.12
<i>Bacillus cereus</i> NKC4ep	25.67 ^{h-k}	57.22
<i>Staphylococcus epidermidis</i> NKB5en	25.67 ^{h-k}	57.22
<i>Pseudomonas rhodesiae</i> NKB11ep	26.00 ^{i-k}	56.67
<i>Herbaspirillum aquaticum</i> NKB14en	27.00 ^{j-l}	55.00
<i>Acinetobacter radioresistens</i> NKB12en	27.33 ^{kl}	54.45
<i>Enterobacter cloacae</i> NKC8en	28.00 ^{k-m}	53.33
<i>Pseudomonas cichorii</i> NKC7ep	28.67 ^{k-n}	52.22
<i>Bacillus endophyticus</i> NKB3en	28.67 ^{k-n}	52.22
<i>Pseudomonas rhodesiae</i> NKB10en	29.67 ^{k-o}	50.55
<i>Micrococcus luteus</i> NKC10en	30.33 ^{l-p}	49.45
<i>Bacillus pumilus</i> NKC6en	30.33 ^{l-p}	49.45
<i>Acinetobacter dijkschoorniae</i> NKA8en	30.33 ^{l-p}	49.45
<i>Bacillus subtilis</i> NKA6en	30.33 ^{l-p}	49.45
<i>Enterobacter bugandensis</i> NKA13en	32.00 ^{m-r}	46.67
<i>Bacillus megaterium</i> NKA1ep	32.67 ^{n-s}	45.55
<i>Pseudomonas frederisbergensis</i> NKB7en	33.33 ^{o-s}	44.45
<i>Pseudomonas korensis</i> NKF2ep	33.33 ^{o-s}	44.45
<i>Bacillus safensis</i> NKA12ep	33.67 ^{o-s}	43.88
<i>Lelliottia amnigena</i> NKA1en	33.67 ^{o-s}	43.88
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> NKC1en	34.00 ^{p-s}	43.33
<i>Enterobacter bugandensis</i> NKC12ep	34.33 ^{p-s}	42.78
<i>Enterobacter cloacae</i> NKB13ep	35.00 ^{r-s}	41.67
<i>Enterobacter cancerogenus</i> NKC13ep	36.00 ^{r-t}	40.00
<i>Acinetobacter johnsonii</i> NKA11en	36.33 st	39.45
<i>Aurebasidium pullulans</i> NKC5en	39.33 ^t	34.45
<i>Burkholderia cepacia</i> NKC15en	39.33 ^t	34.45
<i>Enterobacter asburiae</i> NKC11en	43.00 ^u	28.33
<i>Staphylococcus epidermidis</i> NKF5en	51.67 ^v	13.88
<i>Bacillus simplex</i> NKA4en	52.33 ^v	12.78
<i>Pantoea agglomerans</i> NKC9en	56.00 ^y	6.67

Çizelge 4.4. (Devam) Farklı konukçulardan elde edilen endofit ve epifit antagonist bakteri izolatların *in vitro* ikili kültür testlerinde *Botryosphaeria dothidea*'nın misel gelişimini engelleme potansiyelleri

İzolat	Antagonistik Etki ^a	
	MG (mm)	MGE (%)
<i>Rhizobium radiobacter</i> NKA9en	56.33 ^{yz}	6.12
<i>Bacillus halosaccharovorans</i> NKB4en	56.33 ^{yz}	6.12
<i>Bacillus megaterium</i> NKB1ep	59.33 ^{yz}	1.12
<i>Pseudomonas migulae</i> NKB8en	60.00 ^z	0.00
Kontrol (<i>Botryosphaeria dothidea</i>)	60.00 ^v	0

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 konukçulardan elde edilen 48 bakteri izolatın antagonistik etkinlikleri test edildikleri 3 farklı hastalık etmenine karşı birlikte değerlendirildiğinde (Çizelge 4.5), 9 izolatın (*Bacillus megaterium* NKB1ep, *Pseudomonas rhodesiae* NKB11ep, *Bacillus subtilis* NKA6en, *Staphylococcus epidermidis* NKF5en, *Enterobacter bugandensis* NKC12ep, *Enterobacter bugandensis* NKA13en, *Acinetobacter dijshoorniae* NKA8en ve *Rhizobium radiobacter* NKA9en) antogonistik etkinliğinin 3 fungal hastalık etmeni türe göre önemli farklılıklar gösterdiği belirlenmişken, 8 izolatın antagonistik etkinliklerinin hastalık etmeni türüne göre bir farklılık göstermemiştir.

Test edilen bakteri izolatlarından *Pseudomonas chlororaphis* NKA10ep, *Bacillus mojavensis* NKA7en, *Bacillus pumilus* NKC3en, *Bacillus mycoides* NKB9en, *Pseudomonas aeruginosa* NKC2ep, *Pseudomonas orientalis* NKF1ep, *Bacillus mojavensis* NKB2ep ve *Bacillus atrophaeus* NKA3en izolatlarının her 3 hastalık etmenine karşı yüksek düzeyde antagonistik etkinlik gösterdiği belirlenmiştir (Çizelge 4.5).

Test edilen 48 bakteri izolatın *Neoscytalidium dimidiatum*'un misel gelişimini %0.55-80.55 oranları arasında engellediği ortalama engelleme oranının %42.39 düzeyinde olduğu, bu oranın *Neofusicocum parvum* için %0.0-83.88 oranları arasında olup ortalama engelleme oranının %47.65 düzeyinde olduğu, *Botryosphaeria dothidea* için ise %0.0-83.88 oranları arasında olup ortalama engelleme oranının %47.50 düzeyinde olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.5. Antagonist bakteri izolatların test edildikleri fungal etmenlere karşı antagonistik etkinliklerinin karşılaştırılması

Bakteri İzolatı	Antagonistik Etki ^a		
	<i>Neoscytalidium dimidiatum</i>	<i>Neofusicoccum parvum</i>	<i>Botryosphaeria dothidea</i>
Kontrol	60.00 ^x	60.00 ^v	60.00 ^z
<i>Bacillus mojavensis</i> NKA7en	19.00 ^{bcB}	9.67 ^{aA}	9.67 ^{aA}
<i>Bacillus mycoides</i> NKB9en	26.33 ^{h-jB}	15.33 ^{baA}	16.00 ^{b-dA}
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NKC2ep	25.00 ^{g-iB}	16.00 ^{baA}	17.00 ^{b-dA}
<i>Pseudomonas orientalis</i> NKF1ep	37.67 ^{rsB}	17.00 ^{bcA}	15.00 ^{bcA}
<i>Bacillus mojavensis</i> NKB2ep	21.33 ^{c-eB}	18.67 ^{b-dA}	18.67 ^{c-eA}
<i>Bacillus atrophaeus</i> NKA3en	22.33 ^{d-gA}	20.67 ^{c-eA}	23.00 ^{f-iA}
<i>Bacillus pumilus</i> NKC3en	17.67 ^{baB}	21.00 ^{c-eB}	15.00 ^{bcA}
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> NKA10ep	11.67 ^{aA}	21.33 ^{deB}	13.33 ^{baA}
<i>Bacillus subtilis</i> NKA5en	24.33 ^{e-hA}	22.33 ^{d-fA}	23.33 ^{e-iA}
<i>Bacillus pumilus</i> NKC14ep	22.67 ^{d-gA}	23.67 ^{e-gA}	22.00 ^{e-gA}
<i>Staphylococcus epidermidis</i> NKB5en	19.67 ^{b-dA}	24.00 ^{e-gB}	25.67 ^{h-kB}
<i>Enterobacter bugandensis</i> NKC12ep	29.00 ^{j-lB}	26.00 ^{f-hA}	34.33 ^{p-sC}
<i>Acinetobacter radioresistens</i> NKB12en	33.33 ^{n-pB}	26.00 ^{f-hA}	27.33 ^{klA}
<i>Enterobacter bugandensis</i> NKA13en	55.00 ^{yyC}	26.00 ^{f-hA}	32.00 ^{m-rB}
<i>Pseudomonas cichorii</i> NKC7ep	32.67 ^{m-oB}	26.33 ^{f-iA}	28.67 ^{k-nA}
<i>Bacillus cereus</i> NKC4ep	34.67 ^{o-rB}	26.33 ^{f-iA}	25.67 ^{h-kA}
<i>Bacillus atrophaeus</i> NKA2en	27.67 ^{i-kB}	26.33 ^{f-iB}	19.33 ^{d-fA}
<i>Rahnella aquatilis</i> NKF4en	30.33 ^{k-nB}	27.00 ^{g-iB}	21.67 ^{efA}
<i>Enterobacter cloacae</i> NKC8en	27.67 ^{i-kA}	27.33 ^{g-jA}	28.00 ^{k-mA}
<i>Enterobacter asburiae</i> NKC11en	37.33 ^{rsB}	27.33 ^{g-jA}	43.00 ^{uB}
<i>Bacillus endophyticus</i> NKB3en	36.33 ^{p-sB}	29.00 ^{h-kA}	28.67 ^{k-nA}
<i>Aurebasidium pullulans</i> NKC5en	36.67 ^{rsB}	29.00 ^{h-kA}	39.33 ^{tB}
<i>Staphylococcus epidermidis</i> NKF5en	23.00 ^{e-gA}	29.00 ^{h-kB}	51.67 ^{vC}
<i>Micrococcus luteus</i> NKC10en	52.33 ^{uvB}	30.67 ^{i-lA}	30.33 ^{l-pA}
<i>Bacillus safensis</i> NKA12ep	27.67 ^{i-kA}	31.67 ^{j-mB}	33.67 ^{o-sB}
<i>Enterobacter cancerogenus</i> NKC13ep	30.00 ^{k-nA}	32.33 ^{k-nA}	36.00 ^{r-tB}
<i>Bacillus pumilus</i> NKC6en	31.00 ^{k-nA}	32.33 ^{k-nA}	30.33 ^{l-pA}
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> NKC1en	36.67 ^{rsA}	32.33 ^{k-nA}	34.00 ^{p-sA}
<i>Enterobacter cloacae</i> NKB13ep	35.00 ^{o-rA}	32.67 ^{k-oA}	35.00 ^{r-sA}
<i>Bacillus simplex</i> NKA4en	30.33 ^{k-nA}	33.00 ^{k-pA}	52.33 ^{yB}
<i>Pseudomonas frederisbergensis</i> NKB7en	55.67 ^{yzB}	33.33 ^{k-rA}	33.33 ^{o-sA}
<i>Pseudomonas marginalis</i> NKF3en	29.67 ^{k-mB}	33.33 ^{k-rB}	22.67 ^{f-iA}
<i>Acinetobacter dijkschoorniae</i> NKA8en	58.67 ^{xC}	33.67 ^{l-rB}	30.33 ^{l-pA}
<i>Herbaspirillum aquaticum</i> NKB14en	32.67 ^{m-oB}	35.00 ^{l-rB}	27.00 ^{j-lA}
<i>Pseudomonas rhodesiae</i> NKB10en	50.00 ^{uC}	36.00 ^{m-rB}	29.67 ^{k-oA}
<i>Pantoea agglomerans</i> NKC9en	55.33 ^{yB}	36.67 ^{n-rA}	56.00 ^{yB}

Çizelge 4.5. (Devam) Antagonist bakteri izolatların test edildikleri fungal etmenlere karşı antagonistik etkinliklerinin karşılaştırılması

Bakteri İzolatı	Antagonistik Etki ^a		
	<i>Neoscytalidium dimidiatum</i>	<i>Neofusicoccum parvum</i>	<i>Botryosphaeria dothidea</i>
<i>Burkholderia cepacia</i> NKC15en	32.00 ^{l-oA}	36.67 ^{n-rAB}	39.33 ^{tB}
<i>Lelliottia amnigena</i> NKA1en	30.00 ^{k-nA}	36.67 ^{n-rB}	33.67 ^{o-sB}
<i>Pseudomonas korensis</i> NKF2ep	37.33 ^{rsA}	37.00 ^{o-rA}	33.33 ^{o-sA}
<i>Rhizobium radiobacter</i> NKA9en	58.33 ^{zxC}	37.33 ^{p-rA}	56.33 ^{yzB}
<i>Acinetobacter johnsonii</i> NKA11en	36.00 ^{p-sA}	37.67 ^{tA}	36.33 ^{stA}
<i>Pseudomonas migulae</i> NKB8en	59.33 ^{xB}	43.33 ^{sA}	60.00 ^{zB}
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> NKB6en	21.67 ^{c-fA}	43.33 ^{sB}	19.33 ^{d-fA}
<i>Pseudomonas rhodesiae</i> NKB11ep	42.00 ^B	47.33 ^{stC}	26.00 ^{i-kA}
<i>Bacillus megaterium</i> NKB1ep	42.67 ^{IA}	50.33 ^{tuB}	59.33 ^{yzC}
<i>Bacillus subtilis</i> NKA6en	24.67 ^{f-IA}	52.33 ^{uvC}	30.33 ^{l-pB}
<i>Bacillus halosaccharovorans</i> NKB4en	39.00 ^{sA}	57.33 ^{vB}	56.33 ^{yzB}
<i>Bacillus megaterium</i> NKA1ep	59.67 ^{xB}	60.00 ^{vB}	32.67 ^{n-sA}

^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.

Her 3 fungal hastalık etmenlerine karşı %50 üzerinde antagonistik etkinlik gösteren endofit ve epifit bakteri türlerin genelde *Bacillus* spp. ait izolatlar tarafından gösterildiğinin belirlendiği çalışmalarda, *Neoscytalidium dimidiatum*'a karşı toplam 19 izolattan 11 tanesinin *Neofusicoccum parvum*'a karşı toplam 23 izolattan 10 tanesinin, *Botryosphaeria dothidea*'ya karşı ise 23 izolattan 11 tanesinin benzer şekilde *Bacillus* spp. ait olduğu tespit edilmiştir.

Bacillus spp. ait izolatların 70'den fazla antimikrobiyal etkiye sahip metabolit/bileşik/antibiyotik ürettikleri, üretilen bu bileşiklerin farklı konukçu bitkilerde hastalık oluşturan tohum, toprak, yaprak ve depo kökenli fungal ve bakteriyel hastalık etmenlerine karşı biyoetkinlikten sorumlu olduğu yapılan biyolojik mücadele çalışmalarında bildirilmiştir. *Bacillus* spp. arasında özellikle *B. subtilis*, *Bacillus mojavensis*, *B. amyloliquefaciens*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus cereus* gibi epifit ve endofit kökenli türleri çok farklı kimyasal yapıda antibiyotik sentezleme yetisinde olması nedeni ile biyolojik mücadele çalışmalarında en fazla çalışılan türler olarak bildirilmiştir (Stein, 2005). Özellikle iturin, surfactin, lichenysin, fengycin veya yakın türevleri gibi antimikrobiyal bileşenler *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B.*

pumilus, *B. licheniformis*, *B. cereus* ve *B. thuringiensis* tarafından üretilen antimikrobiyal etkili bileşenlerdir (Tsuge ve ark., 1999; Bernal ve ark., 2002; Kim ve ark., 2004; Huszcza ve Burczyk, 2006).

Bacillus spp. (özellikle *Bacillus subtilis*) ait endofit ve epifit bakterilerin biyolojik mücadele çalışmalarında öne çıkmalarının ana sebepleri olarak, bu türe ait izolatların biyofungusit olarak pazarda yaygın yer bulmasının nedenleri olarak, farklı moleküler yapıya sahip antimikrobiyal bileşikler üretmeleri, üretilen bileşiklere karşı hastalık etmenlerin dayanıklılık geliştirememesi, bu türe ait izolatların olumsuz çevre koşullarına karşı dayanıklı endospor oluşturmaları sayılabilir. Son yıllarda *Agrobacterium* (Syn. *Rhizobium*) spp., *Bacillus* spp. ve *Pseudomonas* spp. bağlı bakteri izolatlarından üretilen biyopreparatlar biyofungusit pazarında oldukça önemli bir yere sahip olduğu bildirilmiştir (Fravel, 2005). Söz konusu biyolojik etken maddeli biyopreparat pazarının yarısından fazlasını *Bacillus* spp ait biyopreparatlar oluşturur. Biyopreparat pazarında >%70 payı özellikle lepidoptera larvalarına karşı insektisid olarak kullanılan *B. thuringiensis* preparatları almaktadır. Diğer yandan, son yıllarda tüketicilerin bilinçlenerek organik tarıma olan pozitif yaklaşımlarından dolayı, *Bacillus subtilis* strain GBO3, *B. subtilis* strain QST 713, *B. subtilis* MBI 600, *B. subtilis* var. *amyloliquefaciens* strain FZB24, *B. licheniformis* strain SB3086 ve *B. pumilus* GB 34 nolu izolatlarından üretilen, farklı fungal ve bakteriyel hastalıklara karşı birçok ülkede yaygın olarak ruhsatlı biyopreparatlarında pazardaki yeri son yıllarda ciddi şekilde yükselmektedir.

Test edilen bakteri izolatlarından *Pseudomonas chlororaphis* NKA10ep, *Bacillus mojavensis* NKA7en, *Bacillus pumilus* NKC3en, *Bacillus mycoides* NKB9en, *Pseudomonas aeruginosa* NKC2ep, *Pseudomonas orientalis* NKF1ep, *Bacillus mojavensis* NKB2ep, ve *Bacillus atrophaeus* NKA3en izolatlarının her 3 hastalık etmenine karşı yüksek düzeyde ($\geq$ %60) antagonistik etkinlik gösterdiği belirlenmiştir.

Yapmış olduğumuz kapsamlı literatür araştırmasında, sert kabuklu meyve ağaçlarında olmasada, çalışmamızda kullanılan hastalık etmenlerinden *Botryosphaeria dothidea* ve *Neofusicoccum parvum* ile yapılmış oldukça sınırlı sayıda biyolojik mücadele çalışmalarına rastlanılmıştır. Bu çalışmalarda; *Paenibacillus lentimorbus* CBCA-2 izolatının, fıstık salkımı ve sürgün yanıklığı etmeni *Botryosphaeria dothidea*'ya karşı (Chen ve ark., 2003), *Bacillus amyloliquefaciens* PEBA20 izolatı ile *Brevibacillus laterosporus* JX-5 izolatının kavak kanser etmeni *Botryosphaeria dothidea*'ya karşı (Yin

ve ark., 2011; Jiang ve ark., 2015), *Pantoea agglomerans*'ın asmalarda *Neofusicoccum parvum* tarafından neden olunan yıkıcı hastalığa karşı (Haidar ve ark., 2016), *Paenibacillus polymyxa* CF05 izolatının Hikori gövde kanserine neden olan *Botryosphaeria dothidea*'ya karşı (Xu ve ark., 2018), *Pseudomonas protegens* MP12 ve *Bacillus subtilis* PTA-271 izolatlarının asmada yıkıcı hastalığa neden olan *Botryosphaeria* geriye ölüm hastalık kompleksi etmenlerinden *Neofusicoccum parvum*'a karşı (Andreolli ve ark., 2019; Trotel-Aziz ve ark., 2019), *Saccharomyces cerevisiae* ESA45, *Saccharomyces* sp. ESA46, *Saccharomyces* sp. ESA47 ve *Pichia kudriavzevii* CMIAT171 maya izolatlarının mango meyvelerinde hasat sonrası çürümelere neden olan *Botryosphaeria* hastalık etmenlerinden *Neofusicoccum parvum*'a karşı (Castro ve ark., 2020), *Bacillus stratosphericus* LW-03 bakteri izolatın ise *Botryosphaeria dothidea* etmenine karşı (Khan ve ark., 2020), *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda misel gelişimini ve hastalık çıkışının engellenmesi üzerine biyoetkinlik gösterdiği bildirilmiştir.

Çalışmalarımızda etkinliği araştırılan bir diğer hastalık etmeni olan *Neoscytalidium dimidiatum* üzerine yapılmış herhangi bir biyolojik mücadele çalışmasına rastlanılmamıştır. Benzer şekilde, fungal etmenlere karşı *in vitro* misel gelişiminin engellenmesinde en yüksek etkinlik gösteren bakteri izolatlarından *Pseudomonas chlororaphis* ve *Bacillus mojavensis*'in *Botryosphaeria* geriye ölüm hastalık etmenlerinden *Neoscytalidium dimidiatum*, *Neofusicoccum parvum* ve *Botryosphaeria dothidea*'ya karşı yüksek antagonistik etkinlikleri ilk kez bu çalışma ile ortaya konulmuştur.

Sözkonusu izolatların farklı konukçu bitkilerde hastalıklara neden olan birçok tohum, toprak, yaprak ve depo kökenli fungal ve bakteriyel hastalık etmenlerine karşı yüksek düzeylerde antagonistik etkinlikler gösterdikleri, antagonistik etkinliklerden genelde aralarında çalışmalarımızda da belirlediğimiz antimikrobiyal bileşiklerin (siderofor, proteaz, amonyak gibi) yanısıra, biysürefektant, phenazine-1-carboxylic acid, 2-hydroxy-phenazine, cyclic lipopeptide ve laharenoic acid A gibi peptidler, mikolitik enzimlerden chitinaz, β -1,3-glucanase and β -1,4-glucanase gibi enzimleri sebep olduğu belirlenmiştir (Huang and Chen, 2004; Araujo ve ark., 2005; Chung ve ark., 2008; Singh ve ark., 2008; Chaiharn ve ark., 2008; Gupta ve ark., 2006; Xiao ve ark., 2009; Senthilkumar ve ark., 2009; Zhao ve ark., 2010; Bacon ve ark., 2012; Kumar ve ark., 2012; Shadid ve ark., 2017; Aktan, 2018).

4.3. Epifit ve Endofit Bakteri İzolatlarının Fungal Etmenlerin Misel Gelişiminin Engellenmesinden (Antagonistik) Sorumlu Olası Biyokontrol Etki Mekanizmalarının Belirlenmesi

Denemelerde antagonistik etkinlikleri araştırılan izolatların fungal etmenin misel gelişiminin engellenmesinden (antagonistik) sorumlu olabilecek olası biyokontrol etki mekanizmalarından siderofor (Şekil 4.4), proteaz enzimi (Şekil 4.5), hidrojen siyanür (HCN) (Şekil 4.6) ve amonyak (NH₃) (Şekil 4.7) üretme kapasiteleri bu mekanizmaların karakterizasyonuna spesifik besi yerleri üzerinde oluşturdıkları engelleme zonlarının bakteri çapına kıyaslanmasıyla hesaplanmış indeks değerleri ile kantitatif, geliştikleri besi yerlerinde sebep oldukları renk değişiklik şiddetlerine göre ise kalitatif olarak değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.6’da toplu olarak verilmiştir.

Çizelge 4.6. Farklı endofit ve epifit antagonist bakteri izolatların hastalık etmenlerini engellemede kullandıkları olası biyokontrol (antagonistik) mekanizmaları^a.

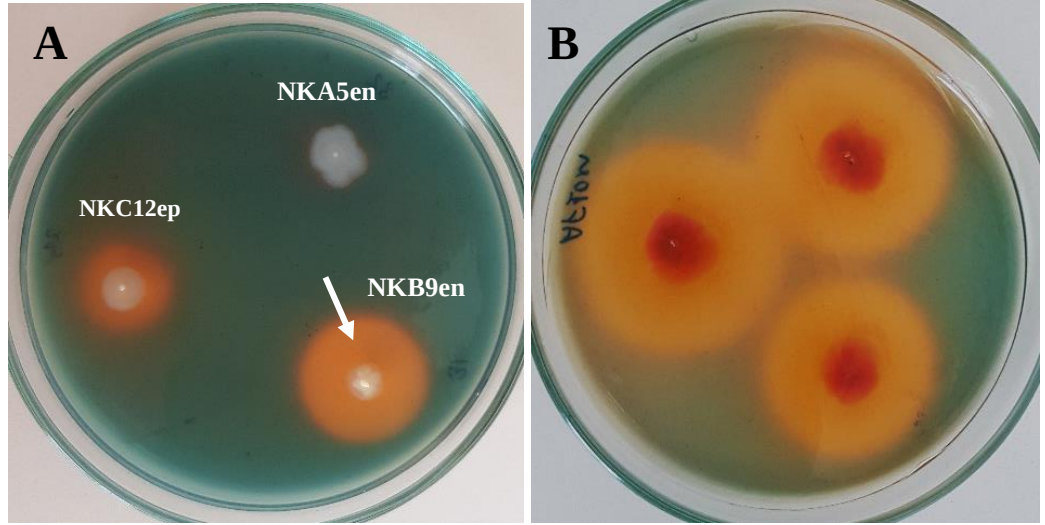
Bakteri İzolatı	Sid-İnd	Pro-İnd	NH₃	HCN
<i>Acinetobacter dijkschoorniae</i> NKA8en	1.91 ^{e-g}	1.81 ^{gh}	+	-
<i>Acinetobacter johnsonii</i> NKA11en	1.25 ^{ab}	0.00 ^a	-	-
<i>Acinetobacter radioresistens</i> NKB12en	1.69 ^{c-e}	0.00 ^a	±	-
<i>Aurebasidium pullulans</i> NKC5en	3.81 ^l	0.00 ^a	+	-
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> NKB6en	1.63 ^{b-e}	1.14 ^b	++	-
<i>Bacillus atrophaeus</i> NKA3en	1.26 ^{ab}	1.53 ^{ef}	+++	-
<i>Bacillus cereus</i> NKC4ep	1.28 ^{ab}	1.39 ^{c-e}	-	-
<i>Bacillus endophyticus</i> NKB3en	1.11 ^a	0.00 ^a	±	-
<i>Bacillus halosaccharovorans</i> NKB4en	1.13 ^a	0.00 ^a	-	-
<i>Bacillus megaterium</i> NKA1ep	1.18 ^a	2.16 ^j	-	-
<i>Bacillus megaterium</i> NKB1ep	3.52 ^{j-l}	1.28 ^{bc}	-	-
<i>Bacillus mojavensis</i> NKA7en	3.24 ^{i-k}	1.13 ^b	++	-
<i>Bacillus mojavensis</i> NKB2ep	1.33 ^{a-c}	1.15 ^b	-	-
<i>Bacillus mycoides</i> NKB9en	3.61^{kl}	1.88 ^h	+++	-
<i>Bacillus pumilus</i> NKC14ep	1.22 ^a	1.59 ^{ef}	++	-
<i>Bacillus pumilus</i> NKC3en	1.18 ^a	1.56 ^{rf}	+++	-
<i>Bacillus pumilus</i> NKC6en	1.26 ^{ab}	1.32 ^{b-d}	+	-
<i>Bacillus safensis</i> NKA12ep	1.16 ^a	1.18 ^b	++	-
<i>Bacillus simplex</i> NKA4en	1.17 ^a	1.93 ^{hi}	++	-

Çizelge 4.6. (Devam) Farklı endofit ve epifit antagonist bakteri izolatların hastalık etmenlerini engellemede kullandıkları olası biyokontrol (antagonistik) mekanizmaları^a

<i>Bacillus subtilis</i> NKA5en	1.08 ^a	2.77 ^k	+	-
<i>Bacillus subtilis</i> NKA6en	1.12 ^a	0.00 ^a	+	-
<i>Burkholderia cepacia</i> NKC15en	3.88 ^l	0.00 ^a	+++	-
<i>Enterobacter asburiae</i> NKC11en	2.35 ^h	1.93 ^{hi}	++	-
<i>Enterobacter bugandensis</i> NKA13en	2.25 ^{gh}	0.00 ^a	+	±
<i>Enterobacter bugandensis</i> NKC12ep	2.27 ^{gh}	0.00 ^a	+++	-
<i>Enterobacter cancerogenus</i> NKC13ep	3.22 ^{ij}	0.00 ^a	++	-
<i>Enterobacter cloacae</i> NKB13ep	3.29 ^{i-k}	1.52 ^{d-f}	+	-
<i>Enterobacter cloacae</i> NKC11ep	2.39 ^h	0.00 ^a	++	-
<i>Enterobacter cloacae</i> NKC8en	1.19 ^a	1.15 ^b	+++	-
<i>Herbaspirillum aquaticum</i> NKB14en	2.53 ^h	2.15 ^j	+++	-
<i>Lelliottia amnigena</i> NKA1en	2.99 ⁱ	2.12 ^{ij}	++	-
<i>Pantoea agglomerans</i> NKC9en	1.39 ^{a-c}	0.00 ^a	++	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NKC2ep	1.82 ^{d-f}	1.59 ^{ef}	++	++
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> NKA10ep	2.52 ^h	1.51 ^{d-f}	++	+++
<i>Pseudomonas cichorii</i> NKC7ep	2.91 ⁱ	0.00 ^a	+++	-
<i>Pseudomonas frederisbergensis</i> NKB7en	3.77 ^l	0.00 ^a	-	-
<i>Pseudomonas korensis</i> NKF2ep	2.22 ^{gh}	1.32 ^b	+	+
<i>Pseudomonas orientalis</i> NKF1ep	1.14 ^a	1.18 ^b	-	-
<i>Rahnella aquatilis</i> NKF4en	1.11 ^a	3.37 ^l	+++	-
<i>Rhizobium radiobacter</i> NKA9en	1.21 ^a	0.00 ^a	++	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> NKB5en	1.45 ^{a-d}	1.67 ^{fg}	±	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> NKF5en	1.79 ^{de}	1.32 ^{b-d}	+	-
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> NKC1en	2.17 ^{gh}	2.82 ^k	+++	-

Sid-Ind: Siderofor; **Pro-Ind:** Proteaz; **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)

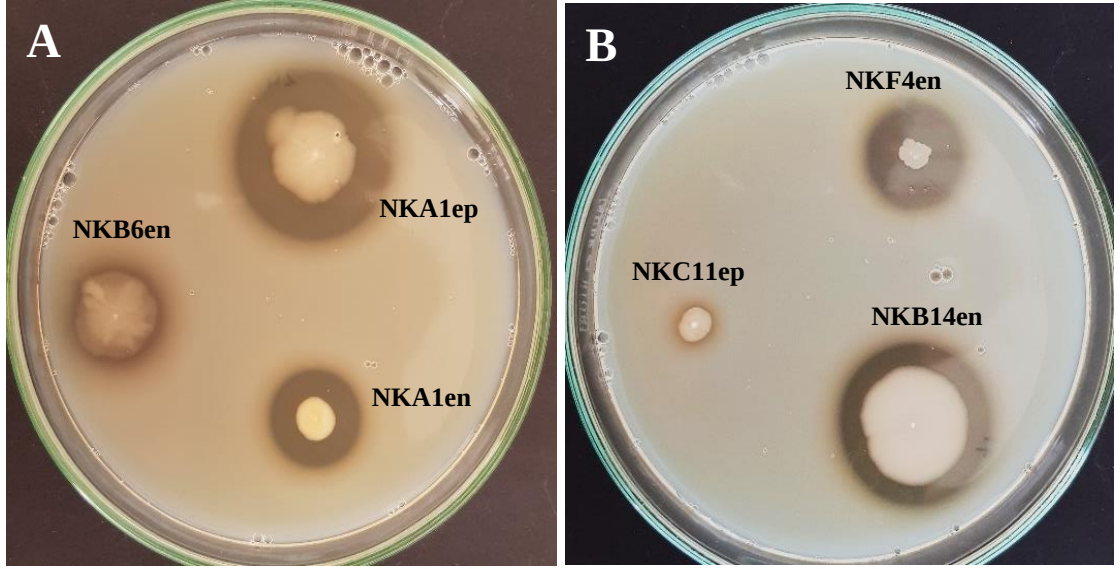


Şekil 4.4. Antagonist bakterilerin CAS Agar üzerinde siderofor üretme potansiyelleri. (A) Aynı petride farklı türlere ait bakteri izolatlar tarafından oluşturulan engelleme bölgeleri (ok). (B) *Pseudomonas chlororaphis* NKA10ep tarafından oluşturulan engelleme bölgesi

Test edilen tüm izolatların 1.08-3.88 siderofor indeks değeri ile siderofor oluşturma yeteneğinde oldukları, farklı türlerin veya aynı türe bağlı izolatlar siderofor oluşturma açısından istatistiksel olarak birbirlerinden önemli düzeyde farklılık gösterdikleri belirlenmiştir (Şekil 4.4, Çizelge 4.6). Çizelge 4.6’da görüleceği gibi CAS agar besiyeri üzerinde oluşturulan engelleme zonunun bakteri çapına oranlanmasıyla elde edilen en yüksek siderofor indeks değeri 3.88 değer ile *Burkholderia cepacia* NKC15en izolatı tarafından oluşturulurken, bu izolatı istatistiksel olarak aynı gruba düşen bir maya türü olan *Aurebasidium pullulans* NKC5en (3.81) ile bakteriyel *Pseudomonas frederisbergensis* NKB7en (3.77), *Bacillus mycoides* NKB9en (3.61) ve *Bacillus megaterium* NKB1ep (3.52) izolatları izlemiştir. Besiyeri üzerinde önemli düzeyde siderofor oluşturan diğer izolatlar *Enterobacter cloacae* NKB13ep (3.29), *Bacillus mojavensis* NKA7en (3.24) ve *Enterobacter cancerogenus* NKC13ep (3.22) olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.6). Test edildikleri fungal etmenlere karşı en yüksek antagonistik etkinlik gösteren türlerden Antagonistik etkinlik gösteren *Bacillus mojavensis* NKA7en (3.24), *Pseudomonas chlororaphis* NKA10ep (2.52), *Bacillus mycoides* NKB9en (3.61) ve *Pseudomonas aeruginosa* NKC2ep (1.82) izolatların oldukça yüksek düzeylerde siderofor ürettikleri belirlenmiştir (Çizelge 4.5 ve Çizelge 4.6). de los Santos-Villalobos ve ark., (2012) tarafından yapılan bir çalışmada, mango kök bölgesinden izole edilen ve tanımlanan *Burkholderia cepacia* XXVI izolatının antaknoz hastalığı etmeni *Colletotrichum*

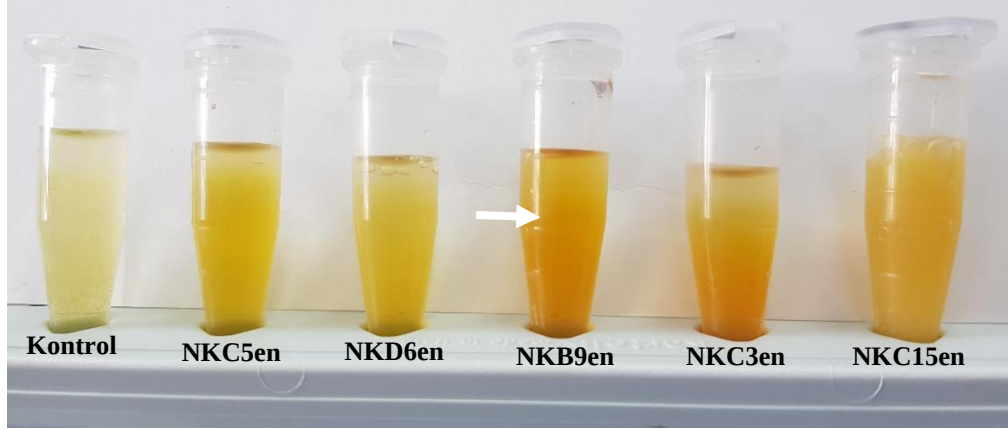
gloeosporioides'in misel gelişimi >%90 düzeyinde engellendiği, engellemede rol oynayan etki mekanizmasının besi yeri üzerinde üretilen antimikrobiyal peptidlerin yanı sıra, hydroxamate tipinde siderofor üretiminden kaynaklandığı bildirilmiştir. Yapılan *in vivo* çalışmalarda da gerek *Burkholderia cepacia* XXVI izolatının gerekse ürettikleri hydroxamate tipinde siderofor'un yüksek antifungal etkinlik göstermesi, her ikisinin de hastalıkla biyolojik mücadelede etkili bir şekilde kullanılabilecek potansiyele sahip olduğu belirlenmiştir.

Antagonist bakteriler tarafından üretilen ve fungal hastalık etmenlerinin hücre duvarı yapısında bozulmalara ve erimelere neden olan preolitik enzimlerden proteaz enzim üretimi yağı alınmış süt tozu içeren (%2) LB besi yerinde oluşturulan engelleme zonunun bakteri çapına oranlanmasıyla belirlenmiş ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4.6'da ve Şekil 4.5'de gösterilmiştir. Test edilen 43 izolattan 28 izolatın 1.13-3.37 indeks değerleri arasında değişen oranda proteaz enzimi ürettikleri kantitatif olarak belirlenmiştir. Siderofor analizlerinde olduğu gibi farklı antagonist türlerin veya aynı türe bağlı farklı izolatlar proteaz oluşturma açısından istatistiksel olarak birbirlerinden önemli düzeyde farklılık gösterdikleri gözlenmiştir. Çizelge 4.6'da görüldüğü üzere, bakteri izolatları arasında en yüksek proteaz enzimi 3.37 indeks değeri ile *Rahnella aquatilis* NKF4en izolatı tarafından oluşturulmuş, bu izolatı sırasıyla 2.82 indeks değeri ile *Stenotrophomonas maltophilia* NKC1en, 2.77 indeks değeri ile *Bacillus subtilis* NKA5en, 2.16 indeks değeri ile *Bacillus megaterium* NKA1ep, 2.15 indeks değeri ile *Herbaspirillum aquaticum* NKB14en ve 2.12 indeks değeri ile *Lelliottia amnigena* NKA1en izolatları izlemiştir. Test edildikleri fungal etmenlere karşı yüksek düzeyde antagonistik etkinlik gösteren (Çizelge 4.5) türlerden *Bacillus mojavensis* NKA7en (1.13), *Pseudomonas chlororaphis* NKA10ep (1.51), *Bacillus mycoides* NKB9en (1.88) ve *Pseudomonas aeruginosa* NKC2ep (1.59) izolatların farklı düzeylerde proteaz enzim aktivitesi gösterdikleri belirlenmiştir (Çizelge 4.6).



Şekil 4.5. (A ve B) Farklı antagonist bakteri izolatlarının SMLBA besi yerinde proteaz enzim üretme potansiyellerinin belirlenmesi. Bakteri izolatlarınca üretilen proteaz besi yeri üzerinde farklı çaplarda oluşturulan engelleme bölgeleri (ok) ile karakterize edilmiştir

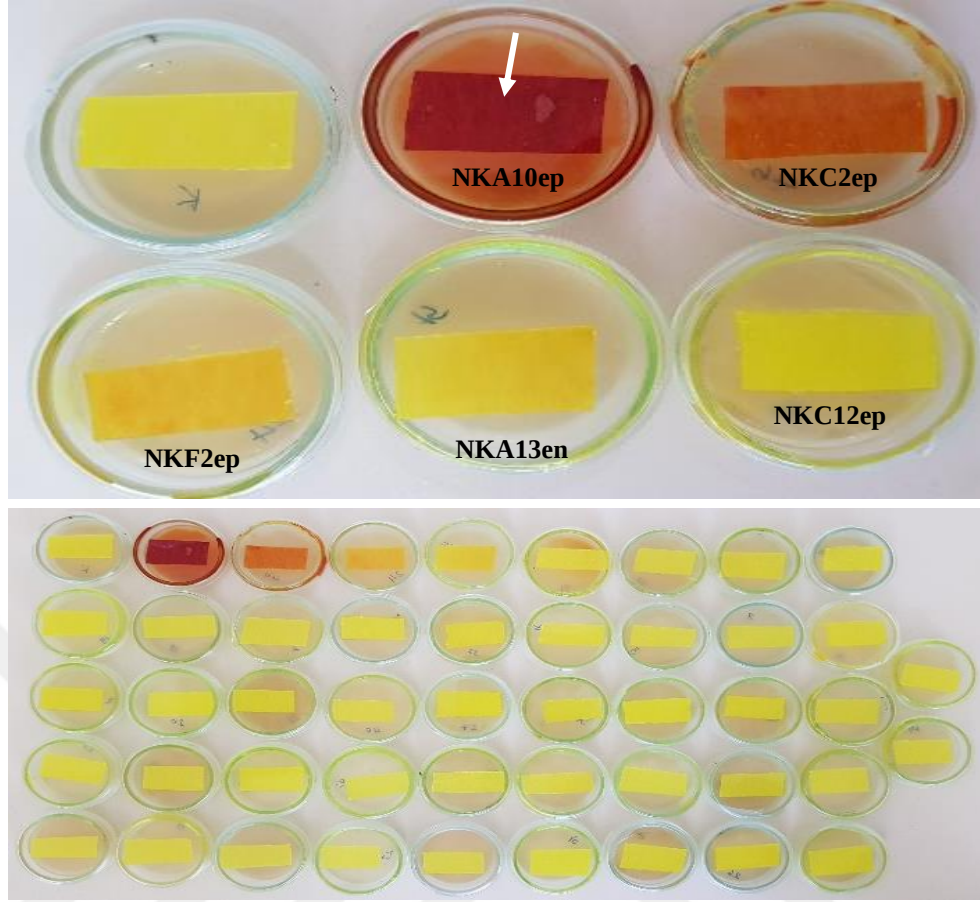
Bakteri izolatların bir diğer antagonistik etki mekanizmalarından olan uçucu bileşiklerden amonyak (NH_3) oluşturma potansiyelleri, peptonlu su içinde gelişen bakteri süspansiyonu üzerine Nessler's çözeltisi eklenmek suretiyle belirlenmiştir (Cappuccino ve Sherman, 2013). Besi yeri içerisinde bakterilerce üretilen amonyak miktarı tüplerdeki besi yeri renginin açık sarıdan kahverengi-koyu sarı renge dönüşmesiyle kalitatif olarak belirlenmiştir (Şekil 3.5F, Şekil 4.6). Çizelge 4.6'da görüleceği gibi, aralarında yüksek oranda antagonistik etkinlik gösteren *Bacillus mojavensis* NKA7en, *Pseudomonas chlororaphis* NKA10ep, *Bacillus pumilus* NKC3en ve *Pseudomonas aeruginosa* NKC2ep bakteriyel izolatların bulunduğu 35 bakteri izolat besi yeri içerisinde değişen miktarlarda amonyak ürettikleri belirlenmiştir.



Şekil 4.6. Farklı antagonist bakteri izolatlarının amonyak üretme potansiyellerinin belirlenmesi. Bakteri antagonist izolatlarınca besi yeri içerisinde oluşturulan amonyak üretimi tüplerdeki besi yeri renginin açık sarıdan koyu sarı-kahverengine (ok) dönüşmesiyle belirginleşmiştir

Bakteri izolatların bir diğer antagonistik etki mekanizmalarından olan hidrojen siyanür (HCN), glycine içeren besi yerinde kalitatif olarak renk değişiklik şiddetine göre (Şekil 4.7) belirlenmiştir. Çizelge 4.6’da gösterildiği gibi, 43 izolat arasında sadece 4 izolatın değişen şiddetlerde HCN ürettiği belirlenmiştir. Test edilen izolatlar arasında en yüksek HCN üretimi antagonistik etkinliği oldukça yüksek izolatlardan olan *Pseudomonas chlororaphis* NKA10ep tarafından üretilirken, bu izolatı bir diğer güçlü antagonistik etkiye sahip olan *Pseudomonas aeruginosa* NKC2ep ile nispeten düşük antagonist etkiye sahip *Pseudomonas korensis* NKF2ep ve *Enterobacter bugandensis* NKA13en izolatları izlemiştir. Aralarında yüksek oranda antagonistik etkinlik gösteren *Bacillus mojavensis* NKA7en ve *Bacillus pumilus* NKC3en gibi birçok izolatın HCN üretme potansiyelinin olmadığı tespit edilmiştir.

Yapılan önceki çalışmalarda, antagonist bakteri izolatı *Pseudomonas chlororaphis* subsp *aurantiaca*’nın soya fasulyesinde kömür çürüklüğü hastalık etmenine (*Macrophomina phaseolina*) karşı bitki gelişimini teşvik eden mekanizmaların yanısıra antimikrobiyal etkinlik gösteren phenazin, phenazin türevleri ve HCN üretimini tetikleyen genlere sahip olduğunu bildirilmiştir (Rovera ve ark., 2014).



Şekil 4.7. Antagonist bakterilerin glycine içeren TSA besisi yerinde hidrojen siyanür (HCN) üretme potansiyelleri. Bakteri izolatu tarafından artan şiddette üretilen HCN sonucu petri kapağındaki filtre kâğıdı kırmızı-turuncu renge (ok) dönüşmüştür

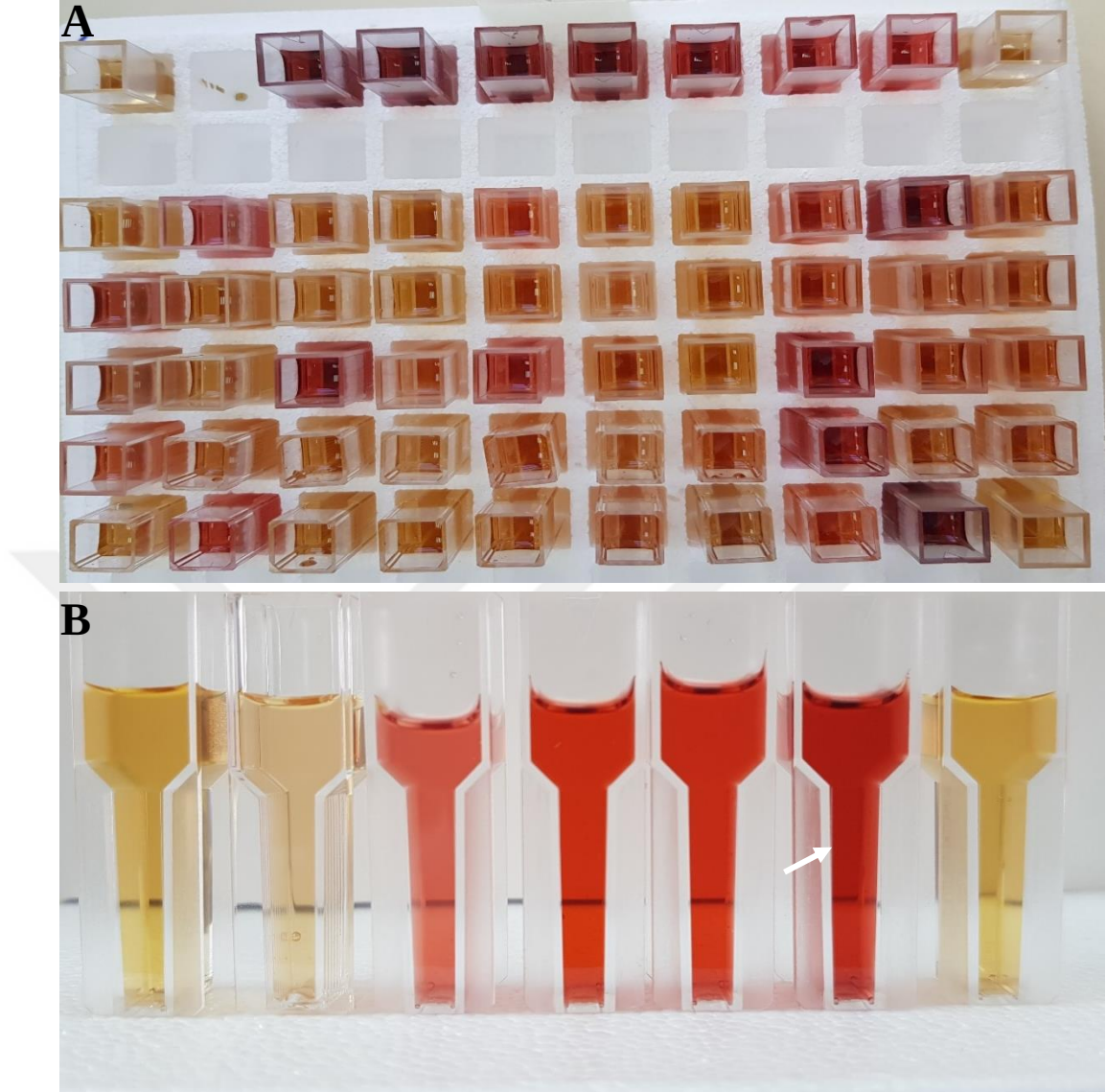
Zhang ve ark., (2015), tarafından yapılan bir diğer çalışmada, patates yumru ve toprakları ile soya fasulyesi yapraklarından elde edilen *Bacillus amyloliquefaciens*, *Paenibacillus polymyxa*, *Pseudomonas chlororaphis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis* ve *Pseudomonas* sp. olarak tanımlanan 13 farklı bakteri izolatının 10 farklı toprak kökenli fungal hastalık etmenine karşı değişen oranlarda ve yüksek düzeyde antifungal etkinlik gösterdiğinin, antagonist bakteri türlerinin fungal etmenler karşı gösterilen antifungal etkinliklerden HCN, siderofor, β -1,3-glucanase, chitinase, proteaz gibi antimikrobiyal bileşik ve enzimlerin yanı sıra, bitkilerde bitki gelişimini teşvik eden IAA, salicylic acid, azot fiksasyonu ve fosforu çözme etkinliklerindeki gösterdiklerini bildirmişlerdir.

4.4. Epifit ve Endofit Bakteri İzolatlarının Bitki Büyüme Gelişimini Teşvik Eden Mekanizmalarının Belirlenmesi

Denemelerde antagonistik etkinlikleri belirlenen bakteri türleri temsilen seçilmiş farklı izolatların bitki büyümesini teşvik etmekten sorumlu olabilecek olası etki mekanizmalarından indol asetik asit (IAA) üretme potansiyelleri, L-tryptophane içeren LB sıvı besi içinde inokulasyondan 4 gün sonra standart IAA absorbans değerlerine göre ppm ($=\mu\text{g/ml}$) düzeyinde kantitatif olarak belirlenmiştir (Şekil 3.7CD, Şekil 4.8). Bakteri izolatların fosforu çözme potansiyelleri ise tri kalsiyum fosfat içeren Pikovskaya Agar (PVK) besi 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 tüm izolatların tamamı 0.12-136.28 $\mu\text{g/ml}$ aralığında değişen konsantrasyonlarda IAA üretmiştir. İzolatların geneli değerlendirildiğinde, Gram negatif bakteri türlerinden *Pseudomonas aeruginosa* NKC2ep (136.28 $\mu\text{g/ml}$), *Enterobacter cloacae* NKC8en (123.68 $\mu\text{g/ml}$), *Enterobacter cloacae* NKC11ep (99.26 $\mu\text{g/ml}$) ve *Enterobacter cancerogenus* NKC13ep (90.68 $\mu\text{g/ml}$) izolatlarının nispeten yüksek düzeylerde IAA ürettikleri belirlenmiştir. Çizelge incelendiğinde aynı cinse veya türe ait bakteri izolatları tarafından üretilen IAA konsantrasyon değerleri arasında istatistiksel olarak önemli farklılıklar gözlenmiştir. Bu durum özellikle *Enterobacter cloacae* (13.78-123.68 $\mu\text{g/ml}$), *Bacillus megaterium* (3.68-53.98 $\mu\text{g/ml}$) izolatları arasında oldukça çarpıcı düzeylerde kaydedilmiştir.

Badem ağaçları ve tıbbi bitkilerden izole edilmiş ve bitki büyümesini teşvik eden özelliklerini belirlemeye yönelik yapılmış önceki çalışmalarda farklı *Enterobacter* spp. (*Enterobacter cloacae* ssp *cloacae* ve *Enterobacter cloacae* ssp *dissolvens*) ait izolatların, oldukça önemli düzeyde IAA üretmelerinin yanısıra hastalık etmeni *Macrophomina phaseolina*’ya karşı misel gelişimlerini engellemek suretiyle antagonsitik etkide bulunduğu bildirilmiştir (Rani ve Reddy, 2011; Ullah ve ark., 2017; Aktan ve Soylu, 2020).



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

Bakteriler içerisinde en yüksek düzeyde IAA üreten *Pseudomonas aeruginosa* NKC2ep izolatının aynı zamanda fungal hastalık etmenlerine karşı %58.33-73.33 değişen oranında oldukça güçlü bir antagonistik etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.6). Benzer şekilde en yüksek antagonistik etkiye sahip izolatlardan olan *Pseudomonas chlororaphis* NKA10ep izolatıda 40.07 µg/ml gibi nispeten yüksek düzeyde IAA üretme potansiyeline sahip izolat olarak belirlenirken, *Bacillus mojavensis* NKA7en (10.90 µg/ml), *Bacillus pumilus* NKC3en (3.57 µg/ml) ve *Bacillus mycoides* NKB9en (5.32

µg/ml) gibi güçlü antagonist bakteri izolatların nispeten daha düşük konsantrasyonlarda IAA ürettikleri belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlarımıza göre epifit bakteri izolatların IAA üretme potansiyelinin endofit türlere kıyasla daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.7. Farklı epifit ve endofit antagonist bakteri izolatların bitki büyümesini teşvik edilmesinde kullandıkları olası mekanizmalar.

Bakteri İzolatı	Bitki büyümesini teşvik eden mekanizmalar ^a	
	IAA (µg/ml)	Fosfor Çözme İndeksi
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NKC2ep	136.28 ^t	2.56 ^{de}
<i>Enterobacter cloacae</i> NKC8en	123.68 ^s	0.00 ^a
<i>Enterobacter cloacae</i> NKC11ep	99.26 ^r	1.17 ^b
<i>Enterobacter cancerogenus</i> NKC13ep	90.68 ^p	1.19 ^b
<i>Lelliottia amnigena</i> NKA1en	60.38 ^o	1.27 ^b
<i>Pantoea agglomerans</i> NKC9en	54.80 ⁿ	2.71 ^e
<i>Bacillus megaterium</i> NKA1ep	53.98 ⁿ	0.00 ^a
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> NKA10ep	40.07 ^m	0.00 ^a
<i>Pseudomonas frederisbergensis</i> NKB7en	32.61 ^l	1.64 ^c
<i>Pseudomonas korensis</i> NKF2ep	32.56 ^l	2.72 ^e
<i>Enterobacter asburiae</i> NKC11en	26.04 ^k	2.45 ^d
<i>Rahnella aquatilis</i> NKF4en	22.43 ^j	0.00 ^a
<i>Enterobacter bugandensis</i> NKC12ep	21.60 ^j	1.19 ^b
<i>Pseudomonas cichorii</i> NKC7ep	21.21 ^j	1.58 ^c
<i>Bacillus endophyticus</i> NKB3en	19.62 ^{ij}	0.00 ^a
<i>Enterobacter cloacae</i> NKB13ep	13.78 ^{gh}	0.00 ^a
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> NKB6en	13.74 ^{gh}	0.00 ^a
<i>Bacillus atrophaeus</i> NKA3en	13.63 ^{gh}	1.20 ^b
<i>Bacillus mojavensis</i> NKA7en	10.90 ^{fg}	0.00 ^a
<i>Bacillus pumilus</i> NKC14ep	10.51 ^{fg}	1.13 ^b
<i>Bacillus mojavensis</i> NKB2ep	10.18 ^{fg}	0.00 ^a
<i>Bacillus cereus</i> NKC4ep	8.79 ^{ef}	0.00 ^a
<i>Bacillus simplex</i> NKA4en	9.28 ^{ef}	0.00 ^a
<i>Pseudomonas orientalis</i> NKF1ep	9.01 ^{ef}	0.00 ^a
<i>Enterobacter bugandensis</i> NKA13en	7.25 ^{d-f}	1.24 ^b
<i>Bacillus subtilis</i> NKA5en	6.81 ^{c-f}	0.00 ^a
<i>Herbaspirillum aquaticum</i> NKB14en	6.81 ^{c-f}	0.00 ^a
<i>Aurebasidium pullulans</i> NKC5en	5.99 ^{c-e}	0.00 ^a
<i>Acinetobacter radioresistens</i> NKB12en	5.45 ^{b-e}	0.00 ^a
<i>Bacillus halosaccharovorans</i> NKB4en	5.36 ^{b-e}	0.00 ^a
<i>Bacillus mycoides</i> NKB9en	5.32 ^{b-e}	0.00 ^a
<i>Bacillus pumilus</i> NKC6en	5.31 ^{b-e}	1.28 ^b
<i>Burkholderia cepacia</i> NKC15en	5.22 ^{b-e}	1.20 ^b
<i>Staphylococcus epidermidis</i> NKB5en	4.43 ^{b-d}	0.00 ^a

Çizelge 4.7. (Devamı) Farklı epifit ve endofit antagonist bakteri izolatların bitki büyümesini teşvik edilmesinde kullandıkları olası mekanizmalar

Bakteri İzolatı	Bitki büyümesini teşvik eden mekanizmalar ^a	
	IAA (µg/ml)	Fosfor Çözme İndeksi
<i>Bacillus safensis</i> NKA12ep	4.07 ^{a-d}	0.00 ^a
<i>Acinetobacter johnsonii</i> NKA11en	4.04 ^{a-d}	0.00 ^a
<i>Bacillus megaterium</i> NKB1ep	3.68 ^{a-d}	0.00 ^a
<i>Bacillus pumilus</i> NKC3en	3.57 ^{a-d}	1.14 ^b
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> NKC1en	3.46 ^{a-d}	0.00 ^a
<i>Bacillus subtilis</i> NKA6en	3.17 ^{a-d}	0.00 ^a
<i>Staphylococcus epidermidis</i> NKF5en	2.66 ^{a-c}	0.00 ^a
<i>Rhizobium radiobacter</i> NKA9en	1.65 ^{ab}	0.00 ^a
<i>Acinetobacter dijkschoorniae</i> NKA8en	0.12 ^a	3.05 ^f

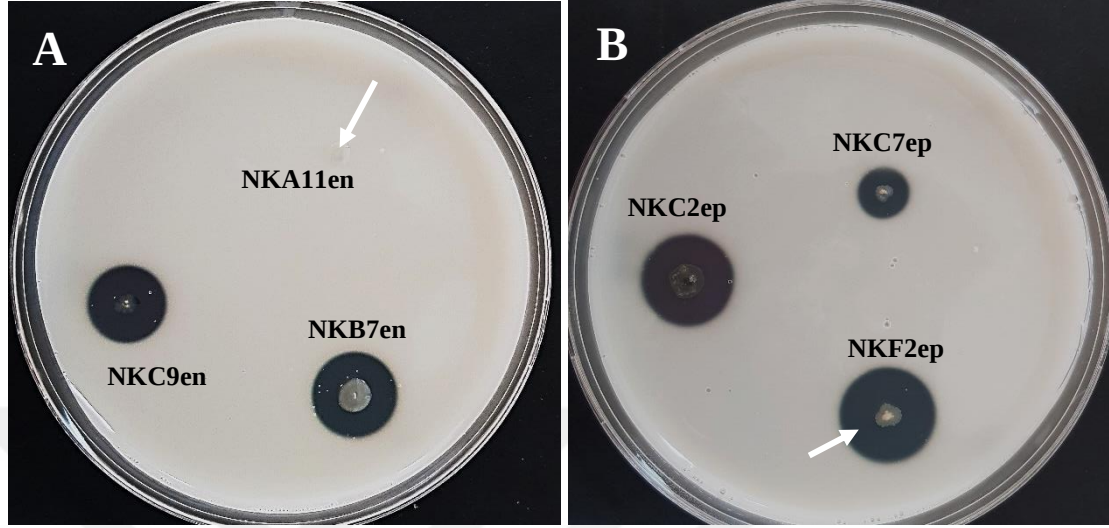
^a Aynı sütun içerisinde yer alan ortalama değerlerin yanındaki aynı küçük harfler izolatlar arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığını gösterir (Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi, P<0.05)

Test edilen bakteri izolatların fosfor çözme potansiyelleri ise tri kalsiyum fosfat içeren Pikovskaya Agar (PVK) besi 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 4.6’da verilmiştir. Çizelge 4.6’da gösterildiği gibi test edilen 43 izolatın 26 tanesi (%60.5) PVK besiyeri üzerinde fosfor çözme etkinliği göstermezken (Şekil 4.9A), 17 izolatın 1.13 ile 3.05 arasında değişen çözünürlük indeks değerlerinde fosforu çözme potansiyeline sahip izolatlar (Şekil 4.9B) olduğu belirlenmiştir.

Test edilen tüm izolatlar arasında en fazla fosfor çözen (engelleme bölgesi çapı en fazla olan) bakteri izolatların 3.05, 2.72 ve 2.71 çözünürlük indeks değerleri ile *in vitro* orta düzeyde antagonistik etkinlik gösteren izolatlardan Gram negatif *Acinetobacter dijkschoorniae* NKA8en, *Pseudomonas korensis* NKF2ep ve *Pantoea agglomerans* NKC9en izolatları olmuştur (Şekil 4.9). Rokhbakhsh-Zamin ve ark., (2011) *Pennisetum glaucum* bitkilerin kök bölgelerinden izole edip tanıladıkları 31 farklı *Acinetobacter* spp ait izolat arasından 26 izolatın bitki gelişimini teşvik etmede IAA üretilmelerinin yanı sıra, fosfor ve çinko elementlerini çözme ve hydroxamate-ve catechol-tiplerde siderofor üretmek suretiyle bitki büyümesini önemli düzeyde teşvik ettiğini bildirilmiştir.

Test edildikleri fungal etmenlere karşı yüksek düzeyde antagonistik etkinliğe sahip bakteri izolatlarından *Bacillus mojavensis* NKA7en, *Pseudomonas chlororaphis* NKA10ep, *Bacillus mycoides* NKB9en izolatları fosfor çözme etkinliği gösteremezken,

Pseudomonas aeruginosa NKC2ep (2.56) ve *Bacillus pumilus* NKC3en (1.14) izolatların fosfor çözme aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir.



Şekil 4.9. (A ve B) Farklı antagonist bakteri izolatlarının PVK besi yerinde fosforu çözebilme potansiyellerinin belirlenmesi. (A) Bazı izolatların fosforu çözemediği (ok) gözlenmiştir. (B) Bakteri izolatlarınca çözülen fosfor antagonist türüne bağlı olarak besi yeri üzerinde farklı çaplarda oluşturulan engelleme bölgeleri (ok) ile karakterize edilmiştir (ok)

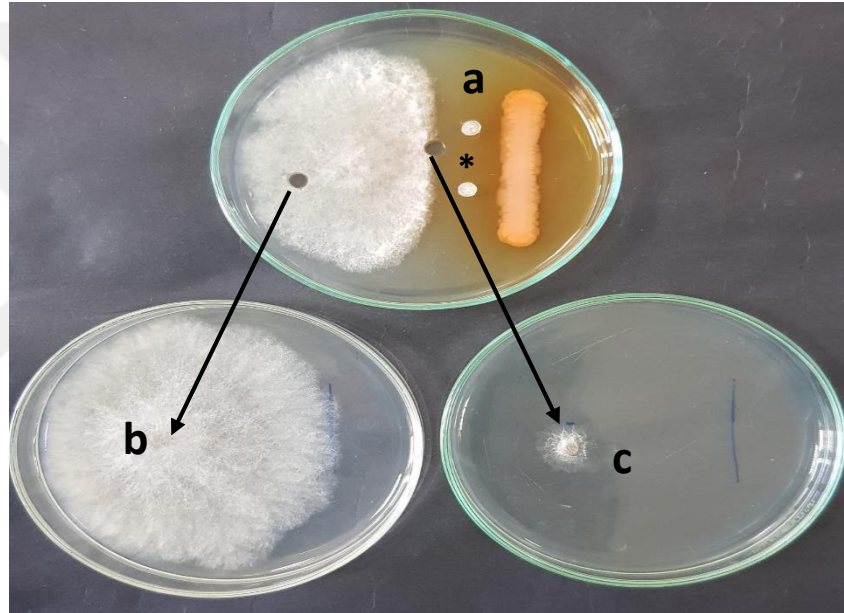
İzolatlar arasında fosforu çözme aktivitesi bakımından istatistiksel olarak önemli düzeyde farklılıklar tespit edilmiştir (Çizelge 4.6). Özellikle *Pseudomonas* ve *Acinetobacter* spp ait izolatlar arasında bu farklılık oldukça önemli bir boyutta olduğu görülmektedir. *Bacillus* spp içerisinde sadece *B. atrophaeus* ve *B. pumilus* türlerine ait izolatlar fosfor çözmede etkinlik gösterirken, diğer türlerin fosforu çözmede etkili olmadıkları tespit edilmiştir.

4.5. Antagonist Epifit ve Endofit Bakteri İzolatlarının Fungal Etmenlerin Misel Gelişimini Engelleyen Bölgelerinin Fungisidal ve Fungistatik Özelliklerinin Belirlenmesi

Antagonistik etkinliği yüksek izolatlarla fungal misel arasında kalan engelleme bölgesine difüze olan bakteri hücresi tarafından üretilen antifungal bileşiklerin etkinliğin fungisidal veya fungistatik özelliklerinin belirlenmesi amacıyla taze fungal kültürden alınan 2 canlı misel diski yerleştirilerek tekrar inkübasyona bırakıldığında, fungal

disklerden herhangi bir gelişmenin görülmemesi, antagonist bakteri tarafından üretilen bileşik(ler)in etkinliğinin fungusidal özellikte olduğunu göstermiştir (Şekil 4.10A).

Yine ikili kültür petrilerinde gelişen fungusun engelleme bölgesine yakın ve uzakdaki yerlerinden alınan disklerin PDA petrilerine ekimleri yapılarak buradaki hiflerin canlılık durumu belirlenmiştir. İnkübasyondan 4 gün sonra engelleme bölgesine uzak ve yakın yerlerinden alınan her iki diskin PDA besiyerinde gelişme gösterdiği, engelleme bölgesine yakın yerden alınan ve morfolojik bozukluk gözlenen misel diskin (Şekil 4.10C) uzak noktadan alınan sağlıklı misel diske (Şekil 4.10B) oranla daha yavaş geliştiği gözlenmiştir.



Şekil 4.10. Engelleme bölgesindeki bileşiklerin fungusidal etkinliğinin belirlenmesi. (a)

Engelleme bölgesindeki (*) misel disklerinden gelişme görülmemesi bu bölgelerde üretilen bileşiklerin fungusidal etkinliğini göstermektedir. Engelleme bölgesine uzak yerden alınan diskin (b) yakın yerden alınan yapısal bozukluğun olduğu diskin misel gelişimine (c) kıyasla daha hızlı gelişme göstermiştir

4.6. Antagonist Bakteri İzolatlarının Uçucu Bileşenlerinin Fungal Etmenlerin Misel Gelişimi Üzerine *in vitro* Antagonistik Etkinliğinin Belirlenmesi

In vitro etkinlik çalışmalarında fungal etmenlerin misel gelişimini etkili şekilde engelleyen farklı *Bacillus* ve *Pseudomonas* türlerine ait izolatlar (*Bacillus pumilus* NKC3en, *Bacillus pumilus* NKC14ep, *Bacillus mojavensis* NKA7en, *Bacillus atrophaeus* NKA3en, *Pseudomonas chlororaphis* NKA10ep) tarafından olası uçucu bileşenlerin

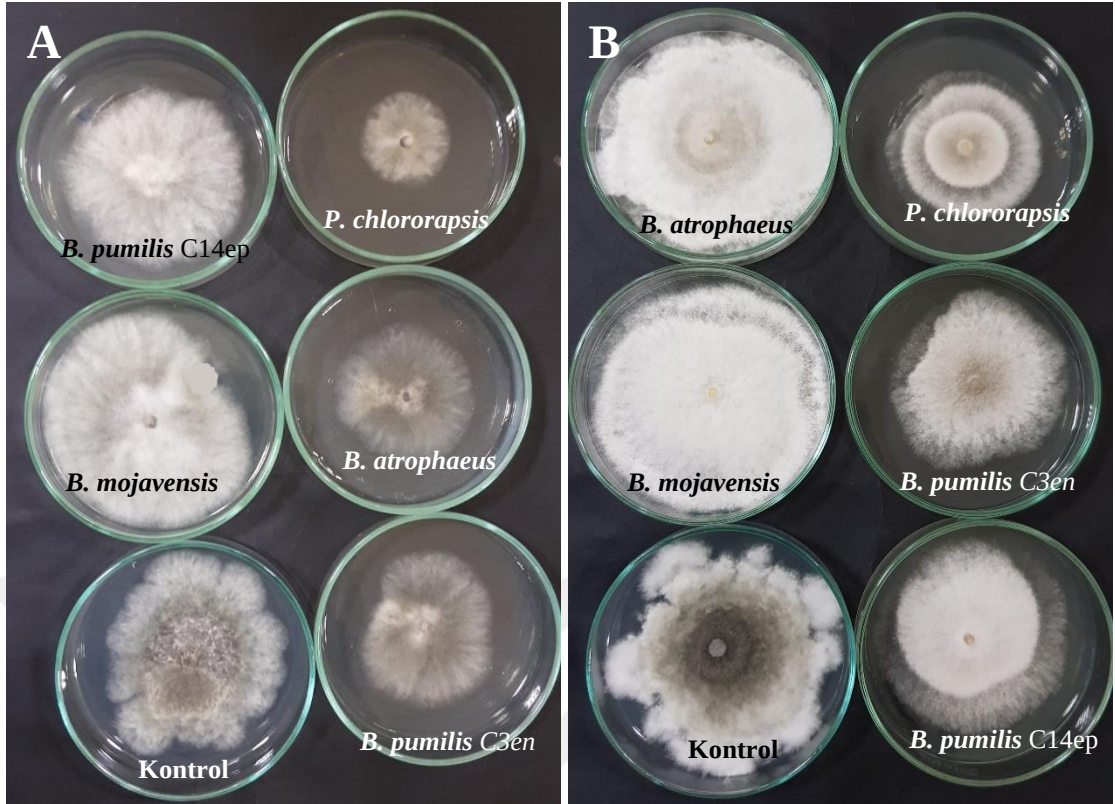
antifungal etkinliği birbirlerine temas etmeyecek şekilde tasarlanmış ikili kùltür testleri ile belirlenmiştir. Bakteriyel etmenin uçucu bileşenlerin antifungal etkinliği daha önce yapılan ikili kùltür testlerinde besiyerine difüze olan bileşenlerden (Çizelge 4.5) daha düşük seviyelerde olduğu gözlenmiştir. Çalışmalarda kullanılan bakteriyel izolatlar arasında her 3 fungal hastalık etmenine karşı en yüksek antagonistik etkinlik *Pseudomonas chlororaphis* NKA10ep izolatı tarafından gösterilmiştir (Çizelge 4.8, Şekil 4.11B). *Pseudomonas chlororaphis* NKA10ep izolatı tarafından üretilen uçucu bileşenler *Botryosphaeria dothidea* misel gelişimini %53.6 oranında engellerken (Çizelge 4.8, Şekil 4.12), diğer fungal etmenler için engelleme oranları *Neofusicoccum parvum* için %27.6, *Neoscytalidium dimidiatum* için ise %14.8 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.8, Şekil 4.11). *In vitro* ikili kùltür testlerinde %80 gibi yüksek antagonistik etkinlik gösteren *Bacillus pumilus* NKC3en, *Bacillus pumilus* NKC14ep, *Bacillus mojavensis* NKA7en ve *Bacillus atrophaeus* NKA3en izolatların (Çizelge 4.5) uçucu bileşenlerinin antifungal etkinliği diğer test edilmiş fungal etmenlere karşıda düşük düzeylerde gerçekleşmiştir (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.8. Farklı antagonist bakteri izolatların uçucu bileşenlerinin *in vitro* ikili kùltür testlerinde fungal etmenlerin misel gelişimi (mm)üzerine etkinliği

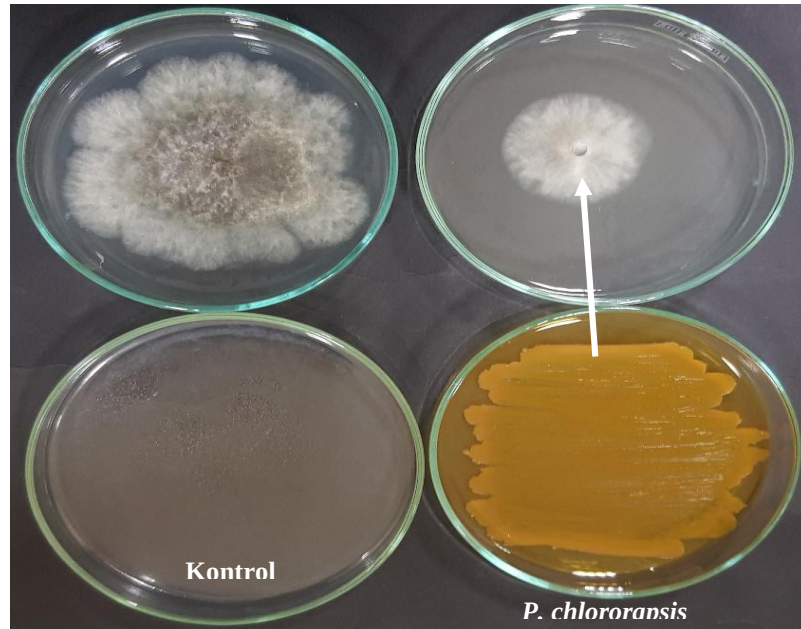
Antagonist bakteri izolatları	Fungal etmenler					
	<i>N. parvum</i>		<i>N. dimidiatum</i>		<i>B. dothidae</i>	
	MG (mm)	MGE (%)	MG (mm)	MGE (%)	MG (mm)	MGE (%)
Kontrol	88.33e		90.00c		79.00d	-
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> NKA10ep	60.33a	27.60	76.67a	14.81	36.67a	53.59
<i>Bacillus pumilus</i> NKC3en	65.33b	21.60	90.00c	0.00	55.67b	29.54
<i>Bacillus pumilus</i> NKC14ep	73.67c	11.60	90.00c	0.00	66.00c	16.46
<i>Bacillus mojavensis</i> NKA7en	82.33d	1.20	88.33c	1.85	77.00d	2.53
<i>Bacillus atrophaeus</i> NKA3en	90.00e	0.00	83.33b	7.41	55.00b	30.38

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).

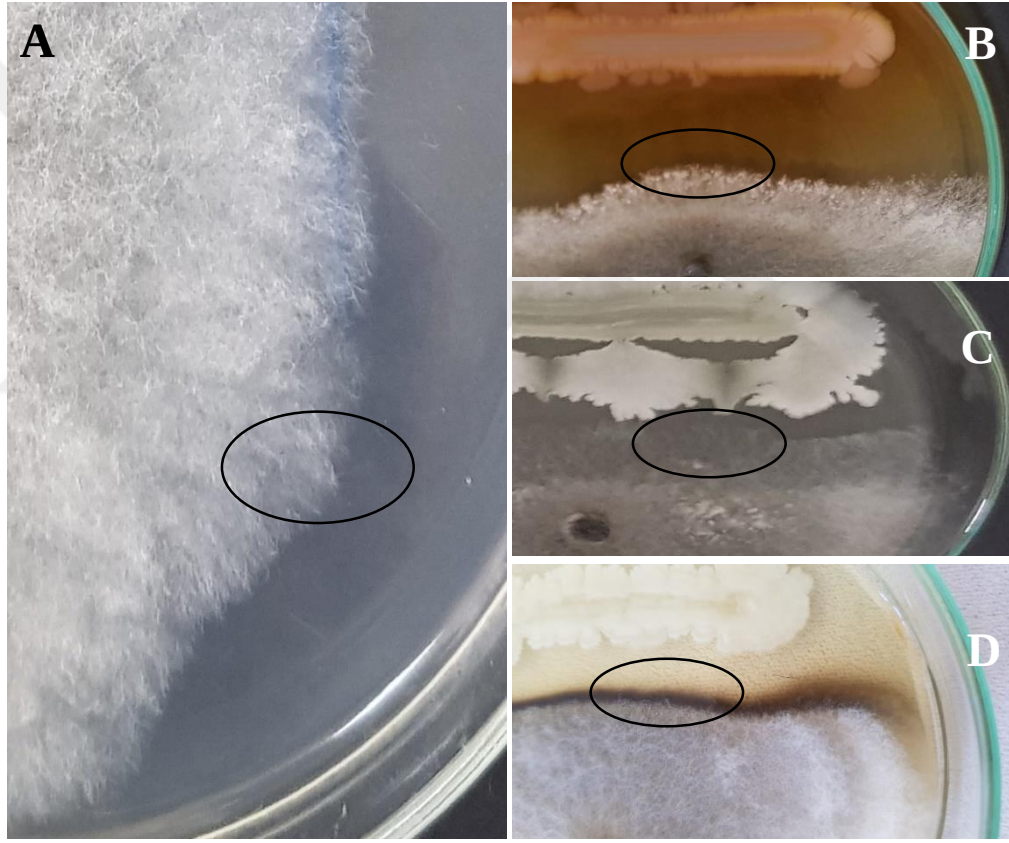


Şekil 4.11. Farklı antagonist bakteri izolatlarının uçucu bileşenlerin *Botryosphaeria dothidea* (A) ve *Neofusicoccum parvum* (B) misel gelişimi üzerine antagonistik etkinlikleri



Şekil 4.12. *Pseudomonas chlororaphis* NKA10ep izolatının uçucu bileşenlerin *Botryosphaeria dothidea* misel gelişiminin engellenmesi (ok) üzerine antagonistik etkinlikleri

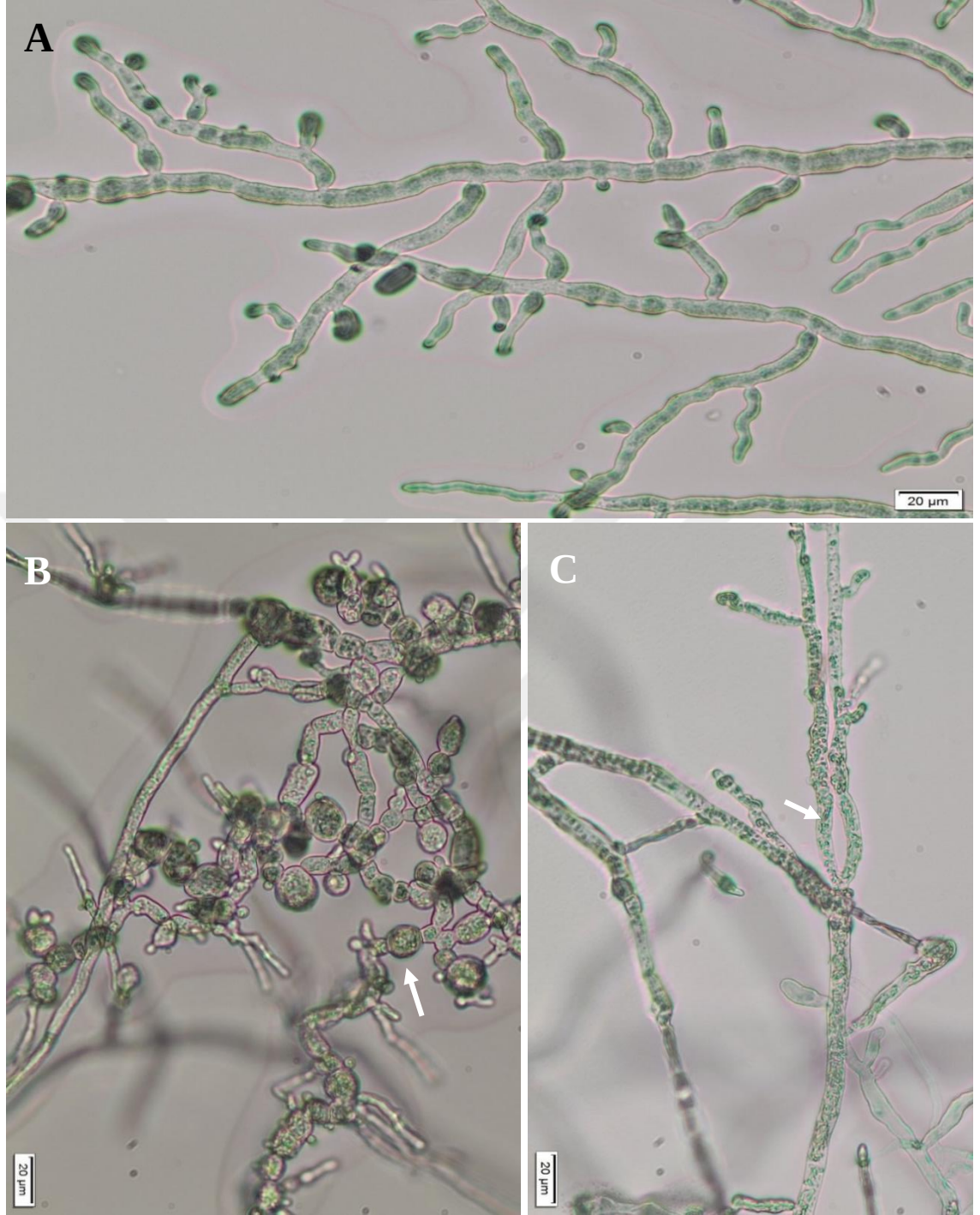
İkili kültür testlerinin yapıldığı petrilerde yüksek düzeyde antagonistik etkinlik gösteren antagonist bakteri türleri arasında *Pseudomonas chlororaphis* NKA10ep, *B. mojavensis* NKP7en, NKP2ep, *Bacillus pumilus* NKC3en ve *Bacillus amyloliquefaciens* NKB6en izolatlarının fungal hastalık etmenlerinden *Neoscytalidium dimidiatum* ve *Neofusicoccum parvum*'un kontrol petrilerinde kalın duvarlı sağlıklı misellerle kıyasandığında (Şekil 4.13A) misel gelişimini durdurduğu engelleme bölgesine yakın noktalarda hifleri üzerinde en uç kısımlarında beyaz topaklaşma (Şekil 4.13B), büyümenin baskılandığı şeffaf (Şekil 4.13C) ve kararmış erimeler (Şekil 4.13D) şeklinde makroskopik olarak gözlenebilen deformasyonlara neden olduğu gözlenmiştir.



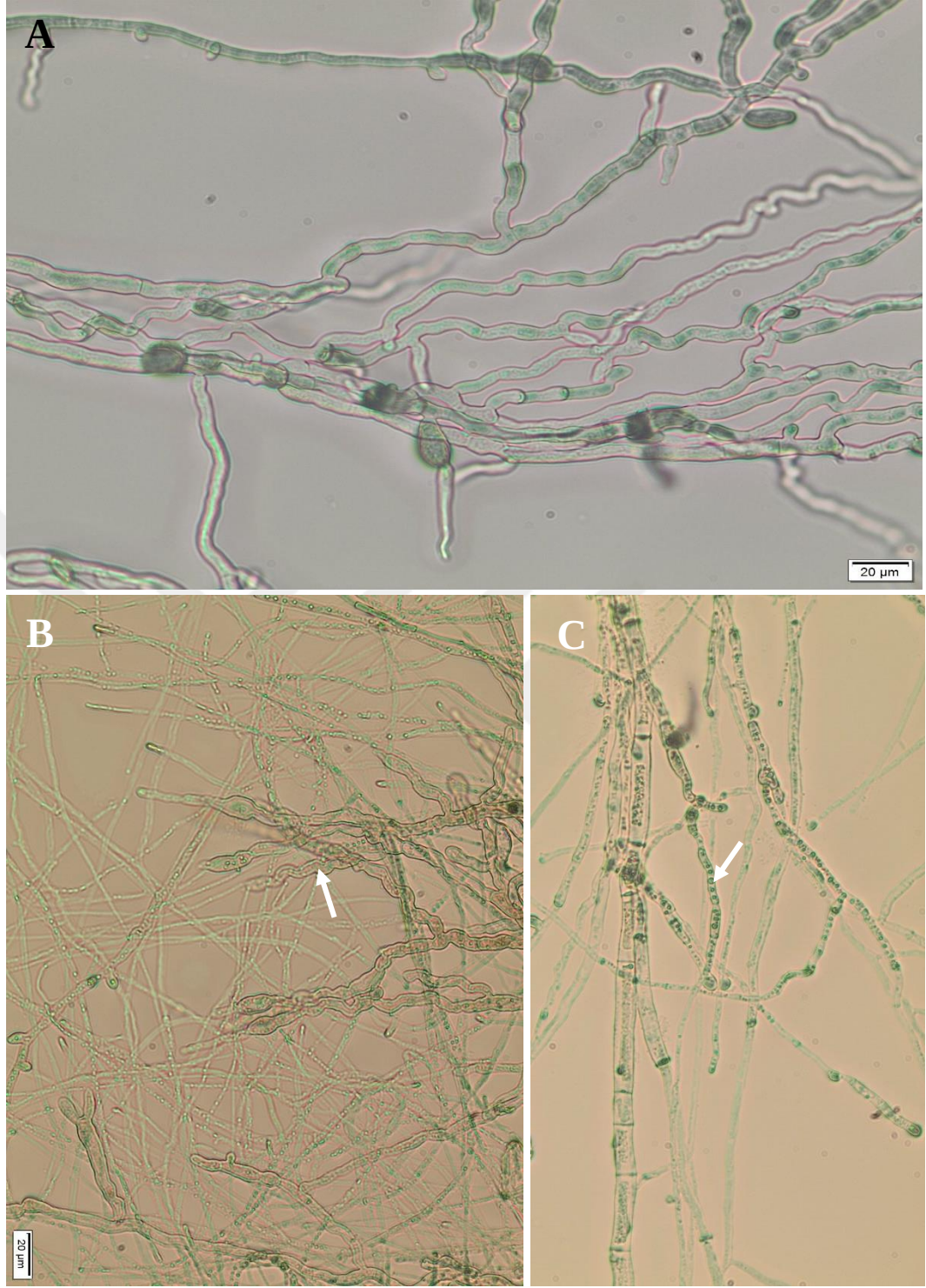
Şekil 4.13. Antagonist bakteri izolatlarının engelleme bölgesine yakın noktalardaki (daire içinde gösterilen) fungal etmenlerden *Neoscytalidium dimidiatum* (A-C) ve *Neofusicoccum parvum* (D) hifleri üzerinde neden oldukları morfolojik deformasyonlar. (A) Kontrol petrilerinde gelişen kalın duvarlı sağlıklı fungus hifleri. (B) *Pseudomonas chlororaphis* NKA10ep izolatı tarafından neden olunan hiflerde beyaz topaklaşma, (C ve D) *B. mojavensis* NKP7en ve *Bacillus pumilus* NKC3en izolatları tarafından neden olunan hif uçlarında şeffaf ve kararmış erime belirtileri (daire içinde gösterilen)

Neoscytalidium dimidiatum ve *Neofusicoccum parvum*'un hif gelişiminin engellendiği en uç bölgesinde ışık mikroskopu ile yapılan mikroskobik gözlemlerde *Bacillus pumilus* NKC3en ve *Pseudomonas chlororaphis* NKA10ep izolatlarının *Neoscytalidium dimidiatum*'un hiflerin uç noktalarında boğumlaşmış kısalmalar şeklinde anormalliklere neden olduğu (Şekil 4.14B) gözlenmiştir. Antagonist bakteri izolatlarından *B. mojavensis* NKP7en, NKP2ep, *Bacillus pumilus* NKC3en ve *Bacillus amyloliquefaciens* NKB6en izolatının bulunduğu petrilerde engelleme bölgesine yakın noktalarda şeffaf veya kararma şeklinde erime belirtileri gösteren hiflerin mikroskop altında incelendiğinde her iki fungal etmenin hiflerinde pıhtılaşma, kalınlaşma ve uç noktalarda fungus duvarlarının erimelerinden kaynaklanan sitoplazmik içeriğin dışarıya boşalması şeklinde morfolojik deformasyonlar gözlenmiştir (Şekil 14C, Şekil 15B,C).

Fungal hastalık etmenlerin hifleri üzerinde bitki veya mikrobiyal kökenli sekonder metabolitlerin “geri dönüşümsüz hücre membran zararlanmasına” (Irreversible Membran Damage, **IMD**) neden olmak suretiyle bu tür hif deformasyon veya ölümlere neden olduğunu yapılan birçok çalışmayla ortaya konulmuştur. IMD sonucu bitkinin veya hastalık etmeninin hücreleri içerisinde biriken veya sentezlenen antimikrobiyal sekonder bileşikler sonucunda etkilenen hücreler karararak nekrotikleşir, organeller hücre içinde bütünlüğünü ve fonksiyonelliğini kaybeder, hücre içinde vakuolleşmeler, pıhtılaşma, boğumlaşma ve son aşamada hücre içeriğinin dışarıya boşalmasıyla sonuçlanan hücre ölümleri gözlenebilir (Woods ve ark., 1988). Antagonist bakteri türleri (özellikle *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp.) tarafınca sentezlenen mikolotik hücre duvarını yıkan ekstraselüler kitinaz, β -1,3-glukanaz, β -1,4-glukanaz, lipaz, fosfotaz, proteaz gibi antifungal etkinliğe sahip enzimlerin *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Macrophomina phaseoli*, *Sclerotium rolfsii*, *Geotrichum citri-aurantii*, *Fusarium* spp., *Phytophthora* sp., *Rhizoctonia solani* ve *Pythium ultimum* gibi ekonomik öneme sahip fungal etmenlerinin miselleri üzerinde benzer morfolojik değişikliklerden sorumlu olduğu yapılan önceki çalışmalarla da ortaya konulmuştur (Huang ve Chen, 2004; Araujo ve ark., 2005; Soylu ve ark., 2005; Gupta ve ark., 2006; Chung ve ark., 2008; Singh ve ark., 2008; Chaiharn ve ark., 2008; Senthilkumar ve ark., 2009; Xiao ve ark., 2009; Kumar ve ark., 2012; Aktan, 2019; Soylu ve ark., 2021; Soylu ve Kara, 2022; Soylu ve ark., 2022).



Şekil 4.14. Antagonist bakteri izolatlarının engelleme bölgesine yakın noktalardaki *Neoscytalidium dimidiatum* hifleri üzerinde neden oldukları morfolojik deformasyonlar. (A) Kontrol petrilerinde gelişen kalın duvarlı sağlıklı fungus hifleri. (B) *Bacillus pumilus* NKC3en izolatın tarafından neden olunan hiflerde boğumlaşma (ok) ve hif uçlarında kısısalma belirtileri. (C) *B. mojavensis* NKP7en izolatı tarafından neden olunan sitoplazmik pıhtılaşma (ok) ve hiflerden sitoplazmik içeriğin hücre dışına boşalma belirtileri



Şekil 4.15. Antagonist bakteri izolatlarının engelleme bölgesine yakın noktalardaki *Neofusicoccum parvum* hifleri üzerinde neden oldukları morfolojik deformasyonlar. (A) Kontrol petrilerinde gelişen kalın duvarlı sağlıklı fungus hifleri. (B) *Bacillus pumilus* NKC3en izolatın tarafından neden olunan hiflerde boğumlaşma (ok), hif uçlarında kısalma ve sitoplazmik içeriğin pıhtılaşması şeklinde neden olduğu belirtileri. (C) *B. mojavensis* NKP2ep izolatı tarafından neden olunan sitoplazmik pıhtılaşma (ok) ve hiflerden sitoplazmik içeriğin hücre dışına boşalma belirtileri

Çalışmalarda kullanılan fungal etmenlere karşı en yüksek düzeyde antagonistik etkinlik gösteren *Pseudomonas chlororaphis* NKA10ep, *Bacillus pumilus* NKC3en, *Bacillus mojavensis* NKA7en, *Bacillus mycoides* NKB9en, *Pseudomonas aeruginosa* NKC2ep ve *Pseudomonas orientalis* NKF1ep gibi endofit/epifit bakteri izolatların *in vitro* biyoetkinlik/bitki gelişimini teşvik edici mekanizmaları birlikte değerlendirilmiş ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4.9'da özetlenmiştir. Çizelgede sunulduğu gibi, hastalık etmenlerine karşı yüksek düzeyde antagonistik etkinlik gösterdiği tespit edilen izolatların tamamı *in vitro* koşullarda antagonistik/bitki gelişimini teşvik edici mekanizmalardan bir veya birkaçını birlikte kullanmak suretiyle gerek hastalık etmenlerine karşı antagonistik etkinliğe, gerekse bitki gelişiminin teşvik edilmesinde potansiyele sahip oldukları belirlenmiştir.

Çizelge 4.9. Farklı fungal hastalık etmenlerine karşı yüksek düzeyde antagonistik etkinlik gösteren endofit/epifit bakteri izolatların *in vitro* biyoetkinlik/bitki gelişimini teşvik edici mekanizmaları

Fungal etmen/Bakteri izolatı	MGE	Sid	Pro	NH ₃	HCN	IAA	Fosfor	Mik
<i>Neoscytalidium dimidiatum</i>								
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> NKA10ep	80.55	2.52	1.51	++	+++	40,07	0,00	+
<i>Bacillus pumilus</i> NKC3en	70.55	1.18	1.56	+++	-	3,57	1,14	+
<i>Bacillus mojavensis</i> NKA7en	68.33	3.24	1.13	++	-	10,90	0,00	+
<i>Neofusicoccum parvum</i>								
<i>Bacillus mojavensis</i> NKA7en	83.88	3.24	1.13	++	-	10,90	0,00	+
<i>Bacillus mycoides</i> NKB9en	74.45	3.61	1.88	+++	-	5,32	0,00	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NKC2ep	73.33	1.82	1.59	++	++	136,28	2,56	+
<i>Botryosphaeria dothidea</i>								
<i>Bacillus mojavensis</i> NKA7en	83.88	3.24	1.13	++	-	10,90	0,00	+
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> NKA10ep	77.78	2.52	1.51	++	+++	40,07	0,00	+
<i>Pseudomonas orientalis</i> NKF1ep	75.00	1.14	1.18	-	-	9,01	0,00	+

MGE: misel gelişimini engelleme; Sid:siderofor; Pro: proteaz; NH₃:amonyak; HCN: hidrojen siyanür; IAA: indol asetik asit; Mik: mikroskopik düzeyde deformasyon; +: etkinlik şiddeti; -: etkinlik kayıtlı edilmedi

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Sağlıklı bitkilerin dış yüzeyleri ile iç dokuları epifit ve endofit karakterlerde birçok faydalı mikroorganizmalara konukçuluk eder. Bu bölgelerden izole edilen, bitkilerde hastalık oluşturma yetisinde olmayan mikroorganizmalar ekonomik öneme sahip bitkilerde sorun olan fungal ve bakteriyel hastalık etmenlerine karşı biyolojik mücadele çalışmalarında “biyolojik mücadele etmeni” kullanılır.

Bu çalışmada, sağlıklı ceviz, badem, Antep fıstığı ve fındık gibi sert kabuklu meyve ağaçların kök, gövde, dal, ham meyve ve yapraklarından epifit ve endofit bakteri türlerinin izolasyonu, tanısı ve bakteriyel izolatların sert kabuklu meyve ağaçlarda sorun olan kanser ve *Botryosphaeria* geriye doğru ölüm hastalık etmenlerinden *Botryosphaeria dothidea*, *Neofusicoccum parvum* ve *Neoscytalidium dimidiatum*’a karşı *in vitro* koşullarda antagonistik etkinliği ve hastalık etmenlerini engellemede rol oynayan olası etki mekanizmaları karakterize edilmiştir.

Yapılan literatür araştırmasında çalışmamızda da tanılaması yapılmış farklı türlere ait bakteriyel ve fungal biyolojik mücadele etmenlerinin biyolojik mücadele çalışmalarının genelde hasat sonu depo, toprak, yaprak, tohum kökenli bitki fungal ve bakteriyel hastalık etmenlerine karşı araştırılmıştır. Ülkemizde son yıllarda farklı konukçularda hastalık etmeni olduğu bildirilen *Botryosphaeria dothidea*, *Neofusicoccum parvum* ve *Neoscytalidium dimidiatum* gibi hastalık etmenleri üzerine gerek fungal gerekse bakteriyel kökenli biyolojik mücadele etmenlerinin antifungal etkinliği konusunda herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu kapsamdan bakıldığında, çalışma antagonist bakteri türlerinin başta ceviz, badem, Antep fıstığı ve fındık olmak üzere ekonomik öneme sahip sert kabuklu meyve ağaçlarında sorun olan *Botryosphaeria dothidea*, *Neofusicoccum parvum* ve *Neoscytalidium dimidiatum* türlerini içine alan *Botryosphaeria* geriye ölüm hastalık etmenlerine karşı biyolojik mücadele ve biyokontrol etki mekanizmalarının araştırıldığı ilk çalışma niteliğindedir.

Çalışmada farklı bölgelerde yetişen sağlıklı ceviz, badem, Antep fıstığı ve fındık gibi sert kabuklu meyve ağaçlarının farklı sağlıklı bitki kısımlarından yapılan izolasyonlar sonucunda insan ve bitki patojeni olmayan 48 izolat fungal etmenlerin misel gelişimini engellemesi üzerine olan antagonistik etkinliğinin araştırılmıştır. Bu çalışmada önceden yapılmış birçok biyolojik mücadele çalışmalarında elde edilen sonuçlara benzer şekilde en yaygın izolatların 18 adet ile *Bacillus* cinsine bağlı olduğu türler olup, bunu

sırası ile 10 izolatla *Pseudomonas*, 6 izolatla *Enterobacter*, 3 izolatla *Acinetobacter*, 2 izolatla *Staphylococcus* ve 1'er izolatla *Aurebasidium*, *Burkholderia*, *Herbaspirillum*, *Lelliottia*, *Micrococcus*, *Pantoea*, *Rahnella*, *Rhizobium* ve *Stenotrophomonas* cinsleri takip etmiştir.

Neoscytalidium dimidiatum'un misel gelişimini en güçlü engelleyen ilk 3 izolat arasından, en etkilisinin %80.55 engelleme oranı ile *Pseudomonas chlororaphis* NKA10ep izolatı olduğu, bu izolatı sırasıyla %70.55 ile *Bacillus pumilus* NKC3en, %68.33 ile *Bacillus mojavensis* NKA7en izolatları izlemiştir.

Neofusicoccum parvum'un misel gelişimini en güçlü engelleyen ilk 3 izolat arasından, en etkili izolatın ise %83.88 engelleme oranı *Bacillus mojavensis* NKA7en izolatının olduğu, bu izolatı sırasıyla %74.45 engelleme oranı ile *Bacillus mycoides* NKB9en ve %73.33 engelleme oranı ile *Pseudomonas aeruginosa* NKC2ep izolatları izlemiştir.

Botryosphaeria dothidea'ya karşı en yüksek antagonistik etkinlik gösteren 3 izolatın sırasıyla %83.88 engelleme oranı ile *Bacillus mojavensis* NKA7en, %77.78 engelleme oranı ile *Pseudomonas chlororaphis* NKA10ep ve %75.0 engelleme oranı ile *Pseudomonas orientalis* NKF1ep ve *Bacillus pumilus* NKC3en izolatları olduğu belirlenmiştir.

Bakteriler tarafından neden olunan engelleme bölgelerine yerleştirilen sağlık misellerin gelişime göstermemesi, bakteriyel etmenler tarafından üretilen bileşiklerin fungisidal etkinliğe sahip olduğunu göstermiştir. Bazı izolatların engelleme bölgesine yakın yerlerde hastalık etmeni fungusların hiflerinde morfolojik bozulmalara neden olduğu yapılan mikroskopik çalışmalarla ortaya konulmuştur.

Yapılan *in vitro* etkinlik çalışmaları sonuçlarına göre farklı konukçulardan elde edilen izolatlar arasından temsili olarak seçilmiş bakteri izolatları siderofor, proteaz, amonyak, HCN üretimi, fosfor çözme ve IAA, sentezleme bakımından istatistiksel olarak oldukça farklılıklar göstermiştir. Test edilen 43 izolatın, tamamı siderofor, 35 tanesi amonyak, 28 tanesi proteaz, 4 tanesi ise HCN testlerinde pozitif reaksiyon gösterdiği kayıt edilmiştir. Çalışmalarda antagonist bakteri izolatları tarafından üretildiği belirlenen siderofor, proteaz, HCN ve amonyak gibi bileşiklerin fungal hastalık etmenlerin misel gelişimin engellenmesinde (antagonizm) rol oynayan mekanizmaların olduğu düşünülmektedir.

Test edilen 43 izolat arasında tüm izolatların değişen konsantrasyonlarda IAA ürettiği, 17 izolatın ise fosforu çözebilme yeteneğinde olduğu tespit edilmiştir. İzolatlar arasında *Acinetobacter dijkschoorniae* NKA8en, *Pseudomonas korensis* NKF2ep ve *Pantoea agglomerans* NKC9en en fazla fosfor çözen bakteri izolatları olurken, IAA üretme açısından *Pseudomonas aeruginosa* NKC2ep ve *Enterobacter cloacae* NKC8en izolatları en yüksek etkinlik gösteren türler olarak kayıt edilmiştir.

Çalışmada elde edilen tüm sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde aynı türe ait bakteri izolatlar arasında fungus misellerinin engellenmesi arasındaki farklılıklar gözlenmiştir. Bu durumun antagonist bakteri izolatların izole edildikleri bitki örneğinin yetiştiği ortamdaki çevre koşullarının izolatların genetik çeşitliliğine etkide bulunmasından kaynaklandığı düşünölmektedir. Epifitik ve endofitik kökenli bakterilerin toprak kökenli hastalık etmenlere karşı *in vitro* antagonitik etkinlik gösterdiği, hastalık etmenlerin engellemesinde antagonistik, parazitik ve PGPB etki mekanizmalarından bir veya birkaçını birden kullanmak suretiyle etkili olduğu belirlenmiştir.

Sonuç olarak biyokontrol etmeni olarak kullanılan bakteriyel izolatlar entegre mücadele programı kapsamında pestisitlerin çevre üzerindeki olası olumsuzlukların azaltılmasında rol oynayabilirler. Güçlü antagonistik (siderofor, proteaz, amonyak üretimi) ve bitki gelişimini teşvik edici (IAA ve fosfor çözme) etkinlikleri gösteren, özellikle *Bacillus* spp. *Pseudomonas* spp. ve *Enterobacter* spp. ait antagonist ve PGPB izolatların teksel veya karışım halinde geliştirilecek biyopreparatların özellikle toprak kökenli hastalık etmenlerine karşı fungusitlere alternatif olarak değerlendirilebileceği kanaatine varılmıştır.

KAYNAKLAR

- Abdollahzadeh, J., Zare, R., and Phillips, A.J.L., 2013. Phylogeny and taxonomy of *Botryosphaeria* and *Neofusicoccum* species in Iran, with description of *Botryosphaeria scharifii* sp. nov. **Mycologia**, 105: 210-220.
- Ahmed, A.S., Perez-Sanches, C., Egea, C., and Candela, M.E., 1999. Evaluation of *Trichoderma harzianum* for controlling root rot by *Phytophthora capsici* in pepper plants. **Plant Pathology**, 48: 58-65.
- Akgul, D.S., Savas, N.G., and Eskalen, A., 2014. First report of wood canker caused by *Botryosphaeria dothidea*, *Diplodia seriata*, *Neofusicoccum parvum*, and *Lasiodiplodia theobromae* on grapevine in Turkey. **Plant Disease**, 98: 568.
- Akgul, D.S., Savas, N.G., Teker, T., Keykubat, B., Mayorquin, J.S., and Eskalen, A., 2015. Fungal trunk pathogens of Sultana seedless vineyards in Aegean region of Turkey. **Phytopathology Mediterranean**, 54: 380-393.
- Aktan, Z. C., 2018 Badem ağaçlarında kurumaya neden olan bazı fungal hastalık etmenleri ile mücadelede endofit bakterilerin kullanım olanaklarının araştırılması üzerine bir araştırma. **Yüksek Lisans Tezi, Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**. Bitki Koruma Anabilim Dalı.
- Aktan, Z.C., ve Soylu, S., 2020. Diyarbakır ilinde yetişen badem ağaçlarından endofit ve epifit bakteri türlerinin izolasyonu ve bitki gelişimini teşvik eden mekanizmalarının karakterizasyonu. **KSU Tarım ve Doğa Dergisi**, 23: 641-654.
- Andreolli, M., Zapparoli, G., Angelini, E., Lucchetta, G., Lampis, S., and Vallini, G., 2019. *Pseudomonas protegens* MP12: A plant growth-promoting endophytic bacterium with broad-spectrum antifungal activity against grapevine phytopathogens. **Microbiological Research**, 219: 123-131
- Anonim, 2014. Ceviz Hakkında. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi. http://ceviz.ksu.edu.tr/?page_id=31
- Anonim, 2016. Ceviz Hastalık ve Zararlıları ile Mücadele. T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı. Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü. https://www.tarimorman.gov.tr/GKGM/Belgeler/Uretici_Bilgi_Kosesi/Dokumanlar/ceviz.pdf
- Anonim, 2017. Badem Eylem Planı 2013-2017. T.C. Orman Ve Su İşleri Bakanlığı Orman Genel Müdürlüğü. <https://www.ogm.gov.tr/ekutuphane/Yayinlar/Badem%20Eylem%20Plan%C4%B1.pdf>
- Anonymous, 2019. FAOSTAT, Word Production Data. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize> (Erişim Tarihi: 28.12.2020)
- Araujo, F.F., Henning, A.A., and Hungria, M., 2005. Phytohormones and antibiotics produced by *Bacillus subtilis* and their effects on seed pathogenic fungi and on soybean root development. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 21: 1639-1645.
- Armengol, J., Gramaje, D., Pérez-Sierra, A., Landeras, E., Alzugaray, R., Luque, J. and Martos, S., 2008. First report of canker disease caused by *Neofusicoccum australe* on eucalyptus and pistachio in Spain. **Plant Disease**, 92: 980-980.
- Aslan, N., 2019. Dünyada ve Türkiye’de Antep fıstığı. **Antep fıstığı Araştırma Dergisi**, 7:2-3.
- Atay, M., 2019. Kurutmalık biber (*Capsicum annum* L.) meyvelerinde mikotoksin oluşturan bazı fungal etmenlerin gelişimi üzerine bitki uçuculuğu yağ,

- isothiocyanate ve antagonist bakteri izolasyonlarının *in vitro* koşullarda antifungal etmenlerin belirlenmesi. **Yüksek Lisans Tezi, Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü.** Bitki Koruma Anabilim Dalı.
- Ayfer, M., 1990. Antep fıstığının Dünyü Bugünü Geleceği. Türkiye 1. Antep fıstığı Sempozyumu Bildirileri, 11-12 Eylül, GaziAntep, 14-23.
- Bacon, C.W., Hinton, D.M., Mitchell, T.R., Snook, M.E., and Olubajo, B., 2012. Characterization of endophytic strains of *Bacillus mojavensis* and their production of surfactin isomers. **Biological Control**, 62: 1-9.
- Bakhshizadeh, M., Hashemian, H.R., Najafzadeh, M.J., Dolatabadi, S., Zarrinfar, H., 2014. First report of rhinosinusitis caused by *Neoscytalidium dimidiatum* in Iran. **Journal of Medical Microbiology**, 63: 1017–1019.
- Barr, M.E., 1987. Prodrum to Class Loculoascomycetes. Hamilton I. Newell, Inc., Amherst, MA.
- 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/>
- Bester, W., Crous, P.W., and Fourie, P.H., 2007. Evaluation of fungicides as potential grapevine pruning wound protectants against *Botryosphaeria species*. **Australasian Plant Pathology**, 36: 73-77.
- 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.
- Castro, A.P.C., Tavares, P.F.D., Araujo, C.P., da Paz, C.D., and Gava, C. A. T., 2020. Semi-Commercial field evaluation of yeast formulations for control of mango postharvest decay caused by *Botryosphaeriacean* Fungi in Organic Production. **International Journal of Fruit Science**, 20: 207-220.
- Chaiharn, M., Chunhaleuchanon, S., Kozo, A., and Lumyong, S., 2008. Screening of rhizobacteria for their plant growth promoting activities. **KMITL Sci Tech J**, 8: 18-23.
- Chen, S.F., Morgan D.P, Hasey J.K., Anderson K., Michailides T., 2014. Phylogeny, morphology, distribution, and pathogenicity of *Botryosphaeriaceae* and *Diaporthaceae* from English walnut in California. **Plant Disease**, 98: 636–652.
- Chen, WQ., Morgan, DP., Felts, D., and Michailides, TJ., 2003. Antagonism of *Paenibacillus lentimorbus* to *Botryosphaeria dothidea* and biological control of panicle and shoot blight of pistachio. **Plant Disease**, 87: 359-365.
- Chen, SF., Fichtner, E., Morgan, D.P., and Michailides, T.J., 2013. First report of *Lasiodiplodia citricola* and *Neoscytalidium dimidiatum* causing death of graft union of English walnut in California. **Plant Disease**, 97: 993-993.
- Chung, S.H., Kong, H.S., Buyer, J.S., Lakshman, D.K., Lydon, J., Kim, S.D. and Roberts, D.P., 2008. Isolation and partial characterization of *Bacillus subtilis* ME488 for suppression of soil borne pathogens of cucumber and pepper. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 80: 115–123.
- Crous, P.W., Slippers, B., Wingfield, M.J., Rheeder, J., Marasas, W.F.O., Philips, A.J. L., Alves, A., Burgess, T., Barber, P., Groenewald, J.Z., 2006. Phylogenetic lineages in the *Botryosphaeriaceae*. **Studies in Mycology**, 55: 235–253.

- de los Santos-Villalobos, S., Barrera-Galicia, G.C., Miranda-Salcedo, M.A., and Pena-Cabriaes, J.J., 2012. *Burkholderia cepacia* XXVI siderophore with biocontrol capacity against *Colletotrichum gloeosporioides*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, 28: 2615-2623.
- Dervis, S., Turkolmez, S., Ciftci, O., Serce, C.U., and Dikilitas, M., 2019b. First report of *Neoscytalidium dimidiatum* causing canker, shoot blight, and root rot of pistachio in Turkey. **Plant Disease** 103: 1411-1411.
- Dervis, S., Turkolmez, S., Ciftci, O., Serce, CU., and Dikilitas, M., 2019a. First report of *Neoscytalidium dimidiatum* causing black canker and root rot of walnut in Turkey. **Plant Disease**, 103: 2129-2129.
- Dissanayake, A.J., Phillips, A.J. L., Li, X.H., and Hyde, K. D., 2016. *Botryosphaeriaceae*: Current status of genera and species. **Mycosphere**, 7: 1001-1073.
- Ertürk, Y. E., Geçer M.K., Gülsoy E., ve Yalçın S., 2015. “Antep fıstığı Üretimi ve Pazarlaması”. **Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi** Cilt: 5, Sayı: 2, Sayfa: 44.
- Farr, D.F., and Rossman, A.Y., 2020. Fungal databases. Systematic mycology and microbiology laboratory, USDA ARS. Retrieved from <http://nt.ars-grin.gov/fungalatabases/> (Erişim Tarihi: 27.01.2020)
- Fiddaman, P.J., and Rossall, S., 1993. The production of antifungal volatiles by *Bacillus subtilis*. **Journal of Applied Bacteriology**, 74(2):119-26.
- Fravel, D.R., 2005. Commercialization and implementation of biocontrol. **Annual Review of Phytopathology**, 43: 337-359.
- Gezginç, Y. Duman A.D., 2004. Antep fıstığı İşleme Tekniği ve Muhafazasının Kalite Üzerine Etkisi. *Gıda*, 29: 373-378.
- Glass, N.L., and Donaldson, G. C., 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. **Appl. Environ. Microbiol.**, 61: 1323–1330.
- 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.
- Gramaje, D., Agustí-Brisach, C., Pérez-Sierra, A., Moralejo, E., Olmo, D., Mostert, L. I. Z. E. L., and Armengol, J., 2012. Fungal trunk pathogens associated with wood decay of almond trees on Mallorca (Spain). **Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, 28: 1.
- Gupta, C.P., Kumar, B., Dubey, R.C., and Maheshwari, D.K., 2006. Chitinase mediated destructive antagonistic potential of *Pseudomonas aeruginosa* GRC1 against *Sclerotinia sclerotiorum* causing stem rot of peanut. **BioControl**, 51: 821–835.
- Haidar, R., Deschamps, A., Roudet, J., Calvo-Garrido, C., Bruez, E., Rey, P., and Fermaud, M., 2016. Multi-organ screening of efficient bacterial control agents against two major pathogens of grapevine. **Biological Control**, 92: 55-65.
- Hallmann, J., Quadt-Hallmann, A., Mahaffee, W.F., and Kloepper, J.W., 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, 43: 895-914.
- 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.
- Huszcza, E., and Burczyk, B., 2006. Surfactin isoforms from *Bacillus coagulans*. **Zeitschrift für Naturforschung C**, 61: 727-733.

- Inderbitzin, P., Bostock, R.M., Trouillas, F.P., and Michailides, T.J., 2010. A six locus phylogeny reveals high species diversity in *Botryosphaeriaceae* from California almond. **Mycologia**, 102: 1350-1368.
- Jiang, H. X., Wang, X. H., Xiao, C. Z., Wang, W. Y., Zhao, X. , Sui, J. K., Sa, R. B., Guo, T. L., and Liu, X. L., 2015. Antifungal activity of *Brevibacillus laterosporus* JX-5 and characterization of its antifungal components. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, 31: 1065-1618.
- Johnson, S., W.R., Morris and J. Mandeeki., 2002. Managing Sooty canker. University of Nevada Cooperative Extension. **Nevada**, pp.1-8.
- Kara, M., and Soylu, S., 2022. Isolation of endophytic bacterial isolates from healthy banana trees and determination of their *in vitro* antagonistic activities against crown rot disease agent *Fusarium verticillioides*. **Mustafa Kemal Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi**, 27(1): 36-46.
- Kara, M., Soylu, E. M., Soylu, S., Uysal, A., and Kurt, Ş., 2021. First report of *Neofusicoccum parvum* causing branch dieback on *Juglans regia* in Turkey. **Journal of Plant Pathology**, 103: 335.
- Khan, M. S., Gao, J., Zhang, M., Chen, X., Du, Y., Yang, F., and Zhang, X., 2020. Isolation and characterization of plant growth-promoting endophytic bacteria *Bacillus stratosphericus* LW-03 from *Lilium wardii*. **3 Biotech**, 10: 1-15.
- 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.
- Kotze, C., Van Niekerk, J., Mostert, L., Halleen, F., and Fourie, P., 2011. Evaluation of biocontrol agents for grapevine pruning wound protection against trunk pathogen infection. **Phytopathologia Mediterranea**, 50: S247-S26.
- 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, H., Elverdi M., 2014. Sert Kabuklu Meyveler Çalışma Grubu. T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı.
- Kurt, Ş., Soylu, S., Uysal, A., Soylu, E.M., and Kara, M., 2020. Ceviz gövde kanseri hastalığı etmeni *Botryosphaeria dothidea*'nın tanımlanması ve bazı fungusitlerin hastalık etmenine karşı *in vitro* antifungal etkinliklerinin belirlenmesi. **Mustafa Kemal Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi**, 25:46-56.
- Kurt, Ş., Uysal, A., Soylu, E. M., Kara, M., and Soylu, S., 2019. First record of *Neoscytalidium novaehollandiae* associated with pistachio dieback and decline in the Southeastern Anatolia Region of Turkey. **Mycologia Iranica**, 6: 55-57.
- Latorre, B. A., Torres, R., Silva, T., and Elfar, K., 2013. Evaluación de fungicidas y agentes biocontroladores como protectores de heridas contra la cancrrosis del tallo (*Neofusicoccum parvum*) del arándano. **Ciencia e investigación agraria**, 40(3): 547-557.
- Lelliot, R. A., and Stead, D. E., 1987. Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. (T.F. Preece, Editör). **In: Methods in Plant Pathology**, Black well Scientific Publications. Pp, 2: 176-177, Oxford.
- Li, G., Liu, F., Li, J., Liu, Q., and Chen, S., 2016. Characterization of *Botryosphaeria dothidea* and *Lasiodiplodia pseudotheobromae* from English walnut in China. **Journal of Phytopathology**, 164: 348-353.

- Lopez-Moral, A., Lovera, M., Raya, M. D., Cortes-Cosano, N., Arquero, O., Trapero, A., and Agusti-Brisach, C., 2020. Etiology of branch dieback and shoot blight of English walnut caused by *Botryosphaeriaceae* and *Diaporthe* species in southern Spain. **Plant Disease**, 104: 533-550.
- Luo, Y., Lichtemberg, P. S. F., Niederholzer, F. J. .A., Lightle, D. M., Felts, D. G., and Michailides, T. J., 2019. Understanding the process of latent infection of canker-causing pathogens in stone fruit and nut crops in California. **Plant Disease**, 103: 2374-2384.
- Luo, Y., Gu, S., Felts, D., Puckett, R. D., Morgan, D. P., and Michailides, T. J., 2017. Development of qPCR systems to quantify shoot infections by canker-causing pathogens in stone fruits and nut crops. **Journal of Applied Microbiology**, 122: 416-428.
- Luque, J., Elena, G., Garcia-Figueres, F., Reyes, J., Barrios, G., and Legorburu, F. J., 2014. Natural infections of pruning wounds by fungal trunk pathogens in mature grapevines in Catalonia (Northeast Spain). **Australian Journal of Grape and Wine Research**, 20: 134-143.
- Ma, Z. and Michailides, T. J., 2002. Characterization of *Botryosphaeria dothidea* isolates collected from pistachio and other plant hosts in California. **Phytopathology**, 92: 519-526.
- Marquez-Santacruz, H. A., Hernandez-Leon, R., Orozco-Mosqueda, M. C., Velazquez Sepulveda, 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.
- McDonald, V., and Eskalen, A., 2011. *Botryosphaeriaceae* species associated with avocado branch cankers in California. **Plant Disease**, 95: 1465-1473.
- McDonald, V., Lynch, S., and Eskalen, A., 2009. First report of *Neofusicoccum australe*, *N. luteum* and *Neofusicoccum parvum* associated with avocado branch canker in California. **Plant Disease**, 93: 967.
- Michailides, T. J., 1991. Pathogenicity, distribution, sources of inoculum and infection courts of *Botryosphaeria dothidea* on pistachio. **Phytopathology**, 81: 566-573.
- Mohammadi, H., Firoozjah, M. J., 2019. Branch canker of hazelnut trees caused by *Botryosphaeria dothidea* in Iran. **Plant Protection Scientific Journal of Agriculture**, 42: 1-15.
- Moral, J., Muñoz-Díez, C., González, N., Trapero, A., and Michailides, T. J., 2010. Characterization and pathogenicity of *Botryosphaeriaceae* species collected from olive and other hosts in Spain and California. **Phytopathology** 100: 1340-1351.
- Moral, J., Ahimera, N., Felts, D. G., Morgan, D. P., and Michailides, T. J., 2017. Effects of wound size, amount of sap, and number of blighted nuts on infection of pistachio organs by *Neofusicoccum mediterraneum*. **Plant Disease**, 101: 2027-2033.
- Nouri, M. T., Lawrence, D. P., Holland, L. A., Doll, D. A., Kallsen, C. E., Culumber, C. M. and Trouillas, F. P., 2019. Identification and pathogenicity of fungal species associated with canker diseases of pistachio in California. **Plant Disease**, 103: 2397-2411.
- Nouri, M. T., Lawrence, D. P., Yaghmour, M. A., Michailides, T. J., and Trouillas, F. P., 2018. *Neoscytalidium dimidiatum* causing canker, shoot blight and fruit rot of almond in California. **Plant Disease**, 102: 1638-1647.

- Oksal, E., Yigit, T., and Özer, G., 2020. First report of *Neoscytalidium dimidiatum* causing shoot blight, dieback and canker of apricot in Turkey. **Journal of Plant Pathology**, 102: 579-580
- Olmo, D., Armengol, J., León, M., and Gramaje, D., 2016. Characterization and pathogenicity of *Botryosphaeriaceae* species isolated from almond trees on the island of Mallorca (Spain). **Plant Disease**, 100: 2483-2491.
- Özbek, S., 1978. **Özel Meyvecilik. Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları**, Adana, Yayın No:128, 486 s.
- 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.
- 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.
- Phillips, A. J., Slippers, B., Groenewald, J. Z., & Crous, P. W. (Eds.), 2013. Plant pathogenic and endophytic Botryosphaeriales known from culture. **CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre**.
- Qiu, Y., Savocchia, S., Steel, C. C. and Ash, G. J., 2008. *Botryosphaeria dothidea* associated with grapevine trunk disease in South-Eastern Australia. **Australas. Plant Pathology**, 37: 482–485.
- Ramdial, H., De Abreu, K., and Rampersad, S. N., 2017. Fungicide sensitivity among isolates of *Colletotrichum truncatum* and *Fusarium incarnatum-equiseti* species complex infecting bell pepper in Trinidad. **Plant Pathology**, 33: 118-124.
- Rani, M. U., and Reddy, G., 2011. *Bacillus cereus* and Enterobacter cancerogenus screened for their efficient plant growth promoting traits rhizobacteria (PGPR) and antagonistic traits among sixteen bacterial isolates from rhizospheric soils of pigeon pea. **African Journal of Microbiology Research**, 5: 2090-2094.
- 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.
- Rovera, M., Pastor, N., Niederhauser, M., and Rosas, S. B., 2014. Evaluation of *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* SR1 for growth promotion of soybean and for control of *Macrophomina phaseolina*. **Biocontrol Science and Technology**, 24: 1012-1025.
- Sakalidis, M. L., Slippers, B., Wingfield, B. D., Hardy, G. S. J., and Burgess, T. I., 2013. The challenge of understanding the origin, pathways and extent of fungal invasions: global populations of the *Neofusicoccum parvum*–*N. ribis* species complex. **Diversity and Distributions**, 19: 873-883.
- Santoyo, G., Moreno-Hagelsieb, G., Orozco-Mosqueda, M.C., Glick, B.R., 2016. Plant growth-promoting bacterial endophytes. **Microbiological Research**, 183: 92-99.

- Satıl, F., 1995. Balıkesir’de Menengiç Ağaçlarına Aşıl原因arak Elde Edilen Antep fıstığı Ağaçlarının GaziAntep’te Yetiştirilen Doğal Antep fıstıkları ile Biyoekolojik ve Diğer Yönlerden Karşılaştırılması. **Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi**, Balıkesir.
- Schwyn, B., and Neilands, J. B., 1987. Universal chemical assay for detection and determination of siderophores. **Analytical Biochemistry**, 160: 47-56.
- Senthilkumar, M., Swarnlakshmi, K., Govindasamy, V., Lee, Y. K., and Annapurna, K., 2009. Biocontrol potential of soybean bacterial endophytes against charcoal rot fungus *Rhizoctonia bataticola*. **Current Microbiology**, 58: 288-293.
- 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.
- Singh, N., Pandey, P., Dubey, R.C., and Maheshwari, D.K., 2008. Biological control of root rot fungus *Macrophomina phaseolina* and growth enhancement of *Pinus roxburghii* (Sarg.) by rhizosphere competent *Bacillus subtilis* BN1. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 24: 1669-1679.
- Slippers, B., & Wingfield, M. J., 2007. Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. **Fungal biology reviews**, 21(2-3), 90-106.
- Slippers, B., Crous, P. W., Denman, S., Coutinho, T. A., Wingfield, B. D., Wingfield, M. J., 2004. Combined multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several species previously identified as *Botryosphaeria dothidea*. **Mycologia**, 96: 83-101.
- Sobutay, T., 2006. Fındık Sektör Araştırması. İstanbul Ticaret Odası Dış Ticaret Şubesi Uygulama Servisi, 18.
- Sohrabi, M., Mohammadi, H., Leon, M., Armengol, J., and Banihashemi, Z., 2020. Fungal pathogens associated with branch and trunk cankers of nut crops in Iran. **European Journal of Plant Pathology**, 157: 327-351.
- 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.
- Sonker, N., Pandey, A. K., Singh, P., and Tripathi, N. N., 2014. Assessment of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf essential oil as herbal preservatives based on antifungal, antiaflatoxin, and antiochratoxin activities and *in vivo* efficacy during storage. **Journal of Food Science**, 79: Nr.
- Soylu, S., Kara, M., Soylu, E. M., Uysal, A., ve Kurt, Ş., 2022. *Geotrichum citri-aurantii*’nin sebep olduğu turuncgil ekşi çürüklük hastalığının biyolojik mücadelesinde endofit bakterilerin biyokontrol potansiyellerinin belirlenmesi. **Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi**, 19: 177-191.
- Soylu, S., Kara, M., Uysal, A., Kurt, Ş., and Soylu, E. M., 2021. Determination of antagonistic potential of endophytic bacteria isolated from lettuce against lettuce white mould disease caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. **Zemdirbyste-Agriculture**, 108: 303-312.

- Soylu, S., Soylu, E. M., Kurt, Ş., and Ekici, Ö. K., 2005. Antagonistic potentials of rhizosphere-associated bacterial isolates against soil-borne diseases of tomato and pepper caused by *Sclerotinia sclerotiorum* and *Rhizoctonia solani*. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, 8: 43-48.
- Stein, T., 2005. *Bacillus subtilis* antibiotics, structures, syntheses and specific functions. **Molecular Microbiology**, 56: 845-857.
- 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, Y., Cheng, Z., Glick, B.R., 2009. The presence of a 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase deletion mutation alters the physiology of the endophytic plant growth-promoting bacterium *Burkholderia phytofirmans* PsJN. **FEMS Microbiology Letters**, 296: 131–136.
- Trotel-Aziz, P., Abou-Mansour, E., Courteaux, B., Rabenoelina, F., Clement, C., Fontaine, F., and Aziz, A., 2019. *Bacillus subtilis* PTA-271 Counteracts *Botryosphaeria Dieback* in Grapevine, Triggering Immune Responses and Detoxification of Fungal Phytotoxins. **Frontiers In Plant Science**, 10:25.
- Tsuge, K., Ano, T., Hirai, M., Nakamura, Y., and Shoda, M., 1999. The genes degQ, pps, and lpa-8 (sfp) are responsible for conversion of *Bacillus subtilis* 168 to plipastatin production. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 43: 2183-2192.
- Turkolmez, S., Dervis, S., Ciftci, O., and Serce, C. U., 2016. First report of canker and dieback caused by *Botryosphaeria dothidea* on apple in Turkey. **Plant Disease**, 100: 1237-1238.
- Turkolmez, S., Dervis, S., Ciftci, O., Serce, C. U., and Dikilitas, M., 2019b. New disease caused by *Neoscytalidium dimidiatum* devastates tomatoes (*Solanum lycopersicum*) in Turkey. **Crop Protection**, 118: 21-30.
- Turkolmez, S., Dervis, S., Ciftci, O., Serce, C. U., Turkolmez, C. G., and Dikilitas, M., 2019a. First report of *Neoscytalidium dimidiatum* causing dieback, shoot blight, and branch canker of willow trees in Turkey. **Plant Disease**, 103: 2139-2139.
- Ullah, A., Mushtaq, H., Fahad, S., Shah, A., and Chaudhary, H. J., 2017. Plant growth promoting potential of bacterial endophytes in novel association with *Olea ferruginea* and *Withania coagulans*. **Microbiology**, 86: 119-127.
- Úrbez-Torres, J. R., Peduto, F., Vossen, P. M., Krueger, W. H., Gubler, W. D., 2013. Olive twig and branch dieback: etiology, incidence, and distribution in California. **Plant Disease**, 97: 231-244.
- 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.
- Von Arx, J.A., 1987. **Plant Pathogenic Fungi**. J. Cramer, Berlin.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds) In: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, San Diego, pp. 315-322.
- Whitehouse, W.E. and Stone, L.C., 1941. Some aspects of dichogamy and pollination in pistache. **Proceedings of the American Society for Horticultural Science**, 39:95-100.

- Woods, A. M., Didehvar F., Gay J. L., and Mansfield J. W., 1988. Modification of the host plasmalemma in haustorial infections of *Lactuca sativa* by *Bremia lactucae*. **Physiol Mol Plant Pathol.**, 33: 299–310.
- Wunderlich, N., Costa, S. S., Tpoi, R. P., and Ash, G. J., 2012. First report of *Botryosphaeria dothidea* causing shoot blight and cankers of pistachio in Australia. **Australasian Plant Disease Notes**, 7: 47-49.
- Xiao, L., Xie, C.C., Cai, J., Lin, Z.J., and Cheun, Y.H., 2009. Identification and characterization of a chitinase producing *Bacillus* showing significant antifungal activity. **Current Microbiology**, 58: 528.
- Xu, S., Yao, J., Wu, F., Mei, L., and Wang, Y., 2018. Evaluation of *Paenibacillus polymyxa* carboxymethylcellulose/poly (vinyl alcohol) formulation for control of *Carya cathayensis* canker caused by *Botryosphaeria dothidea*. **Forest Pathology**, 48: e12464.
- Yin, X. T., Xu, L. N., Xu, L., Fan, S. S., Liu, Z. Y., and Zhang, X. Y., 2011. Evaluation of the efficacy of endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* against *Botryosphaeria dothidea* and other phytopathogenic microorganisms. **African Journal of Microbiology Research**, 5:340-345.
- Zhang, L., Khabbaz, S. E., Wang, A., Li, H., Abbasi, P. A., 2015. Detection and characterization of broad-spectrum antipathogen activity of novel rhizobacterial isolates and suppression of Fusarium crown and root rot disease of tomato. **Journal of Applied Microbiology**, 118: 685-703.
- Zhao, Z., Wang, Q., Wang, K., Brian, K., Liu, C., and Gu, Y., 2010. Study of the antifungal activity of *Bacillus vallismortis* ZZ185 in vitro and identification of its antifungal components. **Bioresource Technology**, 101: 292–297.
- Zlatković, M., Wingfield, M. J., Jami, F., and Slippers, B., 2019. Genetic uniformity characterizes the invasive spread of *Neofusicoccum parvum* and *Diplodia sapinea* in the Western Balkans. **Forest Pathology**, 49: e12491.

EKLER

EK-1. 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