

T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

**ENDOFİT BAKTERİ UYGULAMALARININ BİYOTİK VE ABİYOTİK
STRES ALTINDAKİ HİYARLARDA BAZI MORFOLOJİK VE
FİZYOLOJİK ÖZELLİKLER İLE GEN İFADELERİNE ETKİLERİ**

DOKTORA TEZİ

Ceylan Pınar UÇAR
Danışman: Doç. Dr. Ahmet AKKÖPRÜ
İkinci Danışman: Doç. Dr. Yasemin BEKTAŞ

VAN – 2023

T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

**ENDOFİT BAKTERİ UYGULAMALARININ BİYOTİK VE ABİYOTİK
STRES ALTINDAKİ HİYARLARDA BAZI MORFOLOJİK VE
FİZYOLOJİK ÖZELLİKLER İLE GEN İFADELERİNE ETKİLERİ**

DOKTORA TEZİ

Ceylan Pınar UÇAR

Bu çalışma Van YYÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından
FDK-2020-9240 No'lu proje ile desteklenmiştir.

VAN – 2023

KABUL VE ONAY SAYFASI

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Fitapatoloji Anabilim Dalı'nda Doç Dr. Ahmet Akköprü danışmanlığında, Ceylan Pınar Uçar tarafından sunulan “Endofit Bakteri Uygulamalarının Biyotik Ve Abiyotik Stres Altındaki Hıyarlarda Bazı Morfolojik ve Fizyolojik Özellikler ile Gen İfadelerine Etkileri” başlıklı bu çalışma Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili hükümleri gereğince 15/12/2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile başarılı bulunmuş ve doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Hatice ÖZAKTAN

İmza:

Üye: Prof. Dr. Kubilay Kurtuluş BAŞTAŞ

İmza:

Üye: Doç. Dr. Ahmet AKKÖPRÜ

İmza:

Üye: Doç. Dr. Çeknas ERDİNÇ

İmza:

Üye: Doç. Dr. Mustafa USTA

İmza:

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun / / tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

İmza

.....

Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Ceylan Pınar Uçar



ÖZET

ENDOFİT BAKTERİ UYGULAMALARININ BİYOTİK VE ABİYOTİK STRES ALTINDAKİ HİYARLARDA BAZI MORFOLOJİK VE FİZYOLOJİK ÖZELLİKLER İLE GEN İFADELERİNE ETKİLERİ

UÇAR, Ceylan Pınar
Doktora Tezi, Bitki Koruma Anabilim Dalı
Danışman: Doç. Dr. Ahmet AKKÖPRÜ
İkinci Danışman: Doç. Dr. Yasemin BEKTAŞ
Aralık 2023, 112 sayfa

Bitki hastalıkları ile biyolojik savaşta genellikle biyolojik kontrol ajanının (BKA) etkinliği tek stres altındaki bitkilerde değerlendirildiği için doğada birden fazla strese maruz kalan bitkinin ve BKA'nın performansı tam olarak yansıtılamamaktadır. Bu çalışma, *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* (*PsI*)'nin neden olduğu Hıyar Köşeli Yaprak Lekeli (HKYL) Hastalığı ve polietilen glikol (PEG) ile oluşturulan kuraklık stresine ardışık olarak maruz kalmış hıyarlarda endofit bakterilerin (EB) ve stres faktörlerinin birbirleri üzerine etkisi araştırılmıştır. Her iki strese karşı ayrı ayrı başarılı olduğu tespit edilmiş EB *Acinetobacter calcoaceticus* V33K2 izolatı hıyarlara uygulanmış ve hidroponik ortamda ardışık olarak biyotik (*PsI*) ve abiyotik (kuraklık) strese maruz bırakılmıştır. Kuraklık stresinin önce uygulandığı gruplarda HKYL hastalık şiddeti %131, kuraklık şiddeti ise %50 oranında artmış, *PsI* önce uygulanmış gruplarda pozitif kontrole göre değişim gözlenmemiştir. Seçilen EB V33K2 izolatı HKYL hastalığını (%46) ve kuraklık stresinin (%11) etkilerini azaltmıştır. EB V33K2 iki strese maruz kalan bitkilerde ise sırasıyla kuraklık ve HKYL hastalık şiddetini; kuraklık stresi önceliğinde %22 ve 36, biyotik strese önceliğinde ise %11 ve 20 oranında azaltmıştır. EB V33K2 uygulamaları toplam klorofil, klorofil-*a* ve karotenoid içeriğinde önemli artışlar sağlamıştır. MDA içeriği EB uygulamasında en düşük düzeyde kalmıştır. Uygulama grupları arasında en yüksek prolin birikimi EB+PEG+*PsI* grubunda gözlenmiştir. PR-1 geninde ikili stres altında ve LOX-1 geninde ise tüm stres faktörleri altında 96. saatte EB uygulanan gruplarda uygulanmayan gruplara göre gen ifadesi yukarı yönlü ifadesinin daha fazla olduğu gözlenmiştir. SnRK-2.5 geninde ise ikili stres uygulamalarında 72. ve 96. saatte EB uygulanan grupların uygulanmayan gruplara göre yukarı yönlü indüklenmeyi arttırdığı gözlenmiştir. EB V33K2 uygulaması ikili stres koşullarında hıyar bitkilerinin sağlığı ve gelişimine önemli katkı sağlamıştır. Ancak bu konunun tam olarak anlaşılması için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Anahtar kelimeler: Endofit bakteriler, Hıyar, İkili stres, Kuraklık, *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*

ABSTRACT

EFFECTS OF ENDOPHYTE BACTERIA APPLICATIONS ON SOME MORPHOLOGICAL AND PHYSIOLOGICAL CHARACTERISTICS AND GENE EXPRESSIONS IN CUCUMBERS UNDER BIOTIC AND ABIOTIC STRESS

UÇAR, Ceylan Pınar

Ph.D. Thesis, Department of Plant Protection

Supervisor: Doç Dr. Ahmet AKKÖPRÜ

Second Supervisor: Doç. Dr. Yasemin BEKTAŞ

December 2023, 112 pages

Since the effectiveness of biological control agents (BCA) in biological control of plant diseases is generally evaluated on plants under a single stress, it cannot fully reflect the performance of plants and BCA that are exposed to more than one stress in nature. This study examined *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* (*Psl*) and the effects of endophyte bacteria (EB) and stress factors on each other were investigated in cucumbers consecutively exposed to drought stress caused by polyethylene glycol (PEG). EB *Acinetobacter calcoaceticus* V33K2 isolate, which was found to be successful against both stresses separately, was applied to cucumbers and exposed to biotic (*Psl*) and abiotic (drought) stress sequentially in the hydroponic environment. In the groups where drought stress was applied first, HKYL disease severity increased by 131% and drought severity increased by 50%, and no change was observed compared to the positive control in the groups where *Psl* was applied before. The selected EB V33K2 isolate reduced HKYL disease (46%) and the effects of drought stress (11%). EB V33K2 increases disease severity in plants exposed to two stresses: drought and HKYL, respectively; It decreased by 22 and 36% before drought stress and by 11 and 20% before biotic stress. EB V33K2 applications provided significant increases in total chlorophyll, chlorophyll “a” and carotenoid content. MDA content is at the lowest level in EB application. Among the application groups, the highest proline accumulation was observed in the EB + PEG + *Psl* group. Among the application groups, the highest proline accumulation was observed in the EB + PEG + *Psl* group. It was observed that the gene expression was higher in the PR-1 gene under double stress and in the LOX-1 gene under all stress factors in the EB applied groups at the 96th hour compared to the non-treated groups. In the SnRK-2.5 gene, it was observed that in double stress applications, EB applied groups at 72 and 96 hours increased the upstream induction compared to the non-applied groups. EB V33K2 application made a significant contribution to the health and development of cucumber plants under dual stress conditions. However, more studies are needed to fully understand this issue.

Keywords: Endophyte bacteria, Cucumber, Double stress, Drought, *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*



TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasında, her türlü ilgi ve yardımlarını esirgemeyen danışmanım Sayın Doç. Dr. Ahmet AKKÖPRÜ'ye teşekkür ederim. Maddi manevi yardımlarını esirgemeyen aileme, dostlarım Hazel Sağlam ÖZDAMAR ve Osman Seyit ÖZDAMAR'a teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca tezimde yardımlarını esirgemeyen ikinci danışmanım merhum Doç. Dr. Yasemin BEKTAŞ hocama teşekkür eder Allah'tan rahmet dilerim.

2023

Ceylan Pınar UÇAR



İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER.....	vii
ÇİZELGELER LİSTESİ	xii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xv
SİMGELER VE KISALTMALAR	xix
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK BİLDİRİŞLERİ	7
2.1 Hastalık etmeni ile ilgili çalışmalar.....	7
2.2 Kuraklık Stresi ile İlgili Çalışmalar.....	9
2.3 Bitki Gelişimini Düzenleyici Bakteriler ile Kuraklık Stresi ve Hastalıklarla Mücadeleye Yönelik Çalışmalar	12
2.4 Biyotik ve Abiyotik Streslerin Kombine Olduğu Çalışmalar	15
2.5 Biyotik ve abiyotik stress altındaki bitkilerde Gen ifadeleri.....	16
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	23
3.1 Materyal.....	23
3.1.1 Test Bitkisi	23
3.1.2 Test Patojeni-Kuraklık Stresi	23
3.1.3 Endofit Bakteriler (EB).....	23
3.1.4 Bakteriler için Kullanılan Besi Yerleri	24
3.1.5 Bitki Yetiştirme Ortamları	25
3.2 Yöntem	28
3.2.1 Uygun Kuraklık Stres Düzeyinin Belirlenmesi	29
3.2.2 EB Seçimi	30
3.2.2.1 <i>PsI</i> 'ye Karşı Etkili EB İzolatlarının Seçimi.....	30
3.2.3 Belirlenmiş Olan PEG Kuraklık Seviyesinde Seçilen EB İzolatlarının Sınanması	36
3.2.4 Seçilen EB İzolatının Kuraklık ve Hastalık Stresine Karşı Etkinliğinin Belirlenmesi	39

3.2.4.1 <i>PsI</i> 'nin Hıyar Yapraklarındaki Popülasyonunun İzlenmesi	41
3.2.4.2 Fotosentetik Pigment İçeriğinin Belirlenmesi	41
3.2.4.3 Katalaz (CAT) Aktivitesi.....	42
3.2.4.4 Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi	42
3.2.4.5 Lipid Peroksidasyonunun Malondialdehit (MDA) İçeriği ile Belirlenmesi.....	43
3.2.4.6 Prolin Analizi.....	43
3.2.4.7 Gen İfadelerinin Belirlenmesi.....	45
3.2.4.7.1 Toplam RNA izolasyonu, cDNA Sentezi ve Kullanılan Primerler	45
3.2.4.8 EB İzolatının Moleküler Tanılaması	50
3.2.4.9 İstatistiksel Değerlendirmeler	51
4. BULGULAR.....	53
4.1 Hidroponik Ortamda Kuraklık Seviyesinin Belirlenmesi	53
4.2 <i>PsI</i> 'nin Oluşturduğu HKYL Hastalığına Karşı EB Seçimi	56
4.2.1 Viyollerde Yetiştirilen Hıyar Fidelerinde <i>PsI</i> 'ye Karşı Etkili EB Seçimi.....	56
4.2.2 Saksı Çalışmaları ile <i>PsI</i> 'ye Karşı Etkili EB Seçimi.....	59
4.2.3 Hıyar Bitkileri Üzerinde Seçilen Endofit Bakterinin <i>PsI</i> 'ye Karşı Taranması.....	61
4.3 Endofit Bakterilerin Kuraklık Stresine Karşı Etkinliklerinin Belirlenmesi	63
4.4 Patojen ve Kuraklık Stresine Maruz Kalan Hıyar Bitkilerine EB'nin Etkilerinin Değerlendirilmesi	66
4.4.1 Bitki Gelişim Parametrelerine Etkisi	67
4.4.2 Patojen ve Kuraklık Stresine Maruz Kalan Hıyar Bitkilerinde EB Uygulamasının Hastalık Şiddetine Etkisi	68
4.4.3 Patojen ve Kuraklık Stresine Maruz Kalan Hıyar Bitkilerinde EB Uygulamasının Kuraklık Belirtilerine Olan Etkisi.....	70
4.4.4 EB ve PEG uygulamasının <i>PsI</i> Popülasyonu Üzerine Etkisi.....	71
4.4.5 Patojen ve Kuraklık Stresine Maruz Kalan Hıyar Bitkilerinde EB'in Klorofil <i>a</i> , <i>b</i> Toplam Klorofil ve Karotenoid İçeriklerine Etkileri	74

4.4.6	EB ve İkili Stress Altındaki Hıyar Bitkilerinde MDA, SOD VE CAT Enzim Düzeyleri	74
4.4.7	EB Uygulaması ve İkili Stress Altındaki Hıyar Bitkilerinde Prolin Düzeyi	75
4.4.8	Patojen ve Kuraklık Stresine Maruz Kalan ve EB Uygulanan Hıyar Bitkilerinde PR-1, LOX-1, SNRK-2, ACS-3 Genlerinin İfade Düzeyleri	75
4.4.9	EB İzolat V33K2'nin Moleküler Tanılaması	81
5.	TARTIŞMA VE SONUÇ	83
	KAYNAKLAR	97
	ÖZ GEÇMİŞ	111

ÇİZELGELER LİSTESİ

Çizelge 3.1	Çalışmada etkisi araştırılan EB izolatları.....	24
Çizelge 3.2	Hidroponik ortam için kullanılan makro ve mikro elementler	26
Çizelge 3.3	Kuraklık stresi altında bitkilerde oluşan belirtileri değerlendirmek için kullanılan 0-5 kuraklık skalası	30
Çizelge 3.4	EB'ler için <i>PsI</i> uygulaması	31
Çizelge 3.5	<i>PsI</i> Hastalık şiddeti skalası.....	35
Çizelge 3.6	Biyotik strese karşı başarılı bulunan EB'lerin kuraklık stresine karşı etkinliğinin belirlenmesine yönelik yürütülen çalışmalarda uygulama grupları.	37
Çizelge 3.7	EB'lerin ikili strese maruz kalan hıyar bitkilerde fizyolojik ve morfolojik yansımaları ile <i>PsI</i> popülasyonuna etkisinin belirlendiği çalışmadaki uygulama grupları.	40
Çizelge 3.8	Real Time qPCR ile hedef genlerdeki ifade düzeylerinin belirlenmesi için kullanılan Primer çiftleri	45
Çizelge 3.9	Bitki örneklerinden elde edilen toplam RNA'dan cDNA kütüphanesi oluşturmak için hazırlanan master mix bileşenleri	48
Çizelge 3.10	cDNA eldesi için PCR reaksiyon koşulları.....	48
Çizelge 3.11	cDNA sentezinin doğrulanması için yapılan PCR reaksiyon bileşenleri.....	48
Çizelge 3.12	cDNA sentezinin doğrulanması için yapılan PCR reaksiyon koşulları.....	49
Çizelge 3.13	Real Time qPCR reaksiyon bileşenleri.....	49
Çizelge 3.14	Real Time qPCR reaksiyonu termal cycler koşulları.....	50
Çizelge 3.15	EB'nin tanımlanmasında kullanılan primerler.....	50
Çizelge 3.16	EB 16s rRNA bölgesi dizi analizi için kullanılan 27F/1492R primer çifti için master mix	51
Çizelge 3.17	EB 16s rRNA bölgesi dizi analizi için kullanılan 27F/1492R primer çifti için termal cycle koşulları	51
Çizelge 4.1	PEG %3, 5, 7 kuraklık dozlarında hıyar bitkilerindeki 0-5 skalasına göre kuraklık şiddeti	53

Çizelge 4.2	PEG %3, %5, %7 kuraklık dozu uygulanmalarının hıyar bitkilerindeki gelişim parametreleri üzerine etkisi	54
Çizelge 4.3	PEG %3, %4, %5 kuraklık dozu uygulamalarının hıyar bitkilerinde haftalık kuraklık şiddeti üzerine etkisi ve kuraklık gelişim değerleri (AUDPC)	55
Çizelge 4.4	PEG %3, %4, %5 kuraklık dozu uygulanmalarının hıyar bitkilerinde bitki gelişim parametreleri üzerine etkileri	56
Çizelge 4.5	Viyol denemeleri ile <i>Psl</i> 'ye karşı etkinlikleri sınanan 23 EB izolatının hastalık şiddeti üzerine etkileri	56
Çizelge 4.6	I.Viyol denemesinde fidelere EB ve <i>Psl</i> uygulamalarının yeşil aksam yaş- kuru ağırlığa etkisi.....	57
Çizelge 4.7.	II. Viyol denemesinde fidelere EB ve <i>Psl</i> uygulamalarının yeşil aksam yaş-kuru ağırlığına etkisi	58
Çizelge 4.8	Saksı denemeleri ile <i>Psl</i> 'ye karşı başarılı endofit bakteri seçim çalışmalarındaki hastalık gelişim değerleri (AUDPC).	60
Çizelge 4.9	Hıyar bitkileri üzerine uygulanan 8 endofit bakteri ve <i>Psl</i> 'nin bitki gelişim parametreleri üzerine etkisi	60
Çizelge 4.10	Hıyar bitkileri üzerine uygulanan 8 endofit bakteri ve <i>Psl</i> 'nin klorofil ve gövde uzunluğuna etkisi.....	61
Çizelge 4.11	Hıyar bitkisi üzerinde 5 EB'nin <i>Psl</i> etmenine karşı hastalık şiddeti üzerine istatistiksel hesaplamaları.....	62
Çizelge 4.12	Hıyar bitkisi üzerinde 5 EB'nin <i>Psl</i> etmenine karşı etkinliğinin belirlenerek bitki biyoması üzerinde istatistiksel hesaplamaları	62
Çizelge 4.13	Hıyar bitkisi üzerinde 5 EB'nin <i>Psl</i> etmenine karşı etkinliğinin belirlenerek klorofil ve gövde boyu üzerine istatistiksel hesaplamaları	63
Çizelge 4.14	EB uygulanmış hıyar bitkilerinde %3 PEG ile sağlanan kuraklık stresinin 1., 2., ve 3. haftalarda neden olduğu 0-5 skalasına göre belirti düzeyi ve AUDPC değerleri.....	64
Çizelge 4.15	EB uygulanmış hıyar bitkilerinde %3 PEG ile sağlanan kuraklık stresinin bitki gelişim parametreleri üzerine etkileri	65

Çizelge 4.16	Kuraklık stresi altında EB uygulamalarının hıyar bitkilerinde klorofil, yaprak alanı ve YOSİ üzerine etkisi	65
Çizelge 4.17	Patojen ve kuraklık stresine maruz kalan hıyar bitkilerine EB uygulamasının bitki gelişim parametrelerine etkisi	67
Çizelge 4.18	Patojen ve kuraklık stresine maruz kalan hıyar bitkilerine EB uygulamasının yaprak alanına etkisi.....	68
Çizelge 4.19	Patojen ve kuraklık stresine maruz kalan hıyar bitkilerine EB uygulamasının hastalık şiddetine etkisi ve AUDPC değerleri.....	68
Çizelge 4.20	Patojen ve kuraklık stresine maruz kalan hıyar bitkilerine EB uygulamasının AUDPC sonuçlarında <i>PsI</i> 'ye göre ve EB uygulanmamış gruplara göre % etki hesaplamaları.....	69
Çizelge 4.21	Patojen ve kuraklık stresine maruz kalan hıyar bitkilerine EB uygulamasının kuraklık şiddetine etkisi ve AUDPC sonuçları.....	70
Çizelge 4.22	Patojen ve kuraklık stresine maruz kalan hıyar bitkilerine EB uygulamasının AUDPC sonuçlarının PEG'e ve EB uygulanmamış gruplara göre % etki hesaplamaları.....	71
Çizelge 4.23	EB ve PEG uygulaması yapılan gruplarda <i>PsI</i> 'nin zaman noktalarını göre popülasyon düzeyler	72
Çizelge 4.24	EB ve PEG uygulaması yapılan uygulamalarda <i>PsI</i> 'nin zaman noktalarından alınan örneklerin gruplara göre takibi.....	73
Çizelge 4.25	Patojen ve kuraklık stresine maruz kalan hıyar bitkilerine EB uygulamasının klorofil <i>a</i> , klorofil <i>b</i> , toplam klorofil ve karotenoid üzerine etkisi	74
Çizelge 4.27	Patojen ve kuraklık stresine maruz kalan hıyar bitkilerine EB uygulamasının MDA, SOD ve CAT üzerine etkisi	75
Çizelge 4.26	Patojen ve kuraklık stresine maruz kalan hıyar bitkilerine EB uygulamasının gruplar üzerinde prolin içeriği.....	75
Çizelge 4.28	PR-1 geninin $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ 'ye göre hesaplanması	77
Çizelge 4.29	LOX-1 geninin $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ 'ye göre hesaplanması.....	78
Çizelge 4.30	SNRK-2 geninin $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ 'ye göre hesaplanması	79
Çizelge 4.31	ACS-3 geninin $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ 'ye göre hesaplanması	80



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1	Dünyada 2020 yılında hıyar üretimi yapan bölgeler ve üretim miktarları	1
Şekil 1.2	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lachrymans</i> 'nin dünyadaki yayılımı	2
Şekil 1.3	Dünyada kuraklık şiddetinin bölgelere göre etkisi.....	4
Şekil 3.1	Hidroponik ortam için hazırlanan a) Besin solüsyonları b) Besin solüsyonlarının ml biriminden ölçülmesi.....	27
Şekil 3.2	Hidroponik ortam için a) Besin solüsyonlarının steril su içinde karıştırılarak hazırlanması b) Besin elementleri karıştırıldıktan sonra Ph 5,8'e ayarlanması	27
Şekil 3.3	Hazırlanan makro ve mikro besin çözeltisinin a) Her kaba aynı ölçüde olacak şekilde aktarılması b) Bitkilerin yerleştirilmesi.....	27
Şekil 3.4	Çalışmanın genel akışı içinde işlem basamakları.....	29
Şekil 3.5	%3, 5 ve 7 PEG kuraklık dozu uygulanması sonucu hıyar bitkilerindeki kuraklık belirtileri	30
Şekil 3.6	HKYL hastalık şiddeti üzerine etkili EB seçim denemesi kronolojik işlem basamakları.....	32
Şekil 3.7	Çalışmada kullanılacak endofit bakteri izolatları a) Çizelge 1.1 de verilen stok EB izolatlar b) Endofit bakteri izolatlarının petri kabına ekilmesi	32
Şekil 3.8	Endofit bakterilerin tohum kaplama yöntemi ile uygulanması a) Çalışmada kullanılan tohumlar b) Hazırlanan %1.5'luk CMC (Karboksil Metil Selüloz) ile EB süspansiyonu içerisine tohumlar	32
Şekil 3.9	EB'lerin uygulaması a) EB izolatlarının 24 saatlik kültürlerinden hazırlanan 108 CFU/ml konsantrasyonundaki süspansiyonları b) Kotiledon yaprakların çıkmasıyla birlikte ikinci EB uygulama dönemindeki fideler.....	33
Şekil 3.10	EB 108 CFU/ ml konsantrasyonunda içirme yöntemiyle uygulanması	33
Şekil 3.11	Hıyar fidelerine Psl uygulamasının gerçekleştirilmesi a) Tween 20 ilaveli patojen süspansiyonu (107 CFU ml, OD 600: 0.05) ikinci gerçek yaprakların yüzeyini kaplayacak şekilde belirlenen ölçüde	

	püskürtme yöntemiyle uygulanması b) Psl uygulanan fidelerin kabinlere yerleştirilerek ortam neminin artırılması.....	34
Şekil 3.12	Psl viyol denemesinde a) hasada uygun hıyar bitkileri b) hıyar bitkilerinin hasada hazırlanması c) hıyar bitkisinin gövdenin bittiği yerden kesilerek tartıma hazırlanması.....	36
Şekil 3.13	Bitkilerin sürgün kuru ağırlığının belirlenmesi a) Sürgünlerin 60°C’de 48 saat kurutulması b) Sabit etüv ağırlığına ulaşmış sürgünlerin kuru ağırlıklarının hassas terazide belirlenmesi	36
Şekil 3.14	Kuraklık üzerine etkili EB seçim denemesi kronolojik çalışma çizelgesi.....	37
Şekil 3.15	EB uygulanmış hıyar bitkilerinin hidroponik ortamda kuraklığa maruz bırakılması.....	38
Şekil 3.16	Hıyar bitkilerinde yaprak oransal su içeriğini belirlemek amacıyla yaprakların saf su içerisinde bekletilmesi	39
Şekil 3.17	EB uygulamasının ikili strese maruz kalmış bitkilere etkisinin belirlendiği çalışmanın kronolojik olarak ana iş akışı.....	40
Şekil 3.18	Psl’nin Hıyar Yapraklarındaki Populasyonunun izlenmesinde uygulama basamakları a) Örneklerin ezilmesi b) Steril su eklenerek seyreltme basamaklarına hazırlanması c) Seyreltilen örneklerden 20 μ l alınarak KBZ besi ortamına nokta ekim yapılması	41
Şekil 3.19	a) Hıyar bitkilerinde prolin analizi için ekstratların tüplere hazırlanması b) 2 ml asit ninhidrin ve 2 mL glasiyal asetik asit eklenen ekstratların 1 saat 100°C su banyosunda bekletilmesi	44
Şekil 3.20	a) Hıyar bitkilerinde prolin analizi için kaynayan örneklere toluen eklenmesiyle spektrofotometrede okunması b) L-prolin ile spektrofotometrede standardizasyonunun oluşturulması	44
Şekil 3.21	V33K2 ve %3 PEG kuraklık dozunda yetiştirilen hıyar bitkilerinin total RNA izolasyonunun yapılması a) lizis tamponunun örneklere eklenmesi b) lizis tamponu eklenen örneklerin santrifüjlenmesi	47
Şekil 3.22	RT-qPCR hazırlanırken SYBR Green qPCR master mixin plate aktarılması	50

Şekil 4.1	PEG %3-5-7 kuraklık dozu uygulanması sonucu hıyar bitkileri arasındaki farkın görüntüsü.....	54
Şekil 4.2	PEG %3-4-5 kuraklık dozları uygulanan hidroponik deneme ortamı.....	55
Şekil 4.3	Biyotik ve abiyotik strese maruz kalan bitkilerde EB etkinliğinin belirlenmesine yönelik yapılan çalışmanın uygulama grupları.....	66
Şekil 4.4	Biyotik ve abiyotik strese maruz kalan bitkilerin EB etkinliğinin belirlenmesine yönelik hidroponik ortamda geliştirilmesi.....	66
Şekil 4.5	Patojen ve kuraklık stresine maruz kalan hıyar bitkilerine EB V33K2 uygulamasının hastalık HKYL hastalığı üzerine 4., 7., 14. ve 21. günlerdeki etkisinin grafiği	70
Şekil 4.6	Patojen ve kuraklık stresine maruz kalan hıyar bitkilerine EB V33K2 uygulamasının kuraklık şiddetinin 4..7..14. ve 21. günlerdeki etkisinin grafiği	71
Şekil 4.7	EB ve PEG uygulaması yapılan gruplarda Psl'nin zaman noktalarına göre popülasyon düzeylerinin grafiği.....	72
Şekil 4.8	EB ve PEG uygulaması yapılan uygulamalarda Psl'nin zaman noktalarından alınan örneklerin gruplara göre grafiği.....	73
Şekil 4.9	Farklı primerlerle cDNA sentezinin onayı	76
Şekil 4.10	Belirli zaman noktalarından alınan örneklerden PR-1 geninin gen ekspresyonu ifadeleri	77
Şekil 4.11	Belirli zaman noktalarından alınan örneklerden LOX-1 geninin gen ekspresyonu ifadeleri	78
Şekil 4.12	Belirli zaman noktalarından alınan örneklerden SNRK-2 geninin gen ekspresyonu ifadeleri	79
Şekil 4.13	Belirli zaman noktalarından alınan örneklerden ACS-3 geninin gen ekspresyonu ifadeleri	80



SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamalarıyla aşağıda sunulmuştur.

Simgeler

Açıklama

cm²

Santimetre kare

CFU

Coloni-forming units

Kısaltmalar

Açıklama

ABA

Absisik Asit

ACC

Aminosiklopropan-1-Karboksilat

APX

Askorbat Peroksidaz

CAT

Katalaz

EB

Endofit Bakteri

HKYL

Hıyar Köşeli Yaprak Lekeli

IAA

Indol-3-asetik asit

ISR

Induced Systemic Resistance

LOX

Lipoksijenaz

MDA

Malondialdehit

PEG

Polietilen Glikol

PGPR

Plant Growth Promoting Rhizobacteria

Psl

Pseudomonas syringae pv. *lachrymans*

SA

Salisik Asit

SAR

Systemic Acquired Resistance

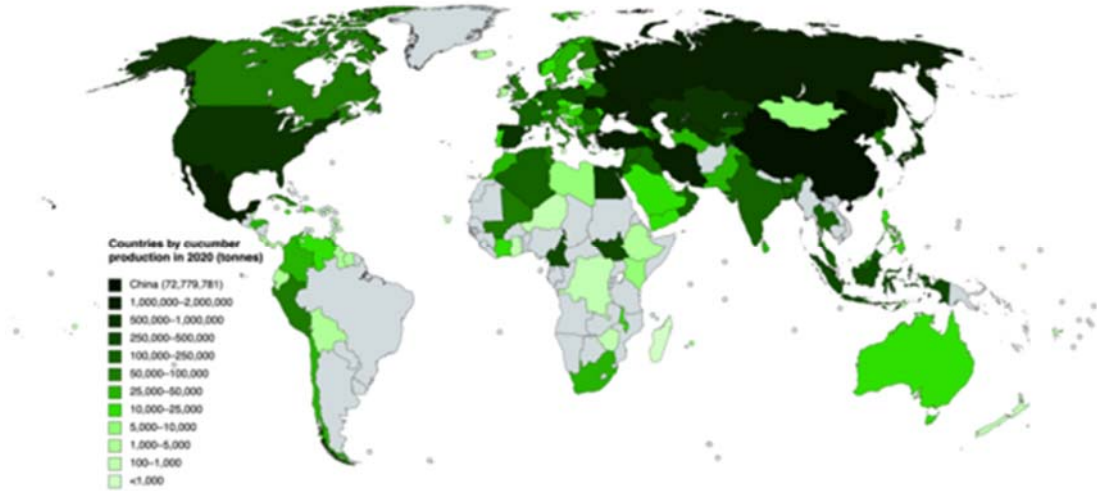


1. GİRİŞ

Hıyar (*Cucumis sativus* L.), Cucurbitaceae familyasından olup anavatanı Hindistandır. Buradan Çin'in doğusuna, Asya'nın batısına ve Avrupa'ya kadar yayılmıştır. Hıyarın Dünya'da ve Türkiye'de hem örtü altı hem de açık alanda yetiştiriciliği yoğun bir şekilde yapılmaktadır (Anonim, 2019).

Hıyarın düşük kalorisi ve %97 su oranı ile insan beslenmesinde önemi büyüktür. Öyleki 100 g hıyarda; 8 kcal, 0,2 g yağ, 0,6 gr protein, 1 gr karbonhidrat, 0,04 mg A vitamini, 0,01 mg B vitamini, 8 mg C vitamini, 20 mg Ca, 0,3 mg Fe, 24 mg P ve 15 mg Mg bulunur. Bazık yapılı olduğundan yemeklerde hayvansal gıdaların oluşturduğu asitliği giderir. Damarlarda aminoasit birikimini engeller ve damar sertliğinin önüne geçer (Anonim, 2016).

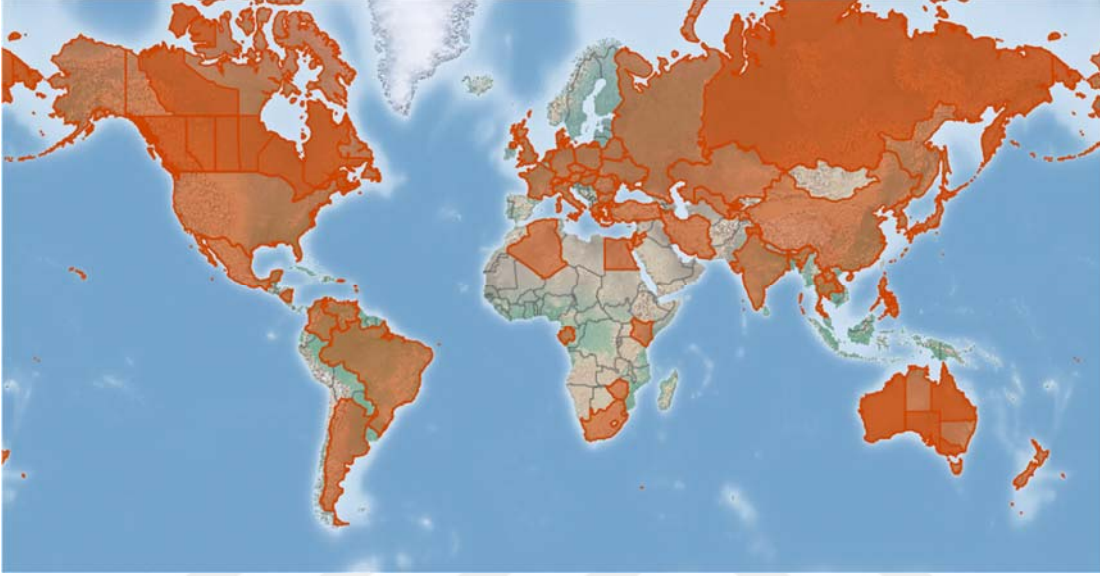
Ülkemizde 2022 yılı verileri toplam hıyar üretiminin 2021'e göre %2.9'luk artışla 1.942 bin tonla ulaştığını göstermiştir (Anonim, 2022). Türkiye hıyar ihracatında dünyada 13.958.201 kg ile 12. sıradadır (Şekil 1.1). Domatesten sonra en önemli ürün olan hıyar dünyada 2.2 milyon ha alanda 83.7 milyon ton üretilirken toplam sebze üretiminin %7.65'ini oluşturmaktadır (Bayramoğlu vd., 2021).



Şekil 1.1 Dünyada 2020 yılında hıyar üretimi yapan bölgeler ve üretim miktarları (Anonim, 2023)

Hıyar bitkisinin verimi ve kalitesi birçok fungal, bakteriyel ve viral kaynaklı hastalık tarafından etklenir. Bakteriyel kaynaklı bir etmen olan *Pseudomonas syringae*

pv. lachrymans'ın (*Psl*) sebep olduğu Hıyar Köşeli Yaprak Leke (HKYL) hastalığı, bu hastalıklar arasında meyve sayısında ve ağırlığında azalmaya, ürün miktarında düşüşe ve nispeten bazı hıyar meyvelerinin de pazarlama değerini kaybetmesine neden olan hastalıkların başında gelmektedir (Şekil 1.2) (Pohronezny vd., 1977).



Şekil 1.2 *Pseudomonas syringae pv. lachrymans*'nin dünyadaki yayılımı (CABI, 2022)

Psl, esas olarak hıyar patojenidir ve konukçularının yaprak, gövde ve meyvelerine zarar verir (Olczak-Woltman vd., 2009). Yapraklarda oluşan lekeler önceleri küçük, dairesi ve suludur. Bu lekeler hızla büyüyerek köşeli bir görünüm alır. Nemli havalarda bu lekelerin bulunduğu kısımlara rastlayan yaprakların alt yüzünde bakteriyel bir akıntı olur. Açık güneşli ve sıcak havalarda ise ince beyazımsı bir zar halinde kurur. Bu durum lekelerin karşıdan bakılınca beyaz renkli görünmelerine sebep olur. Hastalıklı alanlar artarak daha sonra ölür ve kurur. Yapraklar düzensiz bir biçimde delinir ve yırtılır. Meyvelerdeki lekeler ise küçük ve yuvarlakçadır. Çünkü meyve üzerinde yaprak yüzeyindeki gibi bol damarlı bir durum yoktur. Burada da hastalıklı kısım ölünce doku beyazlaşır, çatlar. Bu kısımlardan yumuşak çürüklük etmeni fungus ve bakteriler de girerek meyvedeki çürümelerin ilerlemesine neden olur (Saygılı vd., 2008). Bu belirtilerin varlığı nedeniyle enfekte olmuş yaprakların fotosentetik kapasitesi azalır (Olczak-Woltman vd., 2009; Lamichhane ve Venturi, 2015).

PsI, Gram (-), hemi-biyotrofik bakteriyel bir patojendir (Olczak-Woltman vd., 2009). Bu patojen, konukçunun azot metabolizmasını beslenmesi yararına değiştirebilen ve konakçı savunmasını zayıflatabilecek toksinler üretir (Skłodowska vd., 2019; Selvaraj ve Fofana, 2012).

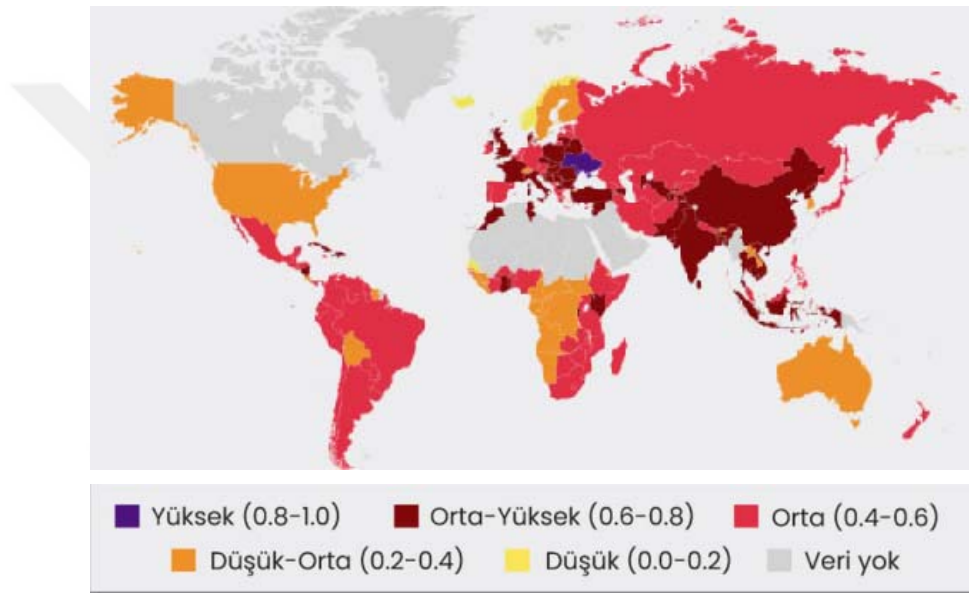
Hıyardaki *PsI* salgını verimde %30-60'a kadar azalmaya neden olabilir (Pohronezny K; vd., 1977;Khlaif, 1995). *PsI* ile kültürel mücadelede hastalıktan arı temiz tohum ve dayanıklı çeşit kullanılmak önceliklidir. Bunun yanında ürün rotasyonu, hastalık etmeninin ortamdan uzaklaştırılması, vektörlerle mücadele ve özellikle seralarda hastalık için uygun ortamın oluşturulmaması da kültürel mücadele için önemli basamakları oluşturmaktadır. Kimyasal mücadelede ise bakırlı bileşikler, maneb ve mancozeb'ten fayda sağlanacağı bildirilmektedir (Akköprü, 2012; Agrios, 2005). Hastalıkla mücadelede kültürel önlemlerin her zaman istenilen sonucu vermemesi, kimyasal mücadele uygulamalarının ise insan ve hayvan sağlığına zarar vermesi, gıda ürünlerinde kalıntı bırakması, çevreyi kirletmesi ve yüksek ilaç fiyatları gibi olumsuz etkileri nedeniyle daha çevre dostu ve sürdürülebilir bir mücadele yöntemi olan biyolojik mücadele ümit verici olmaktadır (Akköprü, 2012; Saygılı vd., 2008).

Abiyotik stres faktörlerinin başında gelen kuraklık, farklı disiplinlere göre değişik şekillerde ifade edilmektedir. Dünya Meteoroloji Örgütü (WMO)'ne göre kuraklık uzamış ve aralıksız devam eden yağış azalmasıdır. Birleşmiş Milletler Kuraklık ve Çölleşmeyle Mücadele Sözleşmesi (UNCCD)'ne göre kuraklık, yağışların kaydedilmiş normal seviyelere göre belirgin biçimde azalmasıyla ortaya çıkan doğal bir fenomendir ve yeryüzü kaynaklarının üretim sistemlerini kötü etkileyen ciddi hidrolojik dengesizliklere neden olur. Birleşmiş Milletler Dünya Tarım Örgütü (FAO)'ne göre, kuraklık zararı, nem azalmasından dolayı ürünlerin zarar gördüğü yılların yüzdesine göre tanımlanır (Şahin ve Kurnaz, 2014).

Kuraklık; meteorolojik, tarımsal, hidrolojik ve sosyo-ekonomik olmak üzere dört alt başlığa ayrılmıştır. Kuraklık meteorolojik kuraklık olarak başlar, tarımsal ve hidrolojik kuraklık olarak gelişir ve sosyo-ekonomik kuraklık olarak etkileri gözle görülür hale gelir (Mishra ve Singh, 2010).

Meteorolojik kuraklık, yağış esaslı olup uzun bir süre yağışın normal değerlerinin altına düşmesi olarak tanımlanırken, tarımsal kuraklık toprakta bitkinin ihtiyacını karşılayacak miktarda su bulunmaması olarak tanımlanır (Mengü Pamuk vd., 2011).

Hidrolojik kuraklık, nehir, göl ve yeraltı su kaynaklarında azalan su miktarı iken sosyo-ekonomik kuraklık diğer kuraklık çeşitlerine bağlı olarak ekonomik dengelerin bozulmasını içermektedir (Mishra ve Singh, 2010). Kuraklıktan etkilenen ekilebilir alanın payı 1970' lerden 2000'lerin başına iki kattan fazla artmıştır. Ülkelere göre yüksekte düşüğe doğru kuraklık şiddet dağılımı Şekil 1.3'te gösterilmiştir. Kuraklıktan dolayı ekilebilir arazinin 2050 yılına kadar yarıya düşmesi beklenmekte ve bu durum dünya gıda üretimi için ciddi tehdit oluşturmaktadır (Ashraf ve Wu, 1994; Ashraf ve Ozturk, 2008; Kasim vd., 2013; Vinocur ve Altman, 2019).



Şekil 1.3 Dünyada kuraklık şiddetinin bölgelere göre etkisi (Buchholz, 2021)

Kuraklık stresinin bitkilerde birçok etkisi vardır. Bitki hücrelerinden belirgin su yitimi gerçekleştiği zaman bitkide turgor kaybı kendini gösteren birincil stresir (Levitt, 2015). Kuraklık stresi altında, kök ve gövde gelişimi durur. Bitkide, yaprak alanı daralır ve yaprakta dökülmeler başlayarak yaprak sayısı düşer. Bitki gelişimdeki gerileme kök ve sürgün meristemlerindeki hücre bölünmelerinin durmasına bağlıdır. Su kısıtlılığı nedeniyle hücre bölünmesinin durması fotosentez oranının düşmesi ile doğru orantılıdır (Anjum vd., 2011).

Doğa koşullarında, bitkiler genellikle aynı anda çoklu biyotik ve abiyotik stres faktörlerine maruz kalır ve bu da önemli verim kaybına neden olur (Pandey vd., 2015). Bitkiler, stres kombinasyonları altında kendilerini korumak için çeşitli fizyolojik ve

moleküler adaptasyonlar geliştirmiştir. Bireysel stresler yerine stres türü vemaruz kalma zamanı kombinasyonları, bitkilerin karşılaştığı gerçekçi tehditler olarak kabul edilmiştir (Mittler ve Zilinskas, 1994a; Rizhsky vd., 2002; Suzuki vd., 2014; Mahalingam, 2015; Ramegowda ve Senthil-Kumar, 2015). Bu nedenle odak noktası artık kombine stres koşulları altında bitki tepkilerini anlamaya ve buna göre mücadele yöntemleri geliştirmeye yönlendirilmelidir (Pandey vd., 2015).

Bakteriyel hastalıklarla mücadelede ve kuraklık gibi abiyotik zararlanmalarda biyolojik mücadele çalışmalarının önemi artmaktadır. Biyolojik savaş kapsamında, toprak ve bitki sağlığının yönetilmesinde, bitki büyümesinin teşvik edilmesinde bitki ile ilişkili PGPR'lerin kullanılma potansiyelleri önemli bir yer tutmaktadır (Rovira, 1965; Hallmann vd., 1997; Sturz vd., 1999; Welbaum vd., 2004; Glick vd., 2007)

PGPR'lar rizosfer tabakasında bulunan bitki büyümesini teşvik eden farklı bakterilerden oluşan bir gruptur. Endofitik bakteriler, rizosferin ve/veya kökle ilişkili bakteri popülasyonunun bir alt kümesi olarak düşünülebilir (Germida vd., 2006; Marquez-Santacruz vd., 2010). Endofit bakteriler konukçu bitkiye, özellikle büyümeyi teşvik etme ve patojenlerden koruma gibi çeşitli faydalar sunabilmesinin yansıra çeşitli çevresel koşullar altında epifit bakterilere göre bitki ile daha verimli bir şekilde iletişim kurabilir ve etkileşime girebilirler (Ali vd., 2012; Coutinho vd., 2015).

Bu faydalı bakteriler bitki gelişimi ve sağlığını arttırıcı etkilerini direk veya indirek olarak göstermektedirler. Direk etki; nitrojen fiksasyonu, fosfat ve potasyum çözündürmesi, siderefor üretimi, fitohormon üretimi olarak sıralanabilir. İndirek etkisi; antibiyotik üretimi, hiperparazitizm, rekabet gibi biyokontrol mekanizmaları veya ekzopolisakkarit üretimi, uyarılmış sistemik direncin indüklenmesi olarak sıralanabilir (Shailendra Singh, 2015). Bununla birlikte, EB'ler kuraklık, tuz ve besin maddesi eksikliği veya fazlalığı gibi abiyotik stresleri de uyarılmış dayanıklılık, ozmotik düzenleme, bağıl su içeriğinin (RWC) ayarlanması ve antioksidan aktivitesinin düzenlenmesi ile bitkiye katkı sağlayabilir (Yang vd., 2009). Böylelikle EB'ler biyotik ve abiyotik streslerin azaltılmasında bitkiye katkıda bulunur (Welbaum vd., 2004; Van Loon ve Bakker, 2006; Lugtenberg ve Kamilova, 2009).

Bu tez çalışmasında, *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*'ın neden olduğu Hıyar Köşeli Yaprak Leke Hastalığı ve kuraklık stresine ardışık olarak maruz kalan hıyar bitkilerinin tepkisi ve bu tabloya EB'in etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu

çerçevede bu streslere strese maruz kalma sırasının bitkide morfolojik, biyokimyasal ve moleküler düzeydeki etkileri ile *Psl* popölasyonuna etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.



2. KAYNAK BİLDİRİŞLERİ

2.1 Hastalık etmeni ile ilgili çalışmalar

Hastalığın etmenini tanılamaya yönelik yapılan çalışmalar sırasında etmenin konukçusunda oluşturduğu gözyaşı benzeri bakteriyel akıntılardan esinlenerek, Latince'de gözyaşı anlamına gelen "lachrymans" adını verilmiş ve etmeni *Bacterium lachrymans* olarak adlandırılmıştır (Smith ve Bryan, 1915). Daha sonra Carsner (1918), etmeni *Pseudomonas lachrymans* olarak adlandırmış, fakat günümüze kadar farklı birçok isim almış ve 1978'de *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* (*PsI*) olarak adlandırılmıştır (Bradbury, 1986). Günümüzde Hıyar Köşeli Yaprak Leke Hastalığı etmeni *PsI* taksonomik olarak; Bacteria (Domain), Proteobacteria (şube), Gammaproteobacteria (sınıf), Pseudomonadales (takım), Pseudomonadaceae (aile) *Pseudomonas* (cins) içinde yer almaktadır (Kado, 2010).

Hıyar Köşeli Yaprak Leke Hastalığı; hıyar, kavun, kabak, acur ve balkabağında yaprak, gövde ve meyvede belirtiler oluşturur (Agrios, 2005). Köşeli yaprak lekesi ilk önce yaprakların altında ısılatılmış lekeler (lezyonlar) olarak görülür. Küçük yaprak damarları ile sınırlı lezyonlardan, nemli koşullar altında sızan sümüksü beyaz bakteriyel akıntı gözlenir. Lezyonlar sonunda üst yaprak yüzeyinde gözlenir hale gelir ve nekrotik, düzensiz kırmızımsı kahverengi lekeler olarak görülür. Sistemik enfeksiyonlar meydana gelebilir ve hastalık vasküler dokuyu (ksilem ve floem) etkileyebilir (Nazir A Bhat vd., 2010). *PsI*'nin farklı izolatlarının, inokulasyondan 3-6 gün sonra tipik yaprak lekelerinin yanı sıra solgunluğa da sebep olduğu kaydedilmiştir (Mohamed vd., 2000)

Patojenin yayılmasında yağmur ve rüzgâr önemli bir rol oynar (Bhat vd., 2010; Shila vd., 2013). Hıyar köşeli yaprak lekeli hastalığının oluşumunda çevre faktörlerinin, özellikle sıcaklık ve yüksek nemin çok önemli olduğu, bu hastalık üzerine yürütülen ilk çalışmalardan beri bildirilmiştir (Carsner, 1918; Hüseyin Türküsay ve Onoğur, 1998; Agrios, 2005). Bakterinin gelişimi için gerekli olan optimum sıcaklık 25-27°C'dir. Etmenin sebep olduğu tipik büyük köşeli lezyonların nispi nemin %90'dan yüksek olduğu seviyelerde ortaya çıktığı ifade edilmiştir (Watanabe ve Ohuchi, 1993).

Hıyar köşeli yaprak lekeli hastalığının mücadelesinde; hastalıktan ari tohum kullanımı, yağmurlama sulama yerine damla sulamanın tercih edilmesi, kabakgiller

familyasına ait olmayan bitkiler ile ürün rotasyonu, dayanıklı çeşitler yetiştirmek, seralarda hıyar yetiştiriciliğinde orantılı nemi %80-90'ın altına düşürmek hastalığın yayılmasını önleyebilecek başlıca kültürel önlemlerdendir (Türküsay ve Saygili, 2000) Kimyasal mücadelede bakırlı bileşiklerin kullanımı ve bakır mancozeb uygulamalarının hastalığın kontrolünde etkili olduğu bildirilmiştir (Türküsay ve Saygili, 2000; Bhat vd., 2010).

Bitkileri patojenlere ve abiyotik stres faktörlerine karşı koruyan diğer bir mekanizma ise uyarılmış dayanıklılıktır. Stres altında bitkiler, tüm bitkide sistematik olarak çalışan, uyarılmış direnç olarak bilinen savunma mekanizmasını etkinleştirerek hızlı tepki verebilir (Jones ve Dangl, 2006). Uyarılmış dirençin birçok formu olsada genel olarak ön plana çıkan iki formu vardır. İlki ekzojen kimyasal ajanlar ve patojenik organizmalar tarafından indüklenen sistemik direnç, sistemik kazanılmış direnç (Systemic Acquired Resistance - SAR) olarak adlandırılır (Kloepper vd., 1992; Annapurna vd., 2013). İkincisi ise PGPR'lar tarafından aktive edilen uyarılmış dayanıklılık “uyarılmış sistemik dayanıklılık” (Induced Systemic Resistance - ISR) olarak adlandırılır (Kloepper vd., 1992; Bukhat vd., 2020). SAR, doğrudan saldıran patojen ile antibiyoz yoluyla indüklenir ve nekroza neden olur, oysa ISR genellikle konukçu bitkilerde nekrozu tetiklemez (R. K. Cameron vd., 1994; Van Loon vd., 1998). PGPR'ler lipopolisakkaritler (LPS), flagellalar sayesinde ve sideroforlar, siklik lipopeptitler, 2,4-diasetilfloroglüsinol, homoserin laktonlar ve asetoin ve 2,3-bütandiol gibi uçucular ile birçok özgün bakteriyel bileşen, ISR'yi indükler (Naznin vd., 2013).

Birçok araştırmada hastalık ile mücadelede hıyar bitkilerinin farklı kısımlarından elde edilen PGPR izolatlarının Hıyar Köşeli Yaprak Leke Hastalığına karşı biyokontrol etkisi araştırılmıştır. Akbaba (2014)'nın yaptığı *in vitro* da testlerde 38 EB izolatının tamamı Indol-3-Asetik Asit (IAA), %95'i siderofor üretme, %42' si fosfatı çözündürme ve %20'si antibiyosiz özellik göstermiştir. *In vitro* çalışmaları sonucunda başarılı bulunan 24 EB izolatı *in vivo* denemelerinde *Psl*' ye karşı kullanılmıştır. *In vivo* ' da testlenen EB izolatlarının %21'i hıyar bitkilerinde *Psl*'nin gelişimini %50'den daha yüksek oranda engellediği rapor edilmiştir (Akbaba, 2014). Akköprü (2012) duyarlı ve tolerant hıyar bitkilerde kök bakterilerinin topraksız tarım sisteminde, duyarlı hıyar çeşidinde (2246 F1) hastalık şiddetini Pozitif Kontrole göre %33 tolerant hıyar çeşidinde (Crispina F1) ise %17 oranında engellemiştir. Ayrıca hastalık baskısının olmadığı koşulda, kök bakteri

uygulamasının pazarlanabilir verimi duyarlı ve tolerant çeşitte negatif kontrole göre, sırasıyla, %33 ve %67 oranında arttırdığı gözlenmiştir (Akköprü, 2012).

Hıyarda *PsI*'ye karşı biyolojik mücadele yöntemi kullanılarak yapılan diğer bir çalışmada, EB ve Arbusküler Mikorhizal Fungus (AMF) kullanılmıştır. EB'lerin *PsI*'nin sebep olduğu hıyar köşeli yaprak lekeli hastalığını önlemede başarılı olduğu tespit edilmiştir (Çelik ve Akköprü, 2021).

Fitopatogenlere karşı rizobakterilerin kullanılmasıyla bitki büyümesini teşvik eden en güçlü biyokontrol mekanizmalarından biri olarak antibiyozis gösterilmektedir. Örneğin *Bacillus amyloliquefaciens*, biyolojik kontrol aktivitesi için lipopeptid ve poliketid gibi antibiyotikleri ürettiği ve toprak kaynaklı patojenlere karşı bitki büyümesini teşvik ettiği bilinmektedir (Ongena ve Jacques, 2008).

2.2 Kuraklık Stresi ile İlgili Çalışmalar

Günümüzde küresel iklim değişikliği çevreye yönelik en yıkıcı tehdit olarak görülmekte ve tarımsal üretim üzerinde etkisinin her geçen gün artacağı belirtilmektedir. Bu nedenle çiftçilerin, araştırmacıların ve politikacıların büyük ilgisini çekmektedir. Küresel iklim değişikliği nedeniyle çevre koşullarının öngörülemezliği daha da artmakta ve zararları ciddileşmektedir. Şu anda tarımı etkileyen en akut çevresel streslerden biri olan kuraklık ekonomik önemi yüksek olan türlerin kültür bitkilerinin büyümesi ve gelişmesi üzerinde belirgin olumsuz etkilere sahiptir. İklim değişikliğindeki artış ve artan su kriziyle birlikte kuraklık stresinin etkilerinin daha da artması beklenmektedir (Hasanuzzaman vd., 2013). Yağışsız dönemin kuraklık oluşturması; toprağın su tutma kapasitesi ve bitkiler tarafından evapo-transpirasyon hızına bağlı olarak gerçekleşmektedir (Öztürk, 2015) Mevcut su varlıklarının en yüksek kapasitede tarımda kullanımı ve sürdürülebilirliğinin sağlanması için önlemler alınırken, bitki su ilişkisine yönelik araştırmalar daha önemli duruma gelmiştir (Selda ve Ekinci, 2015).

Bitki kökleri toprak yüzey nemindeki değişimlere bağlı olarak morfolojilerini değiştirir, yani su eksikliği koşulları daha derin kök penetrasyonuna yol açar ve toprakta kök infiltrasyonunu azaltır (Zhang vd., 2017). Kuraklığın ilk belirtisi bitki hücrelerinden belirgin su eksikliği gerçekleştiği zaman bitkide turgor kaybıyla kendini gösterir (Levitt, 1980). Bu nedenle bitkiler, kuraklık stresine maruz kaldıklarında hücrelerinde “ozmolit”

olarak adlandırılan ve hücrede turgor dengesini korumada görev alan bir takım çözünür madde sentezler ve biriktirirler. Bu maddelere glisin, betain, prolin ve asparajin örnek verilebilir. Bu ozmolitler su dengesini doğrudan korumak yerine yaprak su basıncını düzenleyerek stomada iletkenliği arttırırlar. Böylelikle fotosentezin devamlılığını sağlayarak bitki gelişimi düzenlenebilir. Prolin, kuraklık stresi altında ilk biriken amino asittir. Prolin temelde lipid oksidasyonunu engelleyerek hücrenin membran ve protein yapısını korumada görev alır. Ancak son zamanlarda araştırmalar sinyal iletiminden de sorumlu olabileceği gibi hücre bölünmesi ve gen ifade seviyelerinin düzenlenmesinde rol alabileceğini ortaya koymaktadır (Anjum vd., 2011; Liang vd., 2013; Kavi Kishor ve Sreenivasulu, 2014; Öztürk, 2015).

Bitkilerin kuraklık stresine verdiği diğer bir yanıt ise stomalarını kapatmasıdır (Osakabe vd., 2014). Ancak stomalar kapanınca karbondioksit girdisi az olacağı için bitkide fotosentez hızıda düşecektir. Bu da bitki gelişimini yavaşlatacaktır (Farooq vd., 2009; Dolferus, 2014). Bitkiler su stresine maruz kaldığında kökler tarafından algılanan stres absisik asit (ABA) sitokinin, etilen gibi faktörler ile gövdeye iletilir (Anjum vd., 2011). Stomaların kapanması ABA'nın hücrede potasyum (K⁺) iyon akışını değiştirmesiyle gerçekleşmektedir. Ayrıca ABA birikiminin kuraklık stresi altında gen ifadesinde değişikliklere yol açarak metabolizmanın yeniden yapılandırılmasında görev aldığı bildirilmektedir (Shanker vd., 2014).

Bitkiler kuraklığa maruz kaldıklarında en önemli biyokimyasal değişiklik fotosentez hızının düşmesine bağlı olarak hidrojen peroksit, süperoksit anyonu ve tekli oksijen gibi reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşmasıdır (Bhargava ve Sawant, 2013). Aslında ROS'lar stres şartları altında sinyal iletiminde rol oynayan hücre metabolizmasının yan ürünüdür. Fakat aşırı birikimi durumunda lipid peroksidasyonunu, protein indirgenmesini ve DNA parçalanmasını tetikleyerek hücre ölümüne sebep olmaktadır. Bu yüzden ROS'ların birikiminden kaynaklı oluşan oksidatif hasarın engellenmesinde SOD (süperoksit dismutaz), CAT (katalaz), APX (askorbat peroksidaz) gibi antioksidan enzimler veya glutatyon, askorbat, tokoferoller, karotenoidler gibi enzimatik olmayan antioksidan moleküller önemli etkiye sahiptir. Fotosentetik membranların korunmasında, enzimatik olmayan antioksidan moleküller görev alırken, reaktif oksijen bileşiklerinin indirgenmesinde antioksidan enzimler görev alır (Farooq vd., 2009; Anjum vd., 2011; Osakabe vd., 2014; Dolferus, 2014).

Dal (2002) 25 adet kabak genotipinin kuraklık stresine tolerans seviyesini belirlemeyi amaçlamıştır. Araştırmada; kuraklık stresi oluşturmak için %2, %3, %4, %5, %6, %8, %10, %15 olmak üzere 8 farklı dozda PEG 6000 uygulanmıştır. Kontrol grubu ile %2, %3 ve %4'lük PEG 6000 grubunda strese yönelik önemli bir değişiklik görülmemiştir. %5, %6 ve %8 lik PEG 6000 gruplarında bitkilerin stres koşullarından etkilendiği ancak yaşamlarını idame ettirebildikleri belirlenmiştir. %10 ve %15'lik PEG 6000 grubunda ise bitkilerin yapraklarında hızlı bir şekilde kloroz olduğu ve günden güne bitki gelişiminin durduğu ortaya çıkmıştır (Dal, 2002).

Başka bir araştırmada, sera ortamında yetiştirilen hıyar bitkisinin yarı ıslatmalı sulama (YIS) ve geleneksel kısıtlı sulamaya (KS) verdiği tepki araştırılmıştır. Kontrol grubu (K100), geleneksel kısıtlı sulama (KS75 ve KS50), ardışık-yarı ıslatmalı sulama (A-YIS75 ve A-YIS50) ve sabit-yarı ıslatmalı sulama (SYIS75 ve S-YIS50) olmak üzere yedi sulama grubu ayarlanmıştır. İlk yıl, istatistiki olarak SYIS50 ve KS50 grupları en düşük verim değerlerine sahip olmuştur. K100, KS75, S-YIS75, A-YIS75 ve A-YIS50 grupları ise en yüksek verim değerlerinde yer almıştır. İkinci yılda birinci yıla benzer sonuçlar elde edilmiş ancak K100 ve S-YIS75 grupları en yüksek verim değerlerine sahip olmuştur. Araştırmacılar, genel olarak, sulama suyunun seviyesi azaldıkça verimde azalma saptamıştır (Kaman vd., 2017).

Kuraklığın fasulyede oluşturduğu enzim ve iyon değişimlerinin belirlendiği çalışmada, SOD, CAT, APX, MDA Klorofil-*a*, klorofil-*b*, toplam klorofil, K, Ca ve Na iyon içeriklerindeki değişimler incelenmiştir. Klorofil ve MDA oranları kuraklığa toleran genotiplerde duyarlı genotiplere göre daha yüksek çıkmıştır. SOD, CAT ve APX seviyelerinde kuraklık stresinin ilerleyen dönemlerinde yine toleran çeşitlerde hassas çeşitlere göre artan bir belirgin fark görülmüştür (Kabay ve Şensoy, 2016).

Hıyar (*Cucumis sativus* L.) yapraklarında kuraklığa adaptasyon sırasında IAA ve ABA içeriklerindeki değişikliklerin araştırıldığı çalışmada sera koşullarında kuraklık uygulaması yapılmıştır. Kuraklığa bağlı olarak yaprak alanında belirgin bir şekilde azalma olduğu gözlenmiştir. Bitkilerin kuraklığa adapte olmasıyla beraber ABA' da geçici bir artış gözlenmiştir. Adaptasyonun üçte ikilik döneminde IAA içeriği artmıştır. ABA içeriğindeki ikinci artışı solgunluğun kalıcı döneminden önce ve IAA içeriği düşüş gösterdiğinde gerçekleşmiştir. Araştırmacılar bitkinin kuraklığa adaptasyonu sırasında

savunma tepkilerinin gelişmesinde yalnızca ABA' nın değil IAA'nın da rol oynadığını belirtmişlerdir (Pustovoitova vd., 2004).

İki hıyar genotipi, L-9 (kuraklığa tolerant) ve A-16 (kuraklığa duyarlı) su kısıtlılığı uygulamasıyla karşılaştırılmıştır. Normal şartlar altında yetiştirilen on günlük L-9 ve A-16 fideleri, 7 gün boyunca su eksikliği ile muamele edilmiş ve 3 gün boyunca normal su koşullarına dönmüştür. Hem L-9 hem de A-16 kuraklıktan önce güçlü bir gelişme göstermiştir. Ancak A-16 kuraklık stresi sonrasında büyüme noktasının üst kısmında solgunluk sergilemeye başlamış ve yaprakları klorotik belirtiler ile birlikte sararmıştır. Kuraklık uygulanan A-16 bitkilerinin yaklaşık %13'ü, sonraki 3 günlük normal su koşullarına dönüşten sonra hayatta kalırken, L-9 bitkilerinin %77'si hayatta kalmıştır. Kuraklık öncesi L-9 ve A-16 arasında MDA ve SOD enzimi açısından fark bulunmazken, A-16 kuraklık uygulamasından sonraki 4. günde MDA'da belirgin bir artış ve SOD'da önemli bir azalma göstermiştir (Wang vd., 2018).

2.3 Bitki Gelişimini Düzenleyici Bakteriler ile Kuraklık Stresi ve Hastalıklarla Mücadeleye Yönelik Çalışmalar

Günümüzde rizosfer mikroorganizmaları; bitkiler üzerindeki olumlu etkileri nedeniyle çevre dostu bir şekilde bitkilerin sağlığını korumak için önemli bir araç haline gelmiştir (Akhtar vd., 2012). Bu mikroorganizmalar bitki büyümesini etkileyebilir ve genellikle bitki büyümesini teşvik eden rizobakteriler (PGPR) olarak anılırlar (Kloepper 1980). PGPR'lerin biyotik ve abiyotik faktörlerle etkileşimlerinin anlaşılması, bunların biyolojik iyileştirme tekniklerinde, enerji üretim süreçlerinde ve ilaç, gıda, kimya ve madencilik gibi biyoteknolojik endüstrilerde yoğun bir biçimde kullanılmalarının önünü açmıştır (Sagar vd., 2012). Ayrıca bitki büyümesini teşvik eden rizobakteriler, kimyasal gübre ve pestisit uygulamasını azaltarak hem çevreye faydasıyla hem de daha düşük üretim maliyeti ile ekonomik katkı sağlayabilir (Maheshwari vd., 2012).

Endofitik bakteriler, PGPR'lerin bir alt kümesi olarak düşünülebilir (Germida vd 1998, Marquez-Santacruz vd 2010). Endofit bakteriler; yüzey dezenfeksiyonu yapılmış bitki dokularından veya bitkilerin iç dokularından izole edilebilen, bitkilerin vasküler dokuları ile bitkinin tamamına yayılabilen, konukçuya zarar vermeden yaşamının bir bölümünü bitki bünyesinde geçiren mikroorganizmalar olarak tanımlanır ((Hallmann vd.,

1997; Azevedo vd., 2000; Rosenblueth ve Martínez-Romero, 2006; Hardoim vd., 2008; Ryan vd., 2008a; Romero vd., 2016). *Agrobacterium*, *Azotobacter*, *Burkholderia*, *Pseudomonads*, *Bacillus* ve *Rhizobium* bakteri cinsleri endofit bakterilere örnek gösterilebilir (Vessey, 2003; Gupta vd., 2015; Goswami vd., 2016).

PGPR' ler bitkilere direk ve dolaylı yollardan fayda sağlayabilirler. Bitkilere direk etkiyi; nitrojen fiksasyonu, fosfat ve potasyum çözündürmesi, siderefor ve bitki hormonlarının üretimi veya düzenlenmesi ile katkı sağlarken, dolaylı etkiyi ise antibiyotik üretimi, ekzopolisakkarit üretimi, uyarılmış sistemik direncin (ISR) indüklenmesi gibi biyokontrol mekanizmaları ile katkı sağlayabilirler (Kloepper ve Scroth, 1980; Vessey, 2003; Gupta vd., 2015; Bukhat vd., 2020). Kurak şartlarda yetiştirilen bitkilerde PGPR uygulamalarının bitkide morfolojik, fizyolojik ve hücresel düzeyde etki etmesi ile kuraklık stresine toleransı arttırdığı bildirilmektedir (Saravanakumar vd., 2011; Vardharajula vd., 2011; Kasim vd., 2013). Yapılmış birçok çalışma da kuraklık stresine maruz bırakılan bitkilerde PGPR uygulamalarının serbest radikallere karşı antioksidant enzim aktivitesini artırarak tolerans geliştirilebildiğini göstermektedir (Armada vd., 2014; Naveed vd., 2014; Sarma ve Saikia, 2014). Ayrıca, etilen öncüsü ACC'nin, bakteriyel ACC deaminaz tarafından bozunmasının bitki stresini azalttığı ve normal bitki büyümesini desteklediği belirlenmiştir (Glick ve ark., 2007).

Yapılan birçok çalışmada PGPR'ların bakteriyel patojenlerin yanında, fungus, böcek gibi zararlıları etkili bir şekilde kontrol ettiği ve bitki gelişimini arttırdığı tespit edilmiştir. Örneğin biberde 19 endofitik bakteri suşu izole edilerek antraknoza neden olan *Colletotrichum gloeosporioides*'e karşı antagonistik potansiyelleri açısından taranmıştır. Bu 19 bakteri içinden *Pseudomonas aeruginosa*'nın hastalığı baskılamada etkili olduğu tespit edilmiştir (Sudhir Allu vd., 2014). Diğer bir çalışmada 608 kültüre alınabilen endofitik bakteri izolatları antagonizma testinden sonra 33 izolatin fitopatojenleri (*Sclerotinia sclerotiorum*, *Botrytis cinerea* ve *Colletotrichum gloeosporioide*) güçlü bir şekilde inhibe ettiği tespit edilmiştir. Antagonist ve PGPR aktivitelerinin değerlendirilmesine dayanarak 33 antagonist arasından 8 endofitik bakteri daha seçilmiştir. Yapılan saksı deneyi sonuçlarında, test edilen 8 endofitin tamamının dut fidelerinin büyümesini farklı seviyelerde uyardığını ve *Bacillus* sp. CW16-5, sürgün uzunluğunu ve kök taze ağırlığını sırasıyla %83.37 ve %217.70 oranında arttırdığı tespit edilmiştir (Xu vd., 2019). *Beauveria bassiana* ve *Bacillus subtilis* karışımını içeren bir

biyoformülasyon, sera ve tarla koşullarında domatestte *Fusarium* solgunluğuna ve meyve kurduna karşı test edilmiştir. Bu biyoformülasyon sera ve tarla koşullarında, *Fusarium* solgunluğu (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*) ve meyve kurdu (*Helicoverpa armigera*) görülme sıklığını kontrol grubuna göre belirgin bir şekilde azalttığı tespit edilmiştir (Prabhukarthikeyan vd., 2014).

Çin'de kuraklığa dayanıklı bitkilerden olan *Alhagi sparsifolia* Shap. (*Leguminosae*) yapraklarından PGPR özellik sergileyen LTZR-11Z^T *Pantoea alhagi* suşu izole edilmiştir. Mikroskopik gözlemler LTZR-11Z^T suşunun hem *Arabidopsis*'in hem de buğdayın rizoplanını etkili bir şekilde kolonize ettiğini ortaya çıkarmıştır. LTZR-11Z^T suşunun, buğdayın kuraklık stresine karşı direncini artırarak büyümesini teşvik ettiği tespit edilmiştir. LTZR-11Z^T kuraklık stresindeki buğdayın yapraklarında çözünebilir şeker birikiminin artmasına, MDA birikiminin azalmasına ve klorofilin bozulmasını azaltmada etkili olduğu tespit edilmiştir (Chen vd., 2017a).

In vitro ortamda, biber bitkilerine kuraklık stresi ortamının sağlanması için PEG uygulaması yapılmıştır. Kuraklık stresine karşı bitki büyümesini teşvik edici özelliğe sahip iki endofitik bakteri (*Bacillus subtilis* ve *Paenibacillus illinoensis*) uygulanmıştır. Bu EB'ler kontrol grubuna kıyasla kuraklık koşullarında her iki türün de kök sistemini uyardığı ve yaprakların fotosentetik aktivitesini arttırdığı tespit edilmiştir (Vigani vd., 2019). Tuzluluk stresi altında olan mısır bitkilerinden izole edilen *Bacillus subtilis* ve *Pseudomonas fluorescens*'in etkilerine bakılmıştır. Endofitik bakteriler tuz stresi altındaki bezelyede, stresli olmayan bitkilere kıyasla bitkisel parametreleri önemli ölçüde arttırmıştır. Genel olarak, bezelye bitkileri farklı NaCl çözeltisi ile sulandığında tüm fotosentetik pigment seviyeleri (Chl *a*, Chl *b*, karotenoidler ve toplam pigment içeriği) azalmıştır. Ancak, bitkilerin endofitik bakteriler ile muamelesi hem tuz stresi olan hem de tuz stresi olmayan bitkilerde tüm fotosentetik pigmentlerin içeriğinde bir artışa yol açmıştır. Ayrıca, bu endofitik bakterilerin kullanımı, kontrol grubuna göre tuz stresi altındaki bezelye bitkilerinin toplam çözünür şeker, prolin ve fenol içeriğinde önemli bir artışa neden olmuştur (Sofy vd., 2021) .

2.4 Biyotik ve Abiyotik Streslerin Kombine Olduğu Çalışmalar

Kuraklık, sıcak, soğuk, tuzluluk, ozon, ultraviyole (UV) radyasyon ve besin stresi gibi abiyotik streslerin ortaya çıkması, bitkilerin biyotik streslere tepkisini önemli ölçüde değiştirir. Benzer şekilde, bitkilerin patojenlerle etkileşimi, abiyotik streslere tepkilerini etkiler. Bu etkileşimlerin sonuçları, bitki türüne, patojene ve stres yoğunluğuna bağlı olarak iki stresten herhangi birine karşı direnç veya duyarlılığa neden olabilir (Pandey vd., 2015).

Abiyotik stresler genellikle bazı zorunlu veya biyotrofik patojen enfeksiyonlarını ve hastalıkların şiddetini azalttığı belirtilmiştir (Schoeneweiss, 1975). Örneğin, kuraklık stresi altında *Botrytis cinerea* enfeksiyonu %50 oranında baskıladığı tespit edilmiştir. Ayrıca aynı çalışmada kuraklık stresi biyotrofik fungus *Oidium neolycopersici* (domateste küllemenin etmeni) enfeksiyonunu, iyi sulanan enfekte olmuş bitkilere kıyasla ABA'da eşlik eden iki kat artışla baskılamıştır (Achuo vd., 2006) Aksine hemibiyotrofik patojenler, düşük inokulum seviyesinde bile kuraklık stresi sırasında ciddi hastalıklara neden olabilir. Örneğin, *Carthamus tinctorius*'ta (aspir) kuraklık stresi *Phytophthora cryptogea*'nın (aspirde kök çürüklüğünün etmeni) neden olduğu kök çürüklüğünü arttırmıştır (Duniway, 1977).

Kuraklık stresi altında *Arabidopsis thaliana* bitkisine *P. syringae* uygulanmıştır. *P. syringae* enfeksiyonu stoma kapanmasına neden olmuş ve patojen girişi engellenmiştir. Bu da enfekte olmuş bitkiden su kaybının azalmasına neden olmuştur. Dolayısıyla enfeksiyon bitkilerin kuraklık stresine karşı toleransını arttırmıştır (Goel vd., 2008) .

Kontrollü koşullar altında *Phaseolus vulgaris* L.'de kömür çürüklüğü etmeni *Macrophomina phaseolina*'nın neden olduğu büyüme, histopatolojideki değişiklikler ve kuraklık stresi karakterize edilmiştir. Kuraklık stresi, *P. vulgaris*'in tüm bitkisel yapılarının terleme hızını, su potansiyelini, ozmotik potansiyelini, turgor potansiyelini, bağıl su içeriğini, yaprak alanını ve kuru ağırlığını azaltmıştır. Kuraklık stresi kömür çürüklüğü gelişimini arttırmıştır. Sonuç olarak *Phaseolus vulgaris*'te bitkide suyun azalmasına neden olmuş, bu da bitkilerin *Macrophomina phaseolina*'ya karşı daha duyarlı olmasına neden olmuştur (Mayek-Pérez vd., 2002).

Başka bir çalışmada ise kuraklık stresine alıştıran *Nicotiana benthamiana* bitkilerine nekrotrofik fungus *Sclerotinia sclerotiorum*'a ve aynı zamanda hemi-

biyotrofik bakteriyel patojen *Pseudomonas syringae* pv.*tabaci* uygulanmıştır. Kuraklık stresine alıştıran *N. benthamiana* bitkilerine *S. sclerotiorum* aşılması, kuraklığa alıştırmamış bitkilere kıyasla hastalık kaynaklı hücre ölümüne daha az yol açmıştır. Ayrıca *P. syringae* pv. *tabaci*'nin aşılması orta dereceli kuraklık stresine alıştıran *N. benthamiana* bitkilerinde hastalık belirtilerinin azalmasına yol açmıştır (Ramegowda ve Senthil-Kumar, 2015).

Chojak-Koźniewska vd. (2017) *Psl* ve tuz stresinin bireysel veya ardışık etkisine maruz kalan hıyar bitkilerinin tepkisinde reaktif oksijen türleri, antioksidan enzimler, absisik asit ve salisilik asit birikimi üzerinden incelenmiştir. Sadece tuz stresi veya *Psl* enfeksiyonu uygulanan gruplarda, özellikle yaprak büyümesi yönünden farklılık göstermiştir. Fakat iki stresin bir araya gelmesi zararın en yüksek düzeye ulaştığı belirlenmiştir. Patojen enfeksiyonuna hıyarın cevabı daha önce uygulanan NaCl tedavisinden olumsuz etkilenmiştir. NaCl'nın neden olduğu değişiklikler patojen gelişimini desteklemiş ve hastalık semptomlarını yoğunlaştırmıştır. Ayrıca, hormon seviyelerindeki stres sinyali bileşenleri ile Fe süperoksit dismutaz aktivasyonu, salisilik asit / absisik asit dengesi ve PR-1 gen ekspresyonu ile ilişkili proksidan/antioksidan mekanizmalar arasında spesifik etkileşimler olduğu belirlenmiştir (Chojak-Koźniewska vd., 2017).

2.5 Biyotik ve abiyotik stress altındaki bitkilerde Gen ifadeleri

SAR, savunma tepkilerinde yer alan çok sayıda patojenite ile ilişkili (PR) gen setinin ifadesini etkinleştirir. PR genlerinin indüklenmesiyle SA (salisik asit) seviyesinde artış meydana gelir (Pieterse vd., 1996) PR geni indüksiyonu, birçok durumda hastalık gelişimi ve direnci ile ilişkilidir. PR genleri yukarı regüle edildiğinde hastalık direncinin arttığı ortaya konmuştur (Seo, 2010). PR genlerinin alt kümesi (PR1, PR2 ve PR5) hastalık gelişimi haricinde düşük sıcaklık, yüksek tuzluluk ve kuraklık tarafından da indüklenebilir (Seo vd., 2009).

Chojak-Koźniewska vd. (2017) yaptığı çalışmada *Psl* ve NACI+*Psl* etkilerini incelemiştir. *Psl* ve tuz işlemi yapıldıktan hemen sonra (T0), iki gün sonra (T2), beş gün sonra (T5) üç zaman noktasından gen ekspresyonu ifadelerine bakılmıştır. *Psl*'deki PR-1 gen ekspresyonu T5' te kontrolden 2.8 kat daha fazla arttığı görülmüştür. 100 mM NaCl

ile ön işleme tabi tutulmuş NaCl+*PsI* grubundaki bitkilerde ise kombine stres altında PR1gen ifadesi aşağı regülasyonu belirlenmiştir. Yüksek düzeyde tuz stresi altındaki ve *PsI* ile enfekte olmuş bitkilerde deney boyunca devam eden NaCl işleminden kaynaklı ABA içeriği artmıştır. *PsI* tarafından tetiklenen SA aracılı savunma tepkisi artan ABA seviyesini bastırmış olabileceğinden biyotik stres toleransını destekleyemediğini ortaya koymuşlardır (Chojak-Koźniewska vd., 2017).

Abbasi vd. (2019), yaptığı araştırmada *Fusarium oxysporum* f. Sp. *lycopersici* ırk 3 (FOL) hastalığına karşı *Streptomyces* suşlarını (IC10 ve Y28) ve SA-MEJA kimyasallarını kullanmışlardır. Y28 suşu tek başına ve FOL varlığında PR-1 ifadesini uyaramıştır. Y28 tarafından PR-1'deki büyük artış, bu PGPR'ın domates bitkisinde savunma hazırlığını ortaya çıkarmak için farklı yolları aktive ettiği yönünde değerlendirilmiştir (Abbasi vd., 2019). Diğer bir çalışmada, domates fidelerinin *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* (FORL) ile enfekte olmasıyla bu patojene karşı, *P. putida* izolatu TR21/1 kullanılarak biyolojik mücadele yapılmıştır. FORL uygulanmayan gruplarda, TR21/1 tarafından uyarılan bitkilerde SA'ya yanıt veren PR-1 geninin kontrol grubuna göre aşağı regüle olduğu görülmüştür. TR21/1 ile muamele edilmiş olan domates kökleri FORL patojeni ile enfekte edildiğinde ise PR-1 geninin yukarı regüle olduğu tespit edilmiştir. Bu doğrultuda SAR'ın SA'ya yanıt veren genlerin birikimini içerdiğini ancak ISR'nin bu genlerin birikimini içermediğini göstermiştir (Aydemir vd., 2022).

Belirli patojenlere karşı sistemik direnci indükleyen PGPR; *Pseudomonas fluorescens* WCS417r ile ilgili çalışmalarda, WCS417r'nin bakteriyel NahG genini eksprese eden *Arabidopsis* üzerinde direnci indüklediğini ancak WCS417r tarafından tetiklenen ISR gösteren bitkilerde PR proteinlerinin aktive edilmediğini göstermiştir. WCS417r tarafından indüklenen sistemik direncin, etilen ve jasmonata yanıt vermeyi gerektirdiğini bildirmişlerdir (Pieterse vd., 1996)

Seo vd. (2008), yaptığı çalışmada, çeşitli abiyotik streslerin ve büyüme hormonlarının bir grup *Arabidopsis* 'te PR geninin ifadesi üzerindeki etkilerini sistematik olarak incelemişlerdir. SA biyosentetik mutanları *sid2* ve ABA eksikliği olan *aba3-1* transkript seviyeleri RT-PCR ile analiz edilmiştir. PR-1, PR-2 ve PR-5'in ifadesinin kuraklıkla indüklenmesine karşı *sid2* ve *aba3-1* de PR-1 transkript seviyesi çok düşüktü ve bu mutantların kuraklıktan etkilenme düzeyinin önemsiz olduğunu tespit etmişlerdir.

Bu sonuçlar PR-1'in ekspresyonunun SA gerektirdiği ve kuraklıkla indüklenmesi SA ve ABA'ya bağlı olduğunu göstermiştir (Seo vd., 2008).

LOX proteinleri ve metabolitlerinin, çeşitli stresler sırasında bitki savunma yanıtlarında yer aldığı gösterilmiştir (Siedow, 1991; Porta ve Rocha-Sosa, 2002; Liavonchanka ve Feussner, 2006). Lipoksijenazlar (LOX'ler), yağ asitlerinin hidroperoksit türevlerine oksijenlenmesini katalize eder (Schaller, 2000). Ayrıca jasmonik asit, metil jasmonik asit ve travmatin gibi oksilipinlere ayrışmaktadırlar (Blée, 2002). Oksilipinlerin gelişme, yaşlanma, tat bileşiklerinin oluşumu ve abiyotik ve biyotik streslere karşı savunma yanıtlarında önemli bir rol oynadığı bildirilmektedir (Williams vd., 2000; Ye vd., 2000; Vellosillo vd., 2007; Yang vd., 2012).

Song vd. (2013), yaptığı çalışmada, hem bakteriyel köşeli yaprak lekesi patojeni *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* hem de *Myzus persicae* (yaprak biti)' ne karşı uçucu organik bileşik (VOC) aracılı indüklenmiş direncin etkinliğini araştırmışlardır. Yaprak biti istilasının, 3-pentanol ve 2-butanon tedavilerine bağlı olarak, jasmonik asit sinyalleme ile ilgili gen CsLOX1'in ekspresyonunu ortaya çıkardığını, ancak SA sinyalleme ile ilgili genlerin ekspresyonunu değiştirmediğini belirtmişlerdir. Normalde, sokucu-emici ağız parçalarına sahip böcekler, çiğneyen böceklerden daha fazla SA ile ilişkili savunma genlerinin (PR genleri gibi) ekspresyonunu tetikler ve bu genler, JA ile ilişkili savunma genlerinin ekspresyonunu indükler. Ancak 3-pentanol veya 2-butanon ile ön muamele ile indüklenen SA ve JA sinyalleri arasındaki çapraz ilişki, CsLOX1'in artan ifadesi ile gösterildiği gibi JA sinyal yolunun indüklenmesine yol açabileceğini ifade etmişlerdir (Song ve Ryu, 2013a).

Hashemi vd. (2020), CsWRKY20, CsLecRK6.1, PR3, PR1-1a ve LOX1 genlerinin gen ekspresyonu ifadelerini incelemişlerdir. *Pytophythora melonis*'in hıyar ile inokulasyonundan sonra bu genlerin ekspresyonuna bakmışlardır. Dirençli (Ramezz), orta düzeyde dirençli (Baby) ve yüksek duyarlılık (Mini 6-23 ve Extrem) gösteren dört hıyar genotipi kullanmışlardır LOX-1 geninde dört hıyar genotipinde de yukarı yönlü regülasyon görülmüştür. Fakat dirençli Ramezz ve orta derecede dirençli Baby, yüksek duyarlı genotipler Mini 6-23 ve Extrem'e göre LOX-1 geninde çok daha fazla yukarı yönlü regülasyon görülmüştür. Ayrıca Ramez ve Bayb'deki LOX-1 geni ekspresyonu kontrole göre ise sırasıyla 11,81 ve 8,36 kat yukarı doğru artış tespit edilmiştir. (Hashemi vd., 2020a).

Ahmad vd (2019)'nin yaptığı çalışmada, mısırdaki kuraklık stresi altında iki farklı *Pseudomonas* suşunun performanslarının incelemeyi amaçlamışlardır. Bitkiler, *P. putida* KT2440 (Pp) ve *P. fluorescens* (Pf1) ile aşılanmış, ardından kuraklık stresinin uygulanmasından sonraki 0, 3. ve 6. günlerde örnekleme yapılmıştır. Kuraklık uygulamasının 6. gününde alınan örneklerde LOX1, LOX3, LOX5 ve LOX6 gibi LOX yolu, seçili PGPR suşlarının kuraklıkla beraber aşağı regüle edilmiştir. Ayrıca Pf1 ve Pp'nin kuraklık stresi koşulları altında reaktif oksijen türlerinin temizlenmesindeki rolünü göstermiştir (Ahmad vd., 2019) .

Yakın bir zamanda, ABA'dan bağımsız üyeleri de dahil olmak üzere SnRK2'lerin rolünü belirlemeye yönelik son derece kapsamlı bir deney, Fujii vd (2010), tarafından yapılmıştır. 10 SnRK2 geninin tamamında mutasyon taşıyan *Arabidopsis* dekaplet mutantlarını, SnRK2.1/4/5/7/8/9/10'da kusurlu mutantları ve ayrıca dörtlü SnRK2.1/4/5/10 ve beşli Snrk2.1'i tanımlamış ve karakterize edilmiştir. Sonuçlar tüm SnRK2'lerin ozmotik strese karşı bitki tepkisinde önemli olduğunu göstermektedir. Snrk2.2/3/6, ozmotik stres kaynaklı gen ekspresyonu açısından SnRK2.1/4/5/7/8/9/10'dan daha fazla etkilenmiştir. ABA tarafından aktive edilmeyen SnRK2.1/4/5/9/10'dan yoksun bitkiler, ABA'nın indüklediği prolin birikimi açısından ABA'ya karşı duyarlılığı arttırmıştır (Fujii vd., 2011).

Hıyarda 1 CsSnRK1, 10 CsSnRK2 ve 19 CsSnRK3 olmak üzere 30 gen tanımlanmıştır. NCBI'nin Kısa Okuma Arşivi (SRA) veri tabanından alınan RNA dizileme verilerine dayanarak, altı dokudaki CsSnRK genlerinin ekspresyon modelleri araştırılmıştır. Kuraklık stresi uygulanan bitkilerde CsSnRK genlerinin çoğunun bu strese yanıt verdiğini göstermektedir. Özellikle PEG uygulamasının yaprak dokularında SnRK2.5 gen ifadesinde artış gösterdiği tespit edilmiştir (Luo vd., 2022a).

Serin/treonin fosfatase tip 2C'nin (PP2C) bitki su kaybına nasıl tepki verdiği belirsizliğini anlamak için yapılan çalışmada ABA'yı tespit etmek için saksıda kışkık buğday (*Triticum aestivum* L.)' da bir dizi bağıl toprak nemi %85 (iyi sulanmış), %65 (orta derecede stres), %45 (şiddetli stres) düzeylerinde uygulama yapılmıştır. Sonuçlar, sürekli su kaybının ABA seviyelerinde tutarlı bir artışa yol açtığını ve PP2C'lerin mRNA ekspresyon seviyelerinin bitki su durumuna bağlı olduğunu göstermiştir. Bu sonuçlar ayrıca ABF, SnRK2.4 ve SnRK2.5'in ifadeleriyle de doğrulanmıştır (Song ve Ryu, 2013b).

Biyokimyasal çalışmalar, etilenin, ACC sentaz (ACS) tarafından 1-aminosiklopropan-1-karboksilata (ACC) dönüştürülen ve ardından ACC oksidaz (ACO) tarafından etilene oksitlenen S-adenosil metiyoninden (S-AdoMet, SAM) iki aşamalı bir işlemle sentezlendiğini göstermiştir (Yang ve Hoffman, 1984). Genel olarak, ACS'nin bazal seviye aktivitesi, önemli miktarda etilen üretmeyen dokularda çok düşüktür. Stres kaynaklı etilen üretimi, hücrel ACS aktivitesinde hızlı bir artış ile ilişkilidir. Aksine, ACO aktivitesi çoğu vejetatif dokuda yapısal olarak mevcuttur. Bu nedenle ACS, hız sınırlayıcı enzimdir ve stres kaynaklı etilen üretiminde ana düzenleyici adımdır (Fa Yang ve Hoffman, 1984; Kende, 1993; McKeon vd., 1995; Bleecker ve Kende, 2000; K. L. C. Wang vd., 2002; Chae vd., 2003).

Young vd. (2004), etilen biyosentezinin ilk basamağını etkileyen ACC sentaz (ACS) mutantları mısırdan izole edilerek yaprak fonksiyonuna etkilerini incelemiştir. ACC sentazını kodlayan üç gen genden ZmACS6 transkript birikiminin seviyesinin, ZmACS2 veya ZmACS7'den daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Bu, ZmACS6'nın yapraklarda üretilen etilen miktarından sorumlu olabileceğini ve ACS ekspresyonunun transkripsiyon sonrası düzenlemeye tabi olabileceğini öne sürmektedir. Bu veriler, ZmACS6 ekspresyonu kaybının, mısır yapraklarının etilen üretme yeteneğinde ZmACS2 ekspresyonu kaybına göre daha büyük bir azalmaya yol açtığını göstermektedir. ZmACS6 ekspresyonunun azalması, normal büyüme koşulları altında yaprak yaşlanmasının gecikmesine neden olmuş ve kuraklığın neden olduğu yaşlanmayı inhibe etmiştir (Young vd., 2004).

Diğer bir çalışmada ise abiyotik stres koşulları altında endojen ACS11 ekspresyon modellerini değerlendirmek için *Arabidopsis thaliana* bitkilerinde abiyotik strese tabi tutulmuş ve ACS11 ekspresyonu RT-PCR ile ölçülmüştür. ACS11 ekspresyonu tuzluluk, aşırı su ve soğuk gibi abiyotik streslere yanıt olarak yukarı doğru düzenlenmiştir, ancak kuraklıkta bu durum söz konusu olmamıştır. Stres altında ACS11'in aşırı ekspresyonunun, bitkinin büyüme ve gelişimini olumsuz yönde etkileyen stres hormonu etilen üretiminin artmasına neden olmaktadır (Eun vd., 2019).

Brassinosteroidlerin (BR) hıyarda (*Cucumis sativus* L.) abiyotik streslerden, tuzluluğa, polietilen glikol (PEG) ile oluşturulan kuraklık ve düşük sıcaklığa karşı direnç üzerindeki etkileri ve potansiyel mekanizmaları araştırılmıştır. Tuz, PEG ve soğuk stresleri altında, ACC sentaz1 (CSACS1), ACC sentaz2 (CSACS2), ACC sentaz3

(CSACS3) ve etilen biyosentezi genleri; 1-aminosiklopropan-1-karboksilat oksidaz1 (CSACO1) 1-aminosiklopropan-1-karboksilat oksidaz2 (CSACO2) ve CSAOX, BL (brassinolid) uygulanan gruplarda gen ekspresyon seviyelerinin kontrole göre arttığı tespit edilmiştir (Wei vd., 2015).





3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Test Bitkisi

Bu çalışmada ülkemizde yaygın olarak üretimi yapılan Gordion F₁ (Seminis) (*Cucumis sativus*) cv hibrit sofralık çeşit test bitkisi olarak kullanılmıştır.

3.1.2 Test Patojeni-Kuraklık Stresi

Çalışmalarımızda, laboratuvar stoklarımızda bulunan ve virülensliğinin yüksek olduğu bilinen “French Collection of Plant Associated Bacteria” (CFBP) menşeyli *Pseudomonas syringae* pv. *lacrymans* 2262 izolatu (*PsI*) test patojen olarak kullanılmıştır.

Kuraklık stresinin oluşturulması için etilen oksidin hidrofilik polimeri olan; Polietilen Glikol 6000 (HO-(C₂H₄O)-OH - PEG) (TEKKİM-Polietilen Glikol 6000) kullanılmıştır.

3.1.3 Endofit Bakteriler (EB)

Çalışmada kullanılan endofit bakteriler, önceki çalışmalarda etkinliği belirlenmiş ve YYÜ Ziraat Fakültesi Bitki Koruma laboratuvarı stoklarında mevcut olan izolatlar arasından seçilmiştir. Çalışmada seçilen izolatlar ile ilgili bilgiler kodları Çizelge 3.1’de verilmiştir (Babier, 2020; Olur, 2021). Referans izolatlar olarak da Shamil VALİDOV’dan (Kazan State Agriculture University, Rusya) temin edilen WCS365, PS17 ve BS193 izolatları kullanılmıştır (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1 Çalışmada etkisi araştırılan EB izolatları

	Bakteri Kodu	İzole edilen bitki dokusu	HR	Gram reaksiyon	Fosfataz (mm)	Siderefor (mm)	IAA (ppm)	ACC (0-3)
1	G115K1T	Kök	-	(-)	+++*	3	TE**	-
2	G116S2	Sürgün	-	(+)	+	1.25	TE	-
3	G120S2	Sürgün	-	(-)	-	1.25	TE	-
4	T12K1	Kök	-	(-)	+	1.1	TE	-
5	T14K1	Kök	-	(-)	+	2	TE	-
6	T16K1	Kök	-	(-)	++	3.1	TE	-
7	T18K2	Kök	-	(-)	+	4.5	TE	-
8	T1K2	Kök	-	(-)	+	4.5	TE	-
9	T25Y2	Yaprak	-	(-)	++	3	TE	-
10	T26Y1	Yaprak	-	(-)	+	2.5	TE	-
11	T2K2	Kök	-	(-)	+	1	TE	-
12	V14G3	Sürgün	-	(+)	-	3	9.09	3
13	V27Y3	Yaprak	-	(+)	+	2	3.26	-
14	V30Y3	Yaprak	-	(+)	+	1.5	6.91	3
15	V31Y4	Yaprak	-	(-)	-	2.25	25.03	3
16	V32Y2	Yaprak	-	(+)	-	5.88	2.62	-
17	V33K1	Kök	-	(-)	+	1.75	14.32	1
18	V33K2	Kök	-	(-)	+++	1.50	7.68	-
19	V36K1	Kök	-	(+)	++	1.25	1.21	-
20	V40K2	Kök	-	(-)	-	7	1.38	3

*+: zayıf gelişme, ++: orta düzey gelişme, +++: güçlü gelişme

**TE: Tespit Edilmemiştir

3.1.4 Bakteriler için Kullanılan Besi Yerleri

EB'lerin ve *PsI*'nin çoğaltılması ve in vitro biyokontrol etki testlerinde King's B besi ortamı (KB) (pepton 20 g, K₂HPO₄ 1.5 g, MgSO₄.7H₂O 1.5 g, gliserol 10 ml, agar 16 g) (King vd., 1954) ve Nutrient Brouth Agar (NBA) besi ortamı (nutrient broth 16 g, agar 8 g) (Lelliott ve Stead, 1987) kullanılmıştır. *PsI*'nin bitkide popülasyon takibinin yapılabilmesi için KBZ besi ortamı kullanılmıştır (Akköprü ve Özaktan, 2018). KBZ besi yerinin hazırlanışı aşağıda maddeler halinde verilmiştir.

Birinci solüsyon: distile su 916 ml, pepton 20 g, K_2HPO_4 1.5 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.5 g, Gliserol (%100) 15 ml, agar 15g, NaOH 1 N ile pH 7.5'e ayarlanmıştır. 2. solüsyon: Borik Asit 1.5 g 10 ml distile su içinde çözündürülmüştür. 3. solüsyon: Cephalexine 16 ml içinde (160 mg) Triphenyltetrazolium chloride 1.4 ml içinde (1.4 mg) Cycloheximide 1 ml içinde (100 mg), Pararosanilin 40 ml içinde (18 mg) karıştırılarak 1. ve 2. solüsyonlar elde edilmiş ve bakteri filitreleri ile sterilize edilmiştir. 1. ve 2. solüsyon ayrı ayrı otoklavda sterilize edildikten sonra karıştırılmış ve 50 °C'ye kadar soğutulduktan sonra 3. solüsyon ilave edilerek petrilere dökülmüştür.

3.1.5 Bitki Yetiştirme Ortamları

Çalışmalar, Van YYÜ Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü, Bakteriyoloji Laboratuvarı ve iklim odalarında gerçekleştirilmiştir. Çalışma süresince bitkiler; 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık fotoperiyot, $24 \pm 2^\circ C$ sıcaklık ve %60-65 neme sahip iklim odası koşullarında yetiştirilmiştir. İklim odası koşulları (HTC-1 marka) sıcaklık ve nem ölçer ile kontrol edilmiştir.

Çalışmanın farklı aşamalarında substrat ve hidroponik kültür ortamları kullanılmıştır. Kullanılan kültür ortamı özellikleri ve kullanım aşamaları maddeler halinde aşağıda sıralanmıştır.

i) Substrat kültür ortamı: Bu kültür ortamı 2:1 oranında steril torf ve perlitten oluşmuştur. Yetiştiricilik süresince bitkilerin ihtiyaç duyacakları besin Hoagland çözeltisinin (A besini: N (%10,3), NH_4-N (%1,6), NO_3-N (%8,7), K_2O (%7,5), Ca (%8,6), Fe (%0,3) B besini: N (%2,1), NO_3-N (%2,1), P_2O_5 (%6,4), K_2O (%11,6), Mg (%1,6), Mn (%0,1), Zn (%0,1), B (%0,03), Cu (%0,003), Mo (%0,004)) düzenli aralıklarla uygulanmasıyla sağlanmıştır.

Bu ortam çalışmada kullanılan fidelerin geliştirilmesinde ve EB'lerin seçim çalışmalarında kullanılmıştır. Tohumların iklim odasında viyoller içinde çimlendirilmesi ve kotiledon yaprakların oluşumuna kadar geçen sürede fideler bu ortamda tutulmuştur. EB'lerin seçim çalışmalarında ise 300 ml hacimdeki plastik saksılar kullanılarak yetiştirme ortamı oluşturulmuştur.

ii) Hidroponik kültür ortamı: Fidelerin elde edilmesinden sonra çalışmadaki stres faktörü olan kuraklık ortamının oluşturulması amacıyla kullanılmıştır. İstenilen seviyeye

gelen hıyar bitkileri üzerinde çalışmalar hidroponik ortamda (HO) yapılmıştır. Hidroponik ortamda bitki kökleri için gerekli oksijen seviyesi Resun marka LP-60 model 0.037 Mpa özellikte akvaryum hava pompası ile sağlanmıştır. Bitkileri yetiştirmek için 5lt'lik küvetler kullanılmıştır. Bitkilerin gelişimi ve PEG uygulaması için besin solüsyonu çizelge 3.2 de belirtilen makro ve mikro elementler ile hazırlanmıştır (Şekil 3.1). Her bir makro element 1lt su için hazırlanmış mikro elementler ise hepsi 1 litre suya tamamlanarak hazırlanmıştır. Saf suya kimyasallar ilave edildikten sonra pH metre (Hanna marka Hı 2020 Edge model -2.000- +16.000 ölçüm aralığına sahip ± 0.002) yardımı ile 5.8 pH'e denk gelecek şekilde ayarlaması yapılmıştır (Şekil 3.2). Hazırlanan besin çözeltisi her bir küvete eşit olacak şekilde boşaltılmıştır (Şekil 3.3). Fidelerin dik bir şekilde durabilmesi için eşit mesafeli delikleri bulunan plastik tablalalar küvetler üzerine yerleştirilmiştir. Hidroponik ortama şaşırtılan bitkilerin 3 gün hidroponik ortama adaptasyon sağlaması beklenmiştir. Ardından %3-5-7 PEG dozları içeren tekrar besin çözeltisi hazırlanmıştır. Küvetlerden eski çözelti boşaltılarak PEG eklenen yeni besin çözeltisi aktarılarak bitkiler kuraklığa maruz bırakılmıştır. Besin çözeltisi miktarı her hafta kontrol edilerek bitkilerin tükettiği kadar çözelti eklemesi yapılmıştır.

Çizelge 3.2 Hidroponik ortam için kullanılan makro ve mikro elementler

Makro Besin Solüsyonu (g\L)		Mikro Besin Solüsyonu (g\L)	
KNO ₃	101.1 g	H ₃ BO ₃	2.8 g
KH ₂ PO ₄	136.1 g	MnCl ₂ .4H ₂ O	1.8 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	246.5 g	CuSO ₄ .5H ₂ O	0.1 g
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	236.1 g	NaMoO ₄	0.025 g
		ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.2 g



Şekil 3.1 Hidroponik ortam için hazırlanan a) Besin solüsyonları b) Besin solüsyonlarının ml biriminden ölçülmesi



Şekil 3.2 Hidroponik ortam için a) Besin solüsyonlarının steril su içinde karıştırılarak hazırlanması b) Besin elementleri karıştırıldıktan sonra Ph 5,8'e ayarlanması



Şekil 3.3 Hazırlanan makro ve mikro besin çözeltisinin a) Her kaba aynı ölçüde olacak şekilde aktarılması b) Bitkilerin yerleştirilmesi

3.2 Yöntem

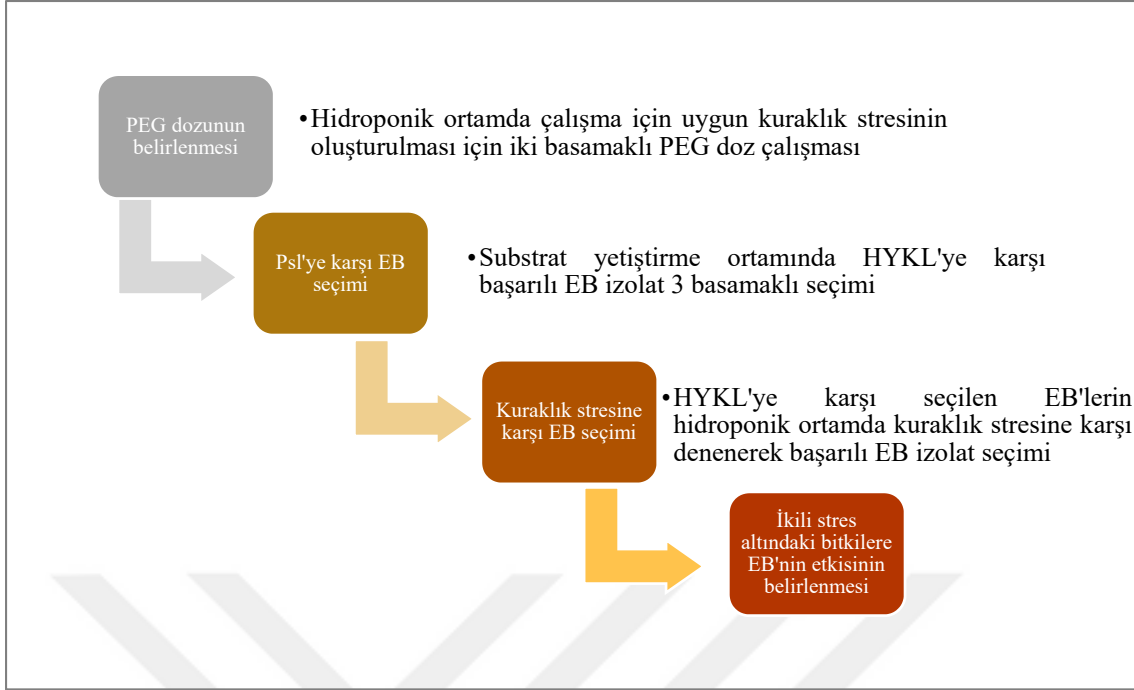
Çalışma genel olarak dört ana bölümden oluşmaktadır. Kuraklık için uygun PEG dozunun ve etkili EB izolatının belirlenmesi için hidroponik ve substrat yetiştirme ortamlarında bir dizi çalışma yürütülmüştür. Daha sonra seçilen EB'nin ikili stres altındaki bitkide etkinliği araştırılmıştır.

İlk aşamada; kuraklık stresi ön çalışmalarında PEG dozu %3, 5, 7 olarak denenmiştir. Alınan veriler doğrultusunda uygun dozun belirlenmesi için tekrardan yeni PEG doz aralıkları ile çalışmalar yapılmıştır.

Çalışmanın ikinci aşamasında; Çizelge 3.1'de belirtilen EB izolatları hastalığa karşı substrat yetiştirme ortamında etkinliği bakımından taranmış ve ümitvar olan izolatlar sonraki aşamalar için seçilmiştir. İki defa tekrarlanan denemeler sonucu EB izolat sayısı 8'e düşürülmüştür. Bu EB izolatları tekrar sınanmış, hastalık şiddeti ve bitki gelişim parametrelerine göre başarı sıralaması oluşturulmuştur.

Üçüncü aşamada ise; en başarılı 4 EB izolatı hidroponik ortamda belirlenen PEG dozu uygulanarak oluşturulmuş kuraklık stresinde etkinlikleri denenmiştir. Denemeler sonucunda hem hastalık için hem de kuraklık için başarılı EB izolatı belirlenmiştir.

Dördüncü ve son aşamada ise; belirlenen uygun kuraklık stresi ve *Psl*'nin oluşturduğu ikili stresi altında bitkilerde EB'lerin etkinlikleri morfolojik, fizyolojik ve moleküler olarak incelenmiştir. Ayrıca uygulamaların patojen popülasyonuna etkisi belirlenmiştir (Şekil 3.4).



Şekil 3.4 Çalışmanın genel akışı içinde işlem basamakları

3.2.1 Uygun Kuraklık Stres Düzeyinin Belirlenmesi

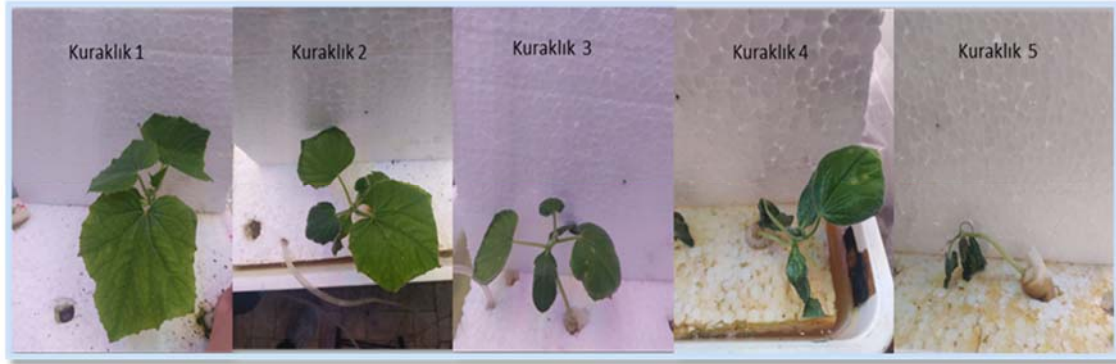
Kuraklık stresinin oluşturulmasında PEG (6000) kullanılmıştır. Çalışmanın amacı doğrultusunda uygun kuraklık dozunun belirlenmesi için iki basamaklı bir dizi çalışma yürütülmüştür. Her iki aşamada bölüm 3.1.5'e göre yapılmıştır.

İlk aşamada substrat ortamda hıyar bitkileri çimlendirilmiştir. Kotiledon yapraklar geliştikten sonra bitkiler hidroponik ortama aktarılmıştır. Hidroponik ortamda %3-5-7 dozları uygulanarak PEG ile bitkiler kuraklığa maruz bırakılmıştır. Bu uygulamadan sonra belirli aralıklarla bitkilerdeki kuraklık belirtileri gözlenerek Çizelge 3.3'te belirtilen 0-5 skalası ile değerlendirilmiştir (Şekil 3.5). Elde edilen skala değerleri kuraklık şiddeti eşitlik (3.1) yardımıyla yüzde (%) değerlere dönüştürülmüştür. İkinci aşamada ise seçilen aralıkta üç farklı doz oluşturularak tekrar denenmiştir. Bu çalışmalar sonucunda çalışma için uygun kuraklık düzeyi tespit edilmiştir.

Çizelge 3.3 Kuraklık stresi altında bitkilerde oluşan belirtileri değerlendirmek için kullanılan 0-5 kuraklık skalası (Kuşvuran, 2010)

Skala değeri	Açıklama
0	Hiç etkilene yok (kontrol bitkileri)
1	Büyümede yavaşlama
2	Alt yapraklarda solgunluk
3	Üst yapraklarda kıvrılma (kapanma) ve solgunluk
4	Yapraklarda şiddetli solgunluk ve sararma, yaprak kenarlarında kuruma başlangıcı
5	Bitkide solma ve yapraklarda kuruma

$$\text{Kuraklık Şiddeti} = \frac{\sum (\text{skala değeri} \times \text{O skala değerindeki yaprak sayısı})}{\text{Bitkideki toplam yaprak sayısı} \times \text{En yüksek skala değeri}} \times 100 \quad (3.1)$$



Şekil 3.5 %3, 5 ve 7 PEG kuraklık dozu uygulanması sonucu hıyar bitkilerindeki kuraklık belirtileri

3.2.2 EB Seçimi

3.2.2.1 *Psl*'ye Karşı Etkili EB İzolatlarının Seçimi

EB izolatları arasından HKYL hastalığını baskılamada başarılı izolatları seçmek için substrat ortamında bir dizi çalışma yürütülmüştür. Bu amaçla ilk aşamada viyolde substrat kültür ortamı kurularak Çizelge 3.1'de belirlenen 23 EB izolatları hıyar bitkileri üzerinde bağımsız denemeler ile sınanmıştır. Bu çalışmalarda Endofit bakteriler tohum kaplama ve içirme yöntemi ile uygulanmıştır. Denemeler ile hastalık şiddeti ve bitki gelişim parametrelerine göre başarılı izolatlar seçilmiştir. İkinci aşamada ise HKYL hastalığına karşı en etkili izolatın seçimi için sınırlı sayıda bakteri ile saksı denemesi kurulmuştur. Bu çalışmalar bölüm 3.1.5'te belirtildiği şekilde hazırlanan yetiştirme ortamı ile doldurulmuş olan 300 ml'lik plastik saksılar ile yürütülmüştür.

EB Uygulaması

Endofit bakteriler tohum kaplama (i) ve içirme yöntemi (ii) olmak üzere 2 farklı şekilde uygulanmıştır. PGPR izolatları 5-7 cm'lik petrilerdeki KB besiyerine ekilerek 48 saat 24°C'de geliştirilmiştir (Şekil 3.7). Bakteri kültürleri %1.5'luk CMC (Karboksi Metil Selüloz) ile süspanse edilmiştir (Şekil 3.8). Hıyar tohumları musluk suyu yardımıyla yıkanarak koruyucu tohum ilaçlarından arındırılmıştır. Steril bir beher içine alınan tohumların üzeri hazırlanan CMC bakteri süspansiyonu ile kaplanmıştır (Şekil 3.9). Daha sonra 100 ml hacimli beherler içinde bulunan tohumlar 30 dakika boyunca çalkalayıcıda karıştırılmış ve süre sonunda kurutma kâğıtlarına aktarılmıştır. Bakteri ile kaplanmış tohumlar 2:1 steril torfla doldurulmuş olan viyollere ekilmiştir. Kotiledon yapraklar açıldıktan sonra fide başına 20 ml gelecek şekilde besin solüsyonu verilmiştir. İkinci uygulama ise; 12. günde EB kültürleri steril su ile süspanse edilerek yaklaşık 10^8 CFU/ml konsantrasyonda ayarlanmıştır. Hazırlanan süspansiyon içirme yöntemiyle yetiştirme ortamının hacmine göre viyolde 10 ml/viyol veya 15 ml/saksı olacak şekilde fidelere uygulanmıştır (Şekil 3.10).

Saksı denemelerinde yalnızca içirme yöntemi kullanılmış ve 1 hafta ara ile iki defa uygulanmıştır. İkinci EB uygulamasından 2 gün sonra *PsI* bitkilere pülverize edilerek uygulanmıştır. Denemeler sonucunda hastalık şiddetinin hesaplanmasına ek olarak; kök yaş, kuru ağırlığı, gövde boyu, SPAD (Konica marka SPAD-502) ile klorofil ölçümü yapılmıştır. Bu ölçümlerin hesaplamaları SPSS Duncan çoklu karşılaştırma testine tabi tutulmuştur. Bu çalışmalar sonucunda en başarılı EB izolatları kuraklık stresine karşı denenmek üzere sonraki aşamalar için seçilmiştir. Bu amaçla yürütülen çalışmaların aşamaları ve açıklamaları Şekil 3.6'da uygulama grupları ise Çizelge 3.4'te gösterilmiştir. Bu çalışmalar sırasında bitkilerin ihtiyaç duyduğu besin Hoagland solüsyonu ile belirli aralıklar ile sağlanmıştır.

Çizelge 3.4 EB'ler için *PsI* uygulaması

Grup Adı	Açıklama
NK	EB ve <i>PsI</i> uygulanmamış bitki
EB	Yalnızca EB uygulanmış bitkiler.
<i>PsI</i>	Yalnızca <i>PsI</i> uygulanmış bitkiler.
EB+ <i>PsI</i>	EB+ <i>PsI</i> uygulanmış bitkiler.



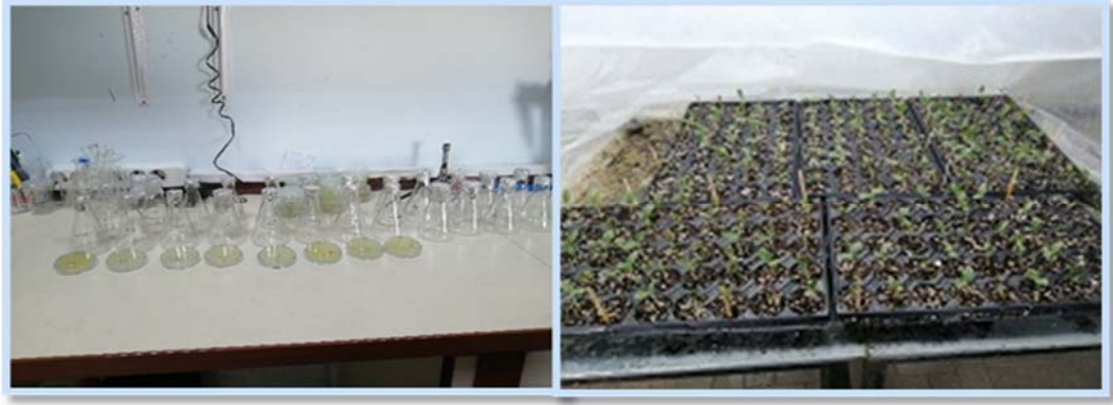
Şekil 3.6 HKYL hastalık şiddeti üzerine etkili EB seçim denemesi kronolojik işlem basamakları



Şekil 3.7 Çalışmada kullanılacak endofit bakteri izolatları a) Çizelge 1.1 de verilen stok EB izolatlar b) Endofit bakteri izolatlarının petri kabına ekilmesi



Şekil 3.8 Endofit bakterilerin tohum kaplama yöntemi ile uygulanması a) Çalışmada kullanılan tohumlar b) Hazırlanan %1.5'luk CMC (Karboksil Metil Selüloz) ile EB süspansiyonu içerisine tohumlar



Şekil 3.9 EB'lerin uygulaması a) EB izolatlarının 24 saatlik kültürlerinden hazırlanan 10^8 CFU/ml konsantrasyonundaki süspansiyonları b) Kotiledon yaprakların çıkmasıyla birlikte ikinci EB uygulama dönemindeki fideler



Şekil 3.10 EB 10^8 CFU/ ml konsantrasyonunda içirme yöntemiyle uygulanması

***Psl* Uygulaması**

- Aşağıda fidelere *Psl* uygulama adımları maddeler halinde verilmiştir:
- $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ de muhafaza edilen *Psl* izolatı KB ortamında aktarılarak 25°C sıcaklıkta 24 saat inkübe edilmiştir.
- *Psl* alt kültüre alınarak tekrar ekim yapılmış ve 48 saat süresinde geliştirilmiştir.
- Gelişen *Psl* kolonilerinden 10^7 CFU ml^{-1} , (OD 600: 0.05) yoğunlukta süspansiyon hazırlanmış ve %0.05 tween 20 ilave edilmiştir. İkinci gerçek yaprakların oluşmaya başladığı dönemde PGPR uygulamasından 48 saat ve tohum ekiminden ise 14 gün

sonra hazırlanan patojen süspansiyonu yaprak yüzeyini kaplayacak şekilde belirlenen ölçüde püskürtme yöntemiyle uygulanmıştır (Şekil 3.11a).

- Patojen uygulanan fideler plastik kabinlere alınıp, ortamın nemi %70-80 civarında tutulmuştur (Şekil 3.11b).
- 48 saat sonra kabinlerden çıkarılan bitkiler, yaklaşık %60 oransal neme düşürülerek iklim odası koşullarında gelişmeye bırakılmıştır.
- Hiçbir uygulama yapılmayan Negatif Kontrol (NK) hıyar fideleri, sadece patojen bakteri süspansiyonu uygulanmış hıyar fideleri ise Pozitif Kontrol (PK) olarak adlandırılmıştır.



Şekil 3.11 Hıyar fidelerine *Psl* uygulamasının gerçekleştirilmesi a) Tween 20 ilaveli patojen süspansiyonu (10^7 CFU ml, OD 600: 0.05) ikinci gerçek yaprakların yüzeyini kaplayacak şekilde belirlenen ölçüde püskürtme yöntemiyle uygulanması b) *Psl* uygulanan fidelerin kabinlere yerleştirilerek ortam neminin artırılması

Hastalık Şiddetinin Belirlenmesi

Psl'nin neden olduğu hastalık şiddeti 0-6 skolasına (Çizelge 3.5) göre belirlenmiştir. Hastalık şiddeti tohum ekiminden 21. 28 ve 35. günlerinde değerlendirilmiştir.

Çizelge 3.5 *PsI* Hastalık şiddeti skalası

Skala değeri	Açıklama
0	Belirti yok
1	Leke veya yaprağın %10'undan azında hastalık belirtisi
2	Yaprağın % 11-25'inde hastalık belirtisi
3	Yaprağın % 26-50'sinde hastalık belirtisi.
4	Yaprağın % 51-70'inde hastalık belirtisi
5	Yaprağın % 71-90'ında hastalık belirtisi
6	Yaprağın % 91-100'ünde hastalık belirtisi veya ölüm

Numunelerden elde edilen skala değerleri Thousand Heuberger eşitliği (3.1) ve % hastalık şiddeti (3.2) eşitlik ile dönüştürülmüştür. Bu aşamada EB'lerin hastalık gelişimine etkisi AUDPC formülü (3.3) yardımıyla belirlenmiştir. Bu amaçla düzenli aralıklar ile yapılan hastalık şiddeti verilerlerinden yararlanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Hastalık Şiddeti} = \frac{\sum (\text{skala değeri} \times \text{O skala değerindeki yaprak sayısı})}{\text{Bitkideki toplam yaprak sayısı} \times \text{En yüksek skala değeri}} \times 100 \quad (3.2)$$

$$\text{AUDPC} = \sum_{i=1}^{n-1} \frac{y_i + y_{i+1}}{2} \times (t_{i+1} - t_i) \quad (3.3)$$

i: günündeki değerlendirmede kaydedilen hastalık şiddeti;

($t_{i+1} - t_i$): ardışık iki ölçüm arasındaki zaman

Bitki Gelişim Parametrelerinin Belirlenmesi

Bitkisel ölçüm parametreleri için hasat edilen hıyar bitkilerinde yeşil aksam yaş ve kuru ağırlığı, kök yaş ve kuru ağırlığı, gövde uzunluğu ve yaprak alanı ölçümleri yapılarak veriler kaydedilmiştir. Yaprak alanı ölçümleri, “Easy Leaf Area®” uygulaması kullanılarak yapılmıştır. Gövde uzunluğu ölçümü, bitkilerin kök boğazının hemen üzerinden bir cetvel ile ölçülerek cm olarak kaydedilmiştir. Hasat edilen bitkilerinin kökleri yıkanarak topraktan arındırılmıştır. Köklerin ağırlıkları hassas terazide (SHIMADZU, AUX320) tartılarak yaş ağırlıkları ölçülmüştür (Şekil 3.12). Yaş ağırlıkları belirlendikten sonra sürgün ve kökler etüvde 60°C'e sıcaklıkta 48 saat süresince kurutulmuştur. Bu işlemin ardından bitkiler tartılarak kuru ağırlıkları kaydedilmiştir (Şekil 3.13).



Şekil 3.12 *PsI* viyol denemesinde a) hasada uygun hıyar bitkileri b) hıyar bitkilerinin hasada hazırlanması c) hıyar bitkisinin gövdenin bittiği yerden kesilerek tartıma hazırlanması



Şekil 3.13 Bitkilerin sürgün kuru ağırlığının belirlenmesi a) Sürgünlerin 60°C’de 48 saat kurutulması b) Sabit etüv ağırlığına ulaşmış sürgünlerin kuru ağırlıklarının hassas terazide belirlenmesi

3.2.3 Belirlenmiş Olan PEG Kuraklık Seviyesinde Seçilen EB İzolatlarının Sınanması

Çalışmanın 3.2.2 bölümünde HKYL hastalığına karşı en etkin EB izolatları belirlenmiştir. Bu izolatların belirlenen kuraklık stresine karşı etkinliklerinin belirlenmesi için iki aşamalı bir çalışma yürütülmüştür. Bu amaçla; substrat kültüründe geliştirilen ve kotiledon yapraklar geliştiğinde içirme yöntemiyle EB ile inokule edilmiş fideler hidroponik sisteme yerleştirilmiştir. Hidroponik sistemde 3 günlük adaptasyondan sonra önceden belirlenmiş olan PEG dozu uygulanarak bitkilerde kuraklık stresi oluşturulmuştur. Denemede dört farklı uygulama grubu karşılaştırılmıştır (Çizelge 3.6).

Bu çalışmanın işlem basamakları ve akışı Şekil 3.14’te belirtilmiştir. Hidroponik ortamda uygulaması yapılan bitkiler son kuraklık şiddeti tespiti alındıktan sonra hasat edilmiştir (Şekil 3.15). Bu çalışmada bitki gelişim parametreleri ve kuraklık şiddeti ölçümlerine bakılmasının yanı sıra klorofil içeriği ve yaprak oransal su içeriğide (YOSİ) incelenmiştir.

Çizelge 3.6 Biyotik strese karşı başarılı bulunan EB’lerin kuraklık stresine karşı etkinliğinin belirlenmesine yönelik yürütülen çalışmalardaki uygulama grupları

Grup Adı	Açıklama
NK	Kuraklık (PEG) ve EB uygulanmamış bitkiler
EB	Yalnızca EB uygulanmış bitkiler
PEG	Yalnızca kuraklık (PEG) uygulanmış bitkiler
EB+PEG	EB+PEG uygulanmış bitkiler



Şekil 3.14 Kuraklık üzerine etkili EB seçim denemesi kronolojik çalışma çizelgesi



Şekil 3.15 EB uygulanmış hıyar bitkilerinin hidroponik ortamda kuraklığa maruz bırakılması

Yaprak Oransal Su İçeriğinin (YOSİ) Belirlenmesi

Kuraklık stres uygulamaları sonunda bitkilerin alttan üçüncü yapraklardan alınan örneklerin oransal su içeriklerinin hesaplanması amacıyla; yaprak taze ağırlıkları tartılmış ve dört saat saf su içinde bekletilerek turgor ağırlıkları saptanmıştır (Şekil 3.16). Ağırlık ölçümlerinden sonra yapraklar 65 °C sıcaklıkta 48 saat boyunca etüvde bekletilmiştir. Etüv işleminden sonra, hassas terazi ile tartılarak, gram cinsinden kuru ağırlık değerleri kaydedilmiştir. Eşitlik 3.5 kullanılarak yaprak oransal su içerikleri yüzde cinsinden hesaplanmıştır (Halefoglu ve Kusvuran, 2010; Kabay ve Şensoy, 2016).

$$YOS = [(T_a - K_a) / (T_{ua} - K_a)] * 100 \quad (3.5)$$

T_a: Taze Ağırlık, K_a: Kuru Ağırlık, T_u: Turgor Ağırlığı



Şekil 3.16 Hıyar bitkilerinde yaprak oransal su içeriğini belirlemek amacıyla yaprakların saf su içerisinde bekletilmesi

3.2.4 Seçilen EB İzolatının Kuraklık ve Hastalık Stresine Karşı Etkinliğinin Belirlenmesi

Çalışmanın bu aşamasında, bölüm 3.2.2 ve 3.2.3'te yapılan çalışmalar sonucunda seçilmiş olan EB izolatının 3.2.1'de belirlenen PEG dozu ile yaratılacak kuraklık stresi ve *PsI* hastalık stresinin tekli ve farklı uygulama önceliklerinin olduğu ikili kombinasyonları ile birlikte bitki gelişimine etkisi araştırılmıştır. Bu bölümde, ikili stres uygulamalarında uygulanan streslerin birbirleri üzerindeki etkileri, EB izolatının stres faktörleri üzerindeki etkinliği ve bitkiye olan etkisi incelenmiştir. Çalışma düzeneği bölüm 3.1.5'te belirtildiği gibi hazırlanmıştır. Denemedeki muamele grupları ve açıklamaları Çizelge 3.7'de verilmiştir. Yapılan bu çalışmalar hidroponik yetiştirme ortamında ve Şekil 3.17'de belirtilen iş akışı ile yürütülmüştür.

Uygulamaların bitki ve hastalık gelişimine olan etkilerinin belirlenmesi amacıyla bitki gelişim parametreleri, bitkideki fizyolojik değişiklikler biyokimyasal enzim analizleri ve ilgili genlerin ifade düzeyleri moleküler olarak belirlenmiştir. Ayrıca patojenin (*PsI*) bitkideki popülasyon dinamiği tespit edilmiştir. Bu amaçla aşağıdaki yöntemler izlenmiştir.

Çizelge 3.7 EB’lerin ikili strese maruz kalan hıyar bitkilerde fizyolojik ve morfolojik yansımaları ile *PsI* popülasyonuna etkisinin belirlendiği çalışmadaki uygulama grupları

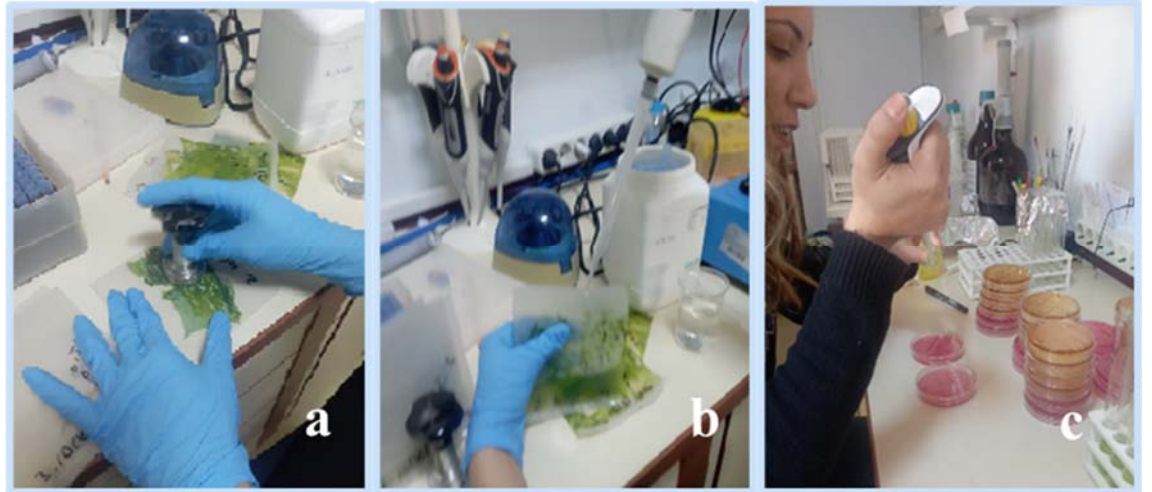
	Deneme Deseni
NK	Herhangi bir uygulama yapılmamıştır.
EB	Yalnızca EB uygulanmıştır.
<i>PsI</i>	Yalnızca <i>PsI</i> uygulaması yapılmıştır.
PEG	Yalnızca PEG yoluyla kuraklık stresi uygulanmıştır.
EB+PEG	EB uygulamasından sonra PEG uygulanmıştır.
EB+ <i>PsI</i>	EB uygulamasından sonra <i>PsI</i> uygulanmıştır.
(1) <i>PsI</i> + (2) PEG	<i>PsI</i> uygulamasından sonra PEG uygulanmıştır.
(1) PEG + (2) <i>PsI</i>	PEG uygulamasından sonra <i>PsI</i> uygulanmıştır.
EB+(1) <i>PsI</i> + (2) PEG	EB uygulamasından sonra <i>PsI</i> daha sonra PEG uygulanmıştır.
EB+ (1)PEG + (2) <i>PsI</i>	EB uygulamasından sonra PEG daha sonra <i>PsI</i> uygulanmıştır.



Şekil 3.17 EB uygulamasının ikili strese maruz kalmış bitkilere etkisinin belirlendiği çalışmanın kronolojik olarak ana iş akışı

3.2.4.1 *PsI*'nin Hıyar Yapraklarındaki Popülasyonunun İzlenmesi

Bölüm 3.2.2'ye göre kurulan hidroponik ortamdaki hıyar bitkilerine *PsI*'nin yapraklara uygulanmasından 2 saat, 24 saat, 4, 7. ve 15 gün sonra alınan örneklerde *PsI*'nin popülasyonunda zamana bağlı olarak değişim izlenmiştir. Belirlenen zamanlarda, her bir gruptan 3'er bitkinin tüm gerçek yaprakları toplanmıştır. Yapraklar tartıldıktan sonra polietilen torbalara konularak, bir el homojenizatörü yardımı ile ezilmiştir. Yaprak ağırlığının altı katı steril saf su konularak hafifçe karıştırıldıktan sonra 1-2 dakika beklenmiştir. Elde edilen bu süspansiyondan seyreltme basamakları yapılarak KBZ ortamına 20 µl damla ekimi ile eklenmiştir (Şekil 3.18). Ekimden 48-72 saat sonra koloni sayımı yapılarak yaş yapraktaki *PsI* popülasyonu belirlenmiştir.



Şekil 3.18 *PsI*'nin Hıyar Yapraklarındaki Popülasyonunun izlenmesinde uygulama basamakları a) Örneklerin ezilmesi b) Steril su eklenerek seyreltme basamaklarına hazırlanması c) Seyreltilen örneklerden 20 µl alınarak KBZ besi ortamına nokta ekim yapılması

3.2.4.2 Fotosentetik Pigment İçeriğinin Belirlenmesi

Fotosentetik pigment analizi için hasat gününde (35.gün) her bitkinin aynı yaştaki yapraklarından 0.5 g örnek alınmıştır. Bu örnekler analiz yapılmak üzere -80°'de muhafaza edilmiştir. Muhafaza edilen örnekler porselen havanda %80'lik aseton yardımı ile ekstrakte edilmiş ve santrifüjde 3000 rpm devirde 20 dakika santrifüjlenmiştir.

Ardından filtre kağıdından geçirildikten sonra aseton ile 25 ml'ye tamamlanarak seyreltilmiştir. Daha sonra 662, 645 ve 470 nm dalga boylarında spektrofotometre cihazıyla ölçümler yapılmıştır. Hesaplamalar için yapılan seyreltme dikkate alınarak Lichtenthaler ve Wellburn (1985)' e göre aşağıdaki eşitlikler kullanılarak klorofil-*a*, *b* ve karotenoid miktarları saptanmıştır (Lichtenthaler ve Wellburn, 1983).

$$\text{Toplam Klorofil Miktarı (mg/gr)} = (A_{652} \times 27.8) / g \quad (3.6)$$

$$\text{Klorofil } a \text{ (mg/gr)} = (11.75 \times A_{662}) - (2.35 - A_{662}) \quad (3.7)$$

$$\text{Klorofil } b \text{ (mg/gr)} = (18.61 \times A_{645}) - (3.96 - A_{662}) \quad (3.8)$$

$$\begin{aligned} \text{Karotenoid (mg/gr)} \\ = [(1000A_{470}) - (2.27 \times \text{klorofil } a) \\ - (81.4 \times \text{klorofil } b)] / 227 \end{aligned} \quad (3.9)$$

3.2.4.3 Katalaz (CAT) Aktivitesi

Katalaz aktivitesini belirlemek için hasat gününde (35. gün) her bitkinin aynı yaştaki yapraklarından 1 gr örnek alınmıştır. Bu örnekler analiz yapılmak üzere -80°'de muhafaza edilmiştir. Reaksiyon çözeltisi; 0.05 M fosfat tamponu (KH₂PO₄), 1.5 mM H₂O₂ 1 litre saf suda karıştırılarak hazırlanmıştır (pH: 7.0). Ekstraksiyon çözeltisi için; 0.372 gr Sodyum Edta 13.61 gr KH₂PO₄ 1 litre saf suda çözündürülmüştür (pH: 7.0). Bitki örnekleri alınarak 5ml ekstraksiyon çözeltisi ile homojenize edilmiştir. Örnekler 10 dakika boyunca 1000 devirde santrifüj edildikten sonra şeffaf kısım (süpernatant) 2 ml'lik ependorf tüplere alınmıştır. Reaksiyon çözelti 2.5 ml oranında cam kuvars içine konarak üzerine 0,2 ml süpernatant eklenmiştir. Ardından spektrofotometre 240 nm dalga boyunda 0. ve 60. saniye okumaları alınarak veriler kaydedilmiştir (Jebara vd., 2005; Güneri Bağcı, 2010).

3.2.4.4 Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi

Bitkideki SOD miktarı Nitroblue tetrazolium'un (NBT) 560 nm dalga boyunda inhibisyonu ile belirlenmektedir. Bu analiz için hasat gününde (35.gün) her bitkinin aynı yaştaki yapraklarından 1 gr örnek alınmıştır. Bu örnekler analiz yapılmak üzere -80°'de

muhafaza edilmiştir. Reaksiyon çözeltisi olarak 50 mM Na-fosfat tamponu ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}_2$), 0.1 mM Na-EDTA, 33 μM NBT, 5 μM riboflavin, 13 mM methionin karışımı kullanılmıştır (pH: 7.0). Reaksiyon çözeltisi 2.5 ml oranı ile 0.1 ml bitki ekstraktı karıştırılmıştır. Reaksiyon 25 °C’de 75 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (40 W) ışık altında 10 dakika boyunca bekletilmiştir. Kontrol çözeltisi de enzimsiz olarak karanlıkta aynı süre bekletilmiştir. Kontrol ve reaksiyon çözeltileri 560 nm’de okunmuştur. (Jebara vd., 2005; Güneri Bağcı, 2010).

3.2.4.5 Lipid Peroksidasyonunun Malondialdehit (MDA) İçeriği ile Belirlenmesi

Bitkilerde lipit peroksidasyonu, malondialdehit (MDA) içeriği olarak ifade edilmektedir. Hasat gününde (35. gün) her bitkinin aynı yaştaki yapraklardan 0.5 g yaprak örnekleri alınarak -80°’de muhafaza edilmiştir. Saklanan örnekler 10 ml %0.1’lik trikloroasetik asit (TCA) ile homojenize edildikten sonra homojenat 15000 rpm’de 5 dakika santrifüj edilmiştir (Şekil 3.29). Santrifüj edilen örneğin berrak kısmından 1 ml alınıp, üzerine 4 ml %20’lik TCA içerisinde çözülmüş %0.5’lik tiobarbiturik asit (TBA) eklenmiştir. Karışım 95°C’de 30 dakika bekletildikten sonra hızla buz banyosunda soğutulup 10000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Ardından berrak kısımdan 532 ve 600 nm dalga boyunda absorbansı belirlenmiş ve eşitlik 3.8 ile malondialdehit (MDA) içeriği belirlenmiştir (Jebara vd., 2005).

$$\text{MDA (nmol ml}^{-1}\text{)} = [(A_{532} - A_{600}) / 155000] * 106 \quad (3.10)$$

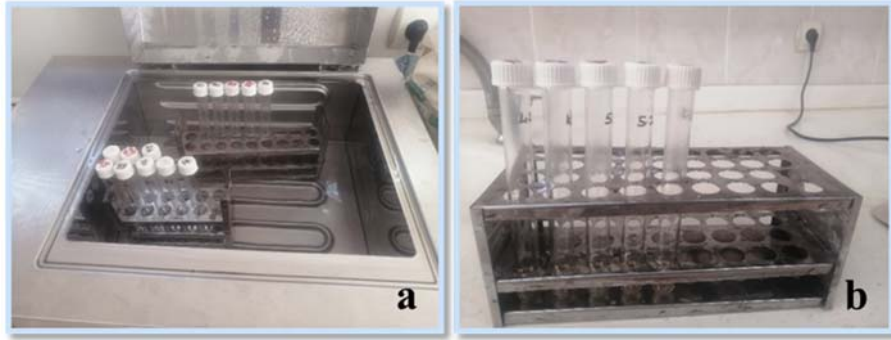
3.2.4.6 Prolin Analizi

Yöntem olarak Bates ve ark. (1973)’nın çalışması temel alınarak yapılmış ve 0.5 g yaprak dokusu %3’lük sülfosalisilik asit ile homojenize edilmiştir. Homojenize edilen örnekler santrifüjlenmiştir. Ekstraktan 2 mL alınarak üzerine 2 ml asit ninhidrin ve 2 mL glasiyal asetik asit eklenmiştir (Şekil 3.19). Daha sonra 1 saat 100°C su banyosundan sonra reaksiyonun durdurulması için örnekler 5 dakika buz banyosunda bekletilmiştir. Tüplerdeki örneklere ve standartlara 4 mL toluen ilave edilerek ve karıştırılmıştır. Üst

kısımdaki faz otomatik pipet yardımı ile alınarak, 520 nm’de absorbansları ölçülerek verilerek kaydedilmiştir. Referans olarak toluen ve standart olarak L-prolin kullanılmıştır (Şekil 3.20). Prolin konsantrasyonu kalibrasyon eğrisi yardımıyla μg prolin olarak hesaplanmıştır. Eşitlik 3.9’a göre değerler yerine konularak yaprakta bulunan prolin miktarı μM / gr taze ağırlık olarak belirlenmiştir.

$$\left[\left(\frac{\mu\text{g proline}}{\text{ml}} \times \text{ml toluene} \right) / \left(115.5 \frac{\mu\text{g}}{\mu \text{ mole}} \right) \right] / [(\text{örnek ağırlığı})/5] = \quad (3.11)$$

$\mu\text{moles} / \text{gr}$



Şekil 3.19 a) Hıyar bitkilerinde prolin analizi için ekstratların tüplere hazırlanması b) 2 ml asit ninhidrin ve 2 mL glasiyal asetik asit eklenen ekstratların 1 saat 100°C su banyosunda bekletilmesi



Şekil 3.20 a) Hıyar bitkilerinde prolin analizi için kaynayan örneklere toluen eklenmesiyle spektrofotometrede okunması b) L-prolin ile spektrofotometrede standardizasyonunun oluşturulması

3.2.4.7 Gen İfadelerinin Belirlenmesi

3.2.4.7.1 Toplam RNA izolasyonu, cDNA Sentezi ve Kullanılan Primerler

Bitki örneklerinden toplam RNA izolasyonu, RNA izolasyon kiti (Thermo Scientific GeneJET RNA izolasyon kiti) ile yapılmıştır. Toplam RNA'dan cDNA kütüphanesi cDNA sentez kiti (Hydra First Strand) kullanılarak oluşturulmuştur. Ayrıca izole edilen toplam RNA'dan olası genomik DNA kalıntılarını uzaklaştırmak için DNase kiti (Thermo Scientific) kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan primer çiftleri Çizelge 3.8'de belirtilmiştir.

Çizelge 3.8 Real Time qPCR ile hedef genlerdeki ifade düzeylerinin belirlenmesi için kullanılan Primer çiftleri

	Primer çiftleri	bp	Hedef Gen	Referanslar
1.	PR1-F 5' TGCTCAACAATATGCGAACC 3' PR1-R 5' TCATCCACCCACAACGAAC 3'	141	PR1	Chojak-Koźniewska vd., 2017
2.	SnRK2.5-F GGTGCTGGAAGTTTTGGTGT SnRK2.5-R TCGCCCCTAAAACAACCTCC	673	SnRK2.5	Luo vd., 2022a
3.	LOX-1-F CTCTTGGGTGGTGGTGTTC LOX-1-R TGGTGGGATTGAAGTTAGCC	146	LOX-1	Alizadeh vd., 2013
4.	ACS3-F CCAACGGCATCATTGAGA ACS3-R GCAAGGCAGAACATAAGTG	286	ACS3	Wei vd., 2015
5.	Actin-F TCCACGAGACTACCTACAACCTC Actin-R TTGCTCATACGGTCAGCGAT	124	Actin (Housekeeping Gen)	Hashemi vd., 2020b

Toplam RNA Ekstraksiyonu

Patojen uygulamasından sonraki 24., 72. ve 96. saatlerde her uygulama grubundan üç bitkiden örnekler alınmıştır. Alınan 100 mg örneği sıvı azot yardımı ile dondurulmuştur. Bitki dokusu sıvı azot yardımıyla havanda iyice ezilerek toz haline getirilmiş ve sıvı azot içinde soğutulan 1,5 ml lik santrifuj tüplerine aktarılmıştır. Ezilen bitki dokularının bulunduğu tüpler toplam RNA ekstraksiyon yapılınca kadar -80°C'de muhafaza edilmiştir.

Toplam RNA izolasyonu için Thermo Scientific GeneJET RNA izolasyon kiti kullanılmıştır. RNA izolasyonu, aşağıda kısaca belirtilen üretici firmanın uygulama adımları takip edilerek gerçekleştirilmiştir.

Toplam RNA İzolasyon Aşamaları:

Başlamadan önce:

Bitki RNA liziz tamponu DTT (#R0861) ile tamamlanmıştır. Ekstraksiyon için gereken her 500 µL RNA liziz tamponuna 10 µL 2 M'lık DTT eklenmiştir.

1. Bu işlemin ardından bitki RNA liziz tamponu pipet yardımıyla her bir örneğin üstüne 500 µL eklenip, 10-20 sn boyunca karıştırılmıştır (Şekil 3.21).
2. 56°C' sıcaklıkta 3 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Bu işlemten sonra 5 dk boyunca santrifüj yardımı ile karıştırılmıştır
3. Süpernatantı (genellikle 450-550 µL) toplanarak temiz bir ependorf tüpe aktararak 250 µL %96 etanol ile pipet yardımıyla karıştırılmıştır.
4. Hazırlanan karışım, toplama tüpüne yerleştirilerek saflaştırma kolonuna aktarılmıştır. Örnekler 12.000 x g'de (~11.000 rpm) 1 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Bu işlemten sonra toplama tüpünde biriken atık atılarak, kolon ve yeni toplama tüpü birleştirilmiştir.
5. Saflaştırma sütununa 700 µL yıkama tamponu eklenerek, 12.000 x g'de (~11.000 rpm) 1 dakika santrifüjlenerek atıkların biriktiği toplama tüpü atılmıştır. Arıtma kolonu temiz bir 2 mL toplama tüpüne yerleştirilmiştir.
6. Saflaştırma sütununa 500 µL yıkama tamponu 1 eklenmiştir. 12.000 x g'de (~11.000 rpm) 1 dakika santrifüjlenmiştir. Toplama tüpünde biriken atık atılarak yeniden kolon ve yeni toplama tüpü birleştirilmiştir. Adım 6 bir kez daha tekrarlanarak ve sütunu maksimum hızda $\geq 20.000 \times g$ 'de (≥ 14.000 rpm) 1 dakika boyunca yeniden santrifüjlenmiştir
7. Atık içeren toplama tüpü atılarak ve saflaştırma kolonu RNase içermeyen 1,5 mL'lik bir toplama tüpüne aktarılmıştır.
8. RNA'yı ayırtmak için, arıtma kolonu zarının merkezine 50 µL nükleaz içermeyen su eklenerek ve 12.000 x g'de (~ 11.000 rpm) 1 dakika boyunca santrifüjlenmiştir.
9. Arıtma kolonu atılarak saflaştırılmış RNA'yı sonraki uygulamalarda kullanmak için üzeri etiketlenerek -80°C'de saklanmıştır.



Şekil 3.21 V33K2 ve %3 PEG kuraklık dozunda yetiştirilen hıyar bitkilerinin total RNA izolasyonunun yapılması a) lizis tamponunun örneklerle eklenmesi b) lizis tamponu eklenen örneklerin santrifüjlenmesi

Toplam RNA Kalite ve Miktarının Belirlenerek Genomik DNA Kalıntılarının Giderilmesi

RNA izolasyonu sonunda elde edilen RNA'nın miktarı ve kalitesi (A_{260}/A_{280} ve A_{260}/A_{230} oranı ile) Nanodrop (Thermo Scientific) ile ölçülmüştür. Buna ek olarak ekstrakte edilen RNA'nın kalitesi %1'lik agaroz jel elektroforez çalışması ile kontrol edilmiştir. Genomik DNA kalıntıları DNA-free kit kullanılarak ortadan kaldırılmıştır. Ardından tüm RNA konsantrasyonları 700 ng/µl olacak şekilde optimize edilmiştir.

cDNA'nın Eldesi

RNA örnekleri RT-qPCR çalışmalarında kullanılmak amacı ile komplementer DNA'ları (cDNA) oluşturulmuştur. cDNA eldesi için sentez kiti kullanılmıştır, kit bileşenleri aşağıdaki çizelge 3.9 de verilmiştir. Kit bileşenleri ile hazırlanan master mix buz üzerinde 20 µl hacminde yapılmıştır. Hazırlanan cDNA master mix bileşenleri her bir örnek için PCR tüplerine dağıtılmıştır. Mini spin ile kısa süreli karıştırılarak hava baloncukları elemine edilmiştir. Tüpler PCR cihazına yerleştirilmiştir. PCR cihazına

amplifikasyon şartları Çizelge 3.10' a göre cihaza tanıtılmıştır. PCR işleminden sonra cDNA ürünleri -20' de muhafaza edilmiştir.

Çizelge 3.9 Bitki örneklerinden elde edilen toplam RNA'dan cDNA kütüphanesi oluşturmak için hazırlanan master mix bileşenleri

Bileşen	Hacim (µl)
5X cDNA Buffer	4 µl
RT Enzim Karışımı	1 µl
Total RNA	11 µl
Nükleaz içermeyen su (DEPC)	4 µl
Toplam\Her reaksiyon	20 µl

Çizelge 3.10 cDNA eldesi için PCR reaksiyon koşulları

	Step 1	Step 2	Step 3	Step 4
Sıcaklık °C	72	42	80	+4
Zaman (dk)	5	60	10	∞

Ayrıca cDNA örneklerinin doğru olup olmadığını kontrol etmek için çalışmada kullanılan farklı primerlerle rastgele seçilen cDNA örnekleri denenerek polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) gerçekleştirilmiştir. PCR reaksiyon bileşenleri Çizelge 3.11'de belirtilmiştir.

Çizelge 3.11 cDNA sentezinin doğrulanması için yapılan PCR reaksiyon bileşenleri

Bileşenler	Hacim (µl)
Taq KCl Buffer (10X)	2 µl
MgCl ₂ (25mM)	1.2 µl
dNTP (2,5 mM)	1.6 µl
İleri primer (10 p\mol)	2 µl
Geri primer (10 p\mol)	2 µl
Taq polimeraz enzimi	0.2 µl
Kalıp cDNA (1\10 seyreltilmiş)	3 µl
Nükleaz içermeyen su (DEPC)	8 µl
TOPLAM HACİM	20 µl

Hazırlanan master mix bileşenleri her bir örnek için PCR tüplerine dağıtılmıştır. Mini spin ile kısa süreli karıştırılarak hava baloncukları elemine edilmiştir. Tüpler PCR cihazına yerleştirilmiştir. Amplifikasyon şartları Çizelge 3.12'ye göre cihaza tanıtılmıştır. Elde edilen PCR ürünlerini görüntülemek amacıyla % 1 agaroz jel hazırlanarak, 5 µl PCR ürününe ve 2 µl yükleme boyası eklenerek elektroforeze yerleştirilen jeldeki kuyucuklara aktarılmıştır. Baz çifti uzunluğu bilinen DNA ladder ilk kuyucuğa 1 µl yüklenerek 50

dakika boyunca 90 V elektrik akımı uygulanmıştır. Jel fotoğrafı UV jel görüntüleme sistemi ile çekilmiştir.

Çizelge 3.12 cDNA sentezinin doğrulanması için yapılan PCR reaksiyon koşulları

	Sıcaklık °C	Zaman	Döngü
Step1	95	3dk.	1
Step2	95	30sn	35
	53	30sn	
	72	1 dk	
Step3	72	5 dk	1
	15	∞	

Quantitative Real Time PZR

Bu çalışma ile önceden belirlenmiş olan genlerin ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Real Time qPCR reaksiyonu “SYBR Green PCR Master Mix” ile üretici firmanın önerdiği protokole göre gerçekleştirilmiştir. Master Mix (1x) içeriği çizelge 3.13’te belirtilmiştir.

Çizelge 3.13 Real Time qPCR reaksiyon bileşenleri

Bileşenler	Hacim
Sybr green	6.25 µl
İleri primer	1 µl
Geri primer	1 µl
Nükleaz içermeyen su (DEPC)	3.25 µl
cDNA örnek	1 µl
Toplam hacim	12.5 µl

Yukarıda belirtilen doğrultuda elde edilen cDNA, SYBR Green qPCR master mix ile spesifik primerlerden oluşan ve final hacmi 12,5 ul olan master mix hazırlanmıştır. RT-qPCR çalışmasında 3 bağımsız biyolojik kopya ile çalışmalar yapılmıştır. Her bir örnek için de 3 teknik kopya kullanılmıştır. 96 kuyucuklu plakaların her bir kuyucuğuna 11.5 µl sybr green mix’e 1 µl cDNA örnekleri eklendikten sonra pipetaj yapılarak homojen bir karışımın olması sağlanmıştır (Şekil 3.22). Hazırlanan plakanın üzeri kapatılarak Çizelge 3.14’te belirtilen koşullarda Real Time PCR cihazında koşulmuştur. Çalışma sonunda genlere ait CT değerleri elde edilmiştir Genlerin ekspresyonuna bağlı

değişiklikler “ $2^{-\Delta\Delta CT}$ ” metodu (Livak vd., 2001) kullanılarak hesaplanmıştır. Housekeeping gen (Actin) ile normalizasyon çalışması Livak ve ark. (2001)’nın belirttiği metod temel alınarak yapılmıştır.

Çizelge 3.14 Real Time qPCR reaksiyonu termal cyclers koşulları

	Sıcaklık °C	Zaman	Döngü
Step1	95	15 dk.	1
	95	15 sn.	
Step2	55	30 sn.	40
	72	30 sn.	



Şekil 3.22 RT-qPCR hazırlanırken SYBR Green qPCR master mix'in plate aktarılması

3.2.4.8 EB İzolatının Moleküler Tanılaması

HKYL hastalığına ve kuraklık stresine karşı sınanan EB izolatlarının içinden en başarılı V33K2 izolatı olmuştur. V33K2 izolatının 16S rRNA bölgesinin dizi analizinin yapılması için çizelge 3.15’te verilen primerler ve çizelge 3.16’da verilen kimyasal bileşenlerle PCR ürünü hazırlanmıştır. Çizelge 3.17’ de belirtilen Termal Cyclers koşullarda yapılan PCR işlemi ile çoğaltılan bölgenin dizi analizi yapılmıştır.

Çizelge 3.15 EB’nin tanılanmasında kullanılan primerler

	Primerler	Oligonükleotit Dizilimi (5’-3’)	Kaynak
16S rRNA	27F	AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG	Lane, (1991)
(1428bp)	1492R	TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACTT	

Çizelge 3.16 EB 16s rRNA bölgesi dizi analizi için kullanılan 27F/1492R primer çifti için master mix

Bileşenler	Sekansa göndermek için gereken miktar (µl)
Tag KCl Buffer (1x)	5 µl
MgCl ₂ (1.5mM)	3 µl
dNTP (2.5 mM)	4 µl
İleri primer (1 mM)	5 µl
Geri primer (1mM)	5 µl
Tag polimeraz (1U)	0.5 µl
Nükleik Asit	7.5 µl
Nükleaz içermeyen su (DEPC)	20 µl
TOPLAM HACİM	50 µl

Çizelge 3.17 EB 16s rRNA bölgesi dizi analizi için kullanılan 27F/1492R primer çifti için thermal cycle koşulları

	Sıcaklık °C	Zaman	Döngü
Step1	95	3dk.	1
	95	30sn	
Step2	50	1 dk	35
	72	1 dk	
Step3	72	5 dk	1
	15	∞	

3.2.4.9 İstatistiksel Değerlendirmeler

Çalışılan örneklerden elde edilen sonuçlar Duncan çoklu karşılaştırma ile yapılmıştır. İstatistiksel analizler bilgisayar paket programı SPSS 13.0'e göre değerlendirilmiştir. Analizler $p < 0.05$ anlamlılık düzeyine göre belirlenmiştir.



4. BULGULAR

4.1 Hidroponik Ortamda Kuraklık Seviyesinin Belirlenmesi

Çalışmada sonraki aşamalarda EB ve *PsI* ile birlikte kullanılacak olan uygun kuraklık seviyesi için bu aşamada farklı PEG dozları kullanılmıştır. Bu amaçla %3, %5, %7 PEG (6000) konsantrasyonları hidroponik ortamda hıyar fidelerine uygulanmıştır. Bu dozlar ile gerçekleştirilen ilk denemenin sonuçlarına göre %7 PEG dozunun bitkide yıkıcı bir etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Çalışmaya uygun dozu belirlemek amacıyla %3, 4, 5 PEG dozları ile hidroponik ortamda ikinci bir deneme kurulmuştur. Hıyar örneklerinin kuraklık şiddeti ve bitki gelişim parametreleri değerlendirildikten sonra %3 PEG dozu çalışmanın sonraki aşamalarında kullanılmak için seçilmiştir.

Çizelge 4.1 incelendiğinde, PEG uygulaması sonucu bitkilerde görülen kuraklık belirtileri arasındaki fark istatistiki olarak önemli bulunmuştur. Kuraklık şiddeti en yüksek %7 PEG dozunda olurken, en düşük %3 PEG kuraklık dozunda bulunmuştur.

Çizelge 4.1 PEG %3, 5, 7 kuraklık dozlarında hıyar bitkilerindeki 0-5 skalasına göre kuraklık şiddeti

PEG Uygulama Dozu	Kuraklık Şiddeti
%3	1.82 $\pm$ 0.32c*
%5	2.60 $\pm$ 0.20b
%7	4.43 $\pm$ 0.09a

*Duncan çoklu karşılaştırma testine göre aynı sütundaki aynı harfler arasındaki fark önemsizdir ($p < 0.05$).

Çizelge 4.2 incelendiğinde, hıyar bitkilerine uygulanan %3, 5, 7 PEG kuraklık dozları sonucunda yeşil aksam yaş-kuru ağırlığı, kök yaş ağırlığı ve yaprak alanı ölçümlerinde istatistik olarak fark önemli bulunmuştur. Kontrol grubuyla kıyaslandığında yeşil aksam yaş ağırlığında en yüksek değer %3'te tespit edilmiş olup ardından %5 ve %7 gelmektedir. Kök yaş ağırlığında en yüksek ağırlık PEG dozu %5 olan grup daha sonra %3 ve %7 olan gruplar gelmektedir. Yeşil aksam kuru ağırlığında yeşil aksam yaş ağırlığındaki gibi PEG dozu %3'te en yüksek kuru ağırlığa ulaşırken, bunu takiben %5 ve %7 gelmektedir. Yaprak alanı bakımından yine en yüksek %3'te olurken en düşük yaprak alanı %7'de tespit edilmiştir.

Çizelge 4.2 PEG %3, %5, %7 kuraklık dozu uygulanmalarının hıyar bitkilerindeki gelişim parametreleri üzerine etkisi

Uygulama Dozları	*YAYA (g bitki ⁻¹)	KYA (g bitki ⁻¹)	YAKA (g bitki ⁻¹)	KKA (g bitki ⁻¹)	YA (cm ²)
PEG %7	1.22±0.13c	0.8±0.09c	0.14±0.01c	0.06±0.00	8.22±1.01c
PEG %5	5.52±0.37b	2.15±0.24a	0.41±0.03b	0.07±0.00	35.66±3.85b
PEG %3	8.41±0.81a	1.42±0.17bc	0.56±0.05a	0.12±0.03	47.58±3.64a
KONTROL	8.92±0.74a	1.78±0.28ab	0.66±0.04a	0.08±0.00	47.66±4.35a

* YAYA: Yeşil Aksam Yaş Ağırlığı, KYA: Kök Yaş Ağırlığı, YAKA: Yeşil Aksam kuru Ağırlığı, KKA: Kök Kuru Ağırlığı, YA: Yaprak Alanı, PEG: Polietilen glikol

** Duncan çoklu karşılaştırma testine göre aynı sütundaki aynı harfler arasındaki fark önemsizdir (p<0.05).

Denemede %7'lik dozun bitkileri ölüm seviyesine getirdiği tespit edilmiştir. Bu doğrultuda uygun kuraklık dozunu belirlemek amacıyla %7 lik kuraklık dozu elenerek yine hidroponik ortamda %3, %4, %5 PEG dozları ile bir deneme daha kurulmuştur (Şekil 4.1).



Şekil 4.1 PEG %3-5-7 kuraklık dozu uygulanması sonucu hıyar bitkileri arasındaki farkın görüntüsü

Kuraklık seviyesinin belirlenmesi amacıyla yürütülen ilk çalışmanın sonuçlarına göre %7 PEG konsantrasyonu elemine edilerek %3, %4 ve %5 PEG konsantrasyonlarının uygulandığı ikinci bir deneme daha kurulmuştur (Şekil 4.2). Çizelge 4.3 incelendiğinde hıyar bitkilerine %3, %4 ve %5 PEG kuraklık dozu uygulandıktan sonra kuraklık şiddeti ölçümlerinin istatistik sonuçları verilmiştir. %3, %4 ve %5 PEG kuraklık dozu uygulama gruplarında 3 haftada da istatistiki olarak fark önemli bulunmuştur. Birinci haftada haftada en yüksek kuraklık şiddeti %5'te görülürken %3 ve %4'te düşük görülmüştür. İkinci haftada en yüksek kuraklık şiddeti %5'te görülürken, en düşük kuraklık şiddeti %3'te görülmüştür. Üçüncü haftada ise en yüksek kuraklık şiddeti %5 ve %4'te

görülürken en düşük %3'te görülmüştür. Ayrıca belirli zaman noktalarından alınan kuraklık şiddeti ölçümleri AUDPC (hastalık gelişim eğrisi altındaki alan) formülüne göre hesaplanmıştır. En düşük AUDPC sonucu %3'te görülürken, en yüksek kuraklık şiddeti %5'te gözlenmiştir. Denemeler sonuçlarındaki verilerin analiz edilmesi ile ana denemede uygun dozun %3 olduğuna karar verilmiştir.

Çizelge 4.3 PEG %3, %4, %5 kuraklık dozu uygulamalarının hıyar bitkilerinde haftalık kuraklık şiddeti üzerine etkisi ve kuraklık gelişim değerleri (AUDPC)

Uygulama Dozları	1.Hafta	2.Hafta	3.Hafta	*AUDPC
%3 PEG	0.70±0.09b	1.12±0.12c	2.00±0.21b	17.32
%4 PEG	1.00±0.08b	1.66±0.09b	2.70±0.16a	24.57
%5 PEG	1.37±0.14a	2.20±0.17a	3.04±0.30a	30.91

*AUDPC: Hastalık gelişim eğrisi altındaki alan, PEG: Polietilen glikol

**Duncan çoklu karşılaştırma testine göre aynı sütundaki aynı harfler arasındaki fark önemsizdir (p<0.05).



Şekil 4.2 PEG %3-4-5 kuraklık dozları uygulanan hidroponik deneme ortamı

Çizelge 4.4 incelendiğinde yeşil aksam yaş ağırlığı, kök yaş ağırlığı, kök kuru ağırlığı ve yaprak alanı ölçümleri istatistik olarak fark önemli bulunmuştur. Yeşil aksam ağırlığında istatistik olarak bir fark bulunmamıştır. Uygulamalar arasında bitki gelişim parametrelerinde yeşil aksam yaş ağırlığında negatif kontrole göre en düşük ağırlık %5 PEG uygulama grubunda bulunurken (4.38 g bitki⁻¹) kök yaş ağırlığında hem %5 PEG uygulama grubunda hem de %4 PEG uygulama grubunda bulunmuştur (sırasıyla 1.38 ve 1.73 g bitki⁻¹). Kök kuru ağırlığında en düşük ölçüm yine %5 PEG uygulama grubunda alınırken %3 ve 5 PEG ve negatif kontrol aynı oranda çıkmıştır. %4 PEG uygulama grubunda ise en yüksek kök kuru ağırlığına sahiptir. Yaprak alanına bakıldığında en düşük ölçüm %5 PEG uygulama grubundan alınırken (14.60 cm²), en yüksek alan 39.42 cm² ile negatif kontrol grubundan elde edilmiştir.

Çizelge 4.4 PEG %3, %4, %5 kuraklık dozu uygulanmalarının hıyar bitkilerinde bitki gelişim parametreleri üzerine etkileri

Uygulama Dozu	*YAYA (g bitki ⁻¹)	KYA (g bitki ⁻¹)	YAKA (g bitki ⁻¹)	KKA (g bitki ⁻¹)	YA (cm ²)
PEG %5	4.38±0.47c	1.38±0.13b	0.49±0.04	0.09±0.00b	14.60±2.27c
PEG %4	5.19±0.35bc	1.73±0.24b	0.5±0.05	0.15±0.01a	19.53±2.08bc
PEG %3	6.06±0.42b	2.59±0.16a	0.6±0.05	0.10±0.01b	23.31±1.75b
KONTROL	9.85±0.68a	3.05±0.29a	0.67±0.05	0.09±0.01b	39.42±2.74a

* YAYA: Yeşil Aksam Yaş Ağırlığı, YAKA: Yeşil Aksam Kuru Ağırlığı, KYA: Kök Yaş Ağırlığı, KKA: Kök Kuru Ağırlığı, *YA: Yaprak Alanı *PEG: Polietilenglikol

** Duncan çoklu karşılaştırma testine göre aynı sütundaki aynı harfler arasındaki fark önemsizdir (p<0.05).

4.2 *PsI*'nin Oluşturduğu HKYL Hastalığına Karşı EB Seçimi

4.2.1 Viyollerde Yetiştirilen Hıyar Fidelerinde *PsI*'ye Karşı Etkili EB Seçimi

Hıyar fidelerinde Çizelge 3.1'de belirtilen 23 endofit bakterinin hıyarda köşeli yaprak leke hastalığına karşı etkinliği ilk olarak viyol çalışması ile araştırılmıştır. Viyollerde geliştirilen fidelere EB uygulamasından sonra *PsI* uygulanmış ve hastalığı baskılama performanslarına bakılmıştır. Her endofit bakteri grubunda 15' er bitki olacak şekilde ayarlanmış ve iki kez tekrar edilmiştir. Bu aşamada hastalık şiddeti, yeşil aksam yaş-kuru ağırlıkları belirlenmiştir (Çizelge 4.5). Çizelge 4.5'te sonuçlar doğrultusunda endofit bakteriler *PsI*'yi baskılamada etkinlik düzeyine göre sıralanmıştır. Hastalık şiddeti sonuçlarına göre 1. ve 2. viyol denemelerinin her ikisinde de hastalık şiddetleri arasındaki fark istatistik olarak önemli bulunmuştur. İlk denemede sırasıyla T1K2, T12K1, G116S2 izolatları en başarılı üç izolat olmuştur. İkinci denemede ise pozitif kontrole (PK) göre en başarılı izolatlar 3 izolat sırasıyla V33K2, V31Y4, V40K2, olmuştur.

Çizelge 4.5 Viyol denemeleri ile *PsI*'ye karşı etkinlikleri sınanan 23 EB izolatının hastalık şiddeti üzerine etkileri

İzolat kodu	Hastalık şiddeti (%) 1. deneme	İzolat kodu	Hastalık şiddeti (%) 2. deneme
1. T1K2	10.50±1.48e	1. V33K2	15.66±3.13f
2. T12K1	11.85±1.89e	2. V31Y4	16.00±2.10f
3. G116S2	13.22±2.60de	3. V40K2	16.24±1.62f
4. T2K2	14.85±2.67c-e	4. V33K1	17.32±2.70ef
5. G120S2	16.65±2.26b-e	5. G115K1T	20.17±2.09d-f

Çizelge 4.5 Viyol denemeleri ile *PsI*'ye karşı etkinlikleri sınanan 23 EB izolatının hastalık şiddeti üzerine etkileri (devamı)

İzolat kodu	Hastalık şiddeti (%) 1. deneme	İzolat kodu	Hastalık şiddeti (%) 2. deneme
6. V32Y2	18.16±2.26b-e	6. T2K2	21.65±2.37c-f
7. V33K2	18.65±3.87b-e	7. T18K2	22.09±1.59c-f
8. V33K1	20.58±7.90a-e	8. V32Y2	22.39±1.19b-f
9. G115K1T	21.01±2.76a-e	9. G116S2	23.08±1.17b-f
10. V27Y3	21.30±2.78a-e	10. T12K1	25.50±4.20b-f
11. T26Y1	22.47±6.73a-e	11. BS193	25.60±1.31b-f
12. WCS365	23.77±2.78a-e	12. WCS365	27.22±4.31a-f
13. V14G3	26.33±7.95a-e	13. V27Y3	27.79±2.42a-f
14. V31Y4	27.20±11.27a-e	14. T25Y2	27.85±5.83a-f
15. T14K1	28.61±7.20a-e	15. T1K2	28.73±3.85a-f
16. V40K2	28.95±7.37a-e	16. V30Y3	29.04±5.56a-f
17. T25Y2	29.10±6.26a-e	17. G120S2	29.26±3.15a-f
18. V30Y3	29.88±6.39a-e	18. V14G3	30.98±3.81a-f
19. T18K2	29.91±11.67a-e	19. V36K1	32.01±6.84a-f
20. PS17	31.10±8.04a-e	20. T26Y1	33.60±5.21a-f
21. T16K1	37.37±9.42a-d	21. T14K1	35.63±8.45a-d
22. PK	37.81±6.41a-c	22. T16K1	37.85±7.89a-c
23. V36K1	40.81±9.02ab	23. PK	38.72±4.33ab
24. BS193	43.62±9.77a	24. Ps17	42±6.24a

*Duncan çoklu karşılaştırma testine göre aynı sütundaki aynı harfler arasındaki fark önemsizdir (p<0.05).

İlk viyol denemesinde yeşil aksam yaş-kuru ağırlığı arasındaki fark istatistikî bakımdan önemli bulunmuştur (p≤0.05). Çizelge 4.6'da yeşil aksam yaş-kuru ağırlıkları en düşük ağırlıktan en yüksek ağırlığa göre sıralaması yapılmıştır. Yeşil aksam yaş ağırlığında, negatif kontrol ve pozitif kontrole göre T26Y1+P, V36K1+P, V33K1+P T1K2+P T14K1+P G116S2+P izolatları yeşil aksam yaş ağırlığını arttırmada başarısız olmuştur. G120S2 izolatı ise yeşil aksam yaş ağırlığını arttırmada başarılı olmuştur. Yeşil aksam kuru ağırlığında ise T26Y1, V32Y2, V33K2 izolatları başarılı olmuştur. WCS365+P, T14K1+P, T12K1+P izolatları yeşil aksam kuru ağırlığını düşürmüştür.

Çizelge 4.6 Birinci viyol denemesinde fidelere EB ve *PsI* uygulamalarının yeşil aksam yaş- kuru ağırlığa etkisi

İzolat Kodu	YAYA (g bitki ⁻¹)		YAKA (g bitki ⁻¹)	
	EB	EB+ <i>PsI</i>	EB	EB+ <i>PsI</i>
1 T26Y1	3.56±0.35a-d	2.47±0.19f	0.34±0.07a	0.24±0.01b-1
2 V36K1	3.44±0.19a-f	2.47±0.30f	0.21±0.01c-1	0.22±0.02c-1
3 V33K1	3.79±0.29a-c	2.51±0.32ef	0.25±0.02b-g	0.18±0.02f-1
4 T1K2	3.40±0.28a-f	2.52±0.27ef	0.22±0.02b-1	0.17±0.02f-1
5 T14K1	3.22±0.38a-f	2.55±0.20ef	0.20±0.02c-1	0.15±0.01h1
6 G116S2	3.14±0.18a-f	2.76±0.15d-f	0.17±0.01f-1	0.17±0.01f-1
7 T16K1	3.23±0.26a-f	2.87±0.32c-f	0.18±0.02f-1	0.18±0.02f-1
8 T12K1	3.34±0.20a-f	2.96±0.26c-f	0.25±0.01b-g	0.17±0.01g-1

Çizelge 4.6 Birinci viyol denemesinde fidelere EB ve *PsI* uygulamalarının yeşil aksam yaş- kuru ağırlığa etkisi (devamı)

	İzolot Kodu	YAYA (g bitki ⁻¹)		YAKA (g bitki ⁻¹)	
		EB	EB+ <i>PsI</i>	EB	EB+ <i>PsI</i>
9	T18K2	3.38±0.22a-f	2.97±0.37b-f	0.21±0.02c-ı	0.20±0.02c-ı
10	WCS365	3.58±0.23a-d	3.03±0.33b-f	0.24±0.01b-h	0.15±0.01hı
11	T25Y2	2.93±0.15c-f	3.03±0.22a-f	0.20±0.01c-ı	0.24±0.02b-h
12	G115K1T	3.67±0.26a-d	3.11±0.29a-f	0.26±0.02a-f	0.23±0.02b-ı
13	PS17	3.11±0.21a-f	3.11±0.21a-f	0.22±0.01c-ı	0.28±0.03a-e
14	V40K2	3.39±0.22a-f	3.15±0.25a-f	0.19±0.01d-ı	0.22±0.01c-ı
15	V31Y4	3.45±0.29a-f	3.17±0.43a-f	0.26±0.02b-g	0.21±0.03c-ı
16	T2K2	3.43±0.19a-f	3.19±0.23a-f	0.25±0.01b-g	0.23±0.01b-ı
17	V27Y3	3.64±0.29a-d	3.19±0.32a-f	0.22±0.02b-ı	0.23±0.02b-ı
18	V14G3	3.41±0.33a-f	3.24±0.22a-f	0.19±0.01e-ı	0.21±0.02c-ı
19	V33K2	3.83±0.31a-c	3.25±0.39a-f	0.28±0.03a-c	0.22±0.03b-ı
20	BS193	2.94±0.23c-f	3.28±0.29a-f	0.20±0.02c-ı	0.26±0.01a-f
21	G120S2	4.04±0.32a	3.30±0.21a-f	0.28±0.01a-e	0.23±0.03b-ı
22	V30Y3	3.81±0.24a-c	3.47±0.24a-f	0.26±0.02b-g	0.23±0.02b-ı
23	V32Y2	3.97±0.29ab	3.69±0.36a-d	0.31±0.03ab	0.25±0.03b-g
24	Kontrol*	3.82±0.16a-c	3.50±0.34a-e	0.28±0.01a-d	0.23±0.02b-ı

*Kontrol: Yalnız EB uygulanmış gruplarda yalnızca su uygulanmış grup (NK), Patojen ve EB uygulanan gruplarda ise yalnız *PsI* uygulaması (PK)

**YAYA: Yeşil Aksam Yaş Ağırlığı, YAKA: Yeşil Aksam Kuru Ağırlığı

***Duncan çoklu karşılaştırma testine göre aynı sütundaki aynı harfler arasındaki fark önemsizdir (p<0.05).

Viyol denemesinin 2. denemesinde yeşil aksam yaş-kuru ağırlığı ortalamaları incelendiğinde EB ve *PsI* uygulamalarının yaş ve kuru ağırlıklara etkisinin istatistiksel olarak önemli olduğu görülmüştür (p≤0.05). V14G3+P, G116S2+P, PS17, G120S2+P, T14K1+P izolatları yeşil aksam yaş ağırlığını arttırmada başarısız olurken T25Y2+P izolatu yeşil aksam yaş ağırlığını arttırmada etkili olmuştur. G116S2+P, V14G3+P ve G120S2+P izolatu yeşil aksam kuru ağırlığını düşürürken V33K1 izolatu arttırmıştır (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.7 İkinci viyol denemesinde fidelere EB ve *PsI* uygulamalarının yeşil aksam yaş-kuru ağırlığına etkisi

	İzolot Kodu	YAYA (g bitki ⁻¹)		YAKA (g bitki ⁻¹)	
		EB	EB+ <i>PsI</i>	EB	EB+ <i>PsI</i>
1	V14G3	3.25±0.21c-k	2.43±0.37k	0.24±0.01c-j	0.18±0.02j
2	G116S2	3.24±0.10c-k	2.47±0.18jk	0.24±0.01b-j	0.17±0.01j
3	G120S2	3.07±0.26c-k	2.60±0.26h-k	0.27±0.02a-h	0.18±0.02ij
4	T14K1	2.82±0.20e-k	2.62±0.38h-k	0.22±0.02e-j	0.19±0.02h-j
5	G115K1T	3.62±0.13a-e	2.65±0.31g-k	0.26±0.01a-i	0.22±0.02d-j
6	T16K1	3.27±0.18b-j	2.72f±0.32f-k	0.27±0.01a-h	0.19±0.02h-j
7	V36K1	3.54±0.32a-f	2.79±0.34e-k	0.27±0.03a-g	0.22±0.02d-j

Çizelge 4.7 İkinci viyol denemesinde fidelere EB ve *PsI* uygulamalarının yeşil aksam yaş-kuru ağırlığına etkisi (devamı)

	İzolat Kodu	YAYA (g bitki ⁻¹)		YAKA (g bitki ⁻¹)	
		EB	EB+ <i>PsI</i>	EB	EB+ <i>PsI</i>
8	V31Y4	3.22±0.32c-k	2.81±0.32e-k	0.27±0.02a-h	0.23±0.02d-j
9	BS193	3.39±0.18b-i	2.90±0.35d-k	0.27±0.01a-g	0.24±0.03c-j
10	V33K2	3.48±0.15a-g	2.96±0.22c-k	0.26±0.01a-i	0.22±0.02d-j
11	T12K1	2.73±0.21f-k	2.96±0.39c-k	0.25±0.02b-j	0.20±0.02g-j
12	V30Y3	3.26±0.15c-k	3.04±0.24c-k	0.23±0.02d-j	0.23±0.02d-j
13	T26Y1	3.06±0.21c-k	3.03±0.09c-k	0.26±0.01a-i	0.21±0.02g-j
14	T2K2	3.26±0.20c-k	3.08±0.21c-k	0.22±0.02e-j	0.22±0.02d-j
15	V33K1	4.09±0.25ab	3.18±0.14c-k	0.34±0.02a	0.30±0.02a-d
16	T1K2	3.27±0.17b-j	3.28±0.31b-j	0.22±0.02d-j	0.22±0.02d-j
17	T18K2	3.53±0.19a-f	3.31±0.25b-j	0.30±0.01a-e	0.23±0.01d-j
18	WCS365	2.82±0.18e-k	3.35±0.23b-i	0.21±0.01g-j	0.23±0.01d-j
19	PS17	2.55±0.13i-k	3.44±0.31a-h	0.20±0.01g-j	0.23±0.02d-j
20	V40K2	3.30±0.29b-j	3.48±0.29a-g	0.27±0.02a-h	0.26±0.03b-i
21	V27Y3	3.78±0.15a-c	3.72±0.35a-d	0.29±0.02a-f	0.29±0.04a-f
22	V32Y2	2.95±0.24c-k	3.79±0.20a-c	0.32±0.02a-c	0.32±0.02ab
23	T25Y2	3.50±0.16a-f	4.21±0.21a	0.28±0.01a-g	0.30±0.03a-d
24	Kontrol*	3.55±0.13a-f	3.48±0.15a-g	0.29±0.01a-f	0.27±0.01a-h

*Kontrol: Yalnız EB uygulanmış gruplarda yalnızca su uygulanmış grup (NK), Patojen ve EB uygulanan gruplarda ise yalnız *PsI* uygulaması (PK)

**YAYA: Yeşil Aksam Yaş Ağırlığı, YAKA: Yeşil Aksam Kuru Ağırlığı

***Duncan çoklu karşılaştırma testine göre aynı sütundaki aynı harfler arasındaki fark önemsizdir (p<0.05).

4.2.2 Saksı Çalışmaları ile *PsI*'ye Karşı Etkili EB Seçimi

Viyol çalışmaları sonucu seçilen 8 endofit bakteri, saksı denemesi kurularak her grupta 15'er bitki olacak şekilde tekrar *PsI*'ye karşı denenmiştir. Bu çalışmada hastalık şiddeti, yeşil aksam yaş-kuru ağırlıklarına, kök yaş-kuru ağırlıklarının yanı sıra klorofil içeriği ve gövde boyu ölçülmüştür.

Seçilen 8 endofit bakterinin uygulandığı bu çalışmada hastalık şiddetleri AUDPC formülüne göre hesaplanmıştır. Bu hesaplamalar karşılaştırıldığında herhangi bir endofit bakteri uygulanmayıp sadece *PsI* etmeninin uygulandığı pozitif kontrole göre hastalık şiddetini engellemede başarılı olanlar sırasıyla WCS365, V33K2, V32Y2, V33K1, T12K1, T2K2, T12K1, G115K1T, G116S2 izolatları olmuştur (Çizelge 4.8).

Çizelge 4.8 Saksı denemeleri ile *PsI*'ye karşı başarılı endofit bakteri seçim çalışmalarındaki hastalık gelişim değerleri (AUDPC).

İzolat Kodu	AUDPC Sonuçları
PK	1612.36
G115K1T	1545.60
G116S2	1653.04
T12K1	1369.83
T2K2	1382.65
V32Y2	1319.39
V33K1	1324.86
V33K2	1178.81
WCS365	1161.10

*AUDPC: Hastalık gelişim eğrisi altındaki alan, PK: Pozitif Kontrol

**Duncan çoklu karşılaştırma testine göre aynı sütundaki aynı harfler arasındaki fark önemsizdir ($p < 0.05$).

Seçilen 8 endofit bakterinin *PsI* etmeni uygulanan ve uygulanmayan hıyar bitkileri üzerinde etkisine bakıldığında yeşil aksam yaş ağırlığında, istatistik olarak farkı önemli bulunmuştur. V33K1 en etkin endofit bakteri izolatıdır. Yeşil aksam kuru ağırlığında ise fark önemsiz bulunmuştur. Kök yaş ağırlığında fark önemli bulunmuş ve T12K1 izolatı kök yaş ağırlığını arttırırken G115K1T+P izolatı ise düşürmüştür. Kök kuru ağırlığında istatistik olarak fark önemsiz bulunmuştur (Çizelge 4.9).

Çizelge 4.9 Hıyar bitkileri üzerine uygulanan 8 endofit bakteri ve *PsI*'nin bitki gelişim parametreleri üzerine etkisi

İzolat kodu	YAYA (g bitki ⁻¹)	YAKA (g bitki ⁻¹)	KYA (g bitki ⁻¹)	KKA (g bitki ⁻¹)
G115K1T	5.85±0.34a-e	0.41ab±0.03	0.39±0.07a-d	0.058±0.00
G116S2	6.03±0.47a-d	0.44ab±0.04	0.30±0.04b-e	0.062±0.00
T12K1	6.54±0.40ab	0.41ab±0.04	0.57±0.09a	0.056±0.00
T2K2	6.43±0.44a-c	0.41ab±0.03	0.33±0.05b-e	0.067±0.00
V32Y2	6.16±0.40a-d	0.44ab±0.03	0.28±0.04c-e	0.066±0.00
V33K1	6.90±0.34a	0.44ab±0.03	0.48±0.05ab	0.066±0.00
V33K2	5.78±0.50a-e	0.38ab±0.02	0.41±0.06a-c	0.078±0.02
WCS365	5.60±0.31a-e	0.39ab±0.03	0.41±0.01a-c	0.059±0.00
NK	5.76±0.22a-e	0.38ab±0.03	0.31±0.05b-e	0.100±0.05
G115K1T+P	5.28±0.47b-e	0.41ab±0.03	0.18±0.02e	0.036±0.00
G116S2+P	5.09±0.32c-e	0.41ab±0.01	0.26±0.04c-e	0.044±0.00
T12K1+P	6.15±0.46a-d	0.49a±0.02	0.39±0.05a-d	0.058±0.00
T2K2+P	4.57±0.56e	0.36b±0.04	0.31±0.05b-e	0.056±0.00
V32Y2+P	4.55±0.31e	0.35b±0.02	0.18±0.03e	0.038±0.00
V33K1+P	4.97±0.48e	0.37ab±0.03	0.20±0.03de	0.043±0.00
V33K2+P	5.17±0.51b-e	0.38ab±0.04	0.23±0.06c-e	0.048±0.00
WCS365+P	5.36±0.33b-e	0.40ab±0.02	0.25±0.03c-e	0.053±0.00
PK	5.53±0.40a-e	0.44ab±0.02	0.30±0.04b-e	0.044±0.00

* YAYA: Yeşil Aksam Yaş Ağırlığı, YAKA: Yeşil Aksam Kuru Ağırlığı, KYA: Kök Yaş Ağırlığı, KKA: Kök Kuru Ağırlığı PK: Pozitif Kontrol, NK: Negatif Kontrol

**Duncan çoklu karşılaştırma testine göre aynı sütundaki aynı harfler arasındaki fark önemsizdir ($p < 0.05$).

Klorofil ve gövde uzunluğu parametrelerinde ise fark önemli bulunmuştur. Klorofil miktarının en yüksek olduğu endofit bakteri izolatu G116S2+P izolatu olmuştur. Klorofil miktarı en düşüren izolat ise G115K1T izolatu olmuştur. Gövde uzunluğunu arttırmada en yüksek T2K2 izolatu ve en düşük ise PK grubunda olmuştur (Çizelge 4.10).

Çizelge 4.10 Hıyar bitkileri üzerine uygulanan 8 endofit bakteri ve *PsI*'nin klorofil ve gövde uzunluğuna etkisi

İzolat kodu	Klorofil	Gövde Uzunluğu (mm)
G115K1T	35,79±0,88g	19,06±1,67ab
G116S2	39,48±1,47b-f	17,36±1,56a-d
T12K1	38,86±1,21d-g	17,03±0,98a-d
T2K2	36,42±0,76fg	19,26±1,39a
V32Y2	38,28±1,00d-g	17,73±1,31a-d
V33K1	37,76±0,62e-g	18,21±1,19a-c
V33K2	36,10±1,18fg	17,46±1,69a-d
WCS365	38,86±1,21d-g	15,17±1,16a-d
NK*	39,30±0,85c-g	14,96±0,78b-d
G115K1T+P	42,91±1,12ab	15,50±0,56a-d
G116S2+P	43,39±1,26a	16,30±0,78a-d
T12K1+P	40,74±0,87a-e	17,46±0,85a-d
T2K2+P	41,80±0,87a-c	15,10±1,07b-d
V32Y2+P	40,98±0,82a-e	14,40±1,08cd
V33K1+P	41,25±1,37a-e	14,2±0,83cd
V33K2+P	38,87±0,87d-g	15,50±1,18a-d
WCS365+P	41,63±1,01a-d	17,00±1,14a-d
PK	42,64±1,06ab	13,80±0,80d

*PK: Pozitif Kontrol, NK: Negatif Kontrol

**Duncan çoklu karşılaştırma testine göre aynı sütundaki aynı harfler arasındaki fark önemsizdir (p<0.05).

Yapılan saksı çalışması ile 8 endofit bakterinin bitki gelişim parametrelerine ve hastalık şiddeti sonuçları değerlendirilmiştir. İstatistik hesaplamalar sonucunda V33K1, V33K2, WCS365, T2K2 ve T12K1 izolatları ile yeniden saksı denemesi kurulmuştur.

4.2.3 Hıyar Bitkileri Üzerinde Seçilen Endofit Bakterinin *PsI*'ye Karşı Taranması

İlk olarak *PsI* etmenine karşı etkili izolatu bulabilmemiz için 23 endofit bakteri (Çizelge 1) hıyar bitkilerine uygulanarak ön tarama yapılmıştır. Bu ön taramada hastalık şiddeti ve yeşil aksam yaş ağırlıklarına bakılarak 15 bakteri elenmiş etkin olan 8 bakteri seçilerek daha detaylı inceleme için saksı denemesi kurulmuştur. Bu 8 bakterinin hastalık şiddeti yeşil aksam yaş-kuru ağırlığı, kök yaş-kuru ağırlığı, klorofil içeriği ve gövde boyuna bakılarak en başarılı olan T12K1, T2K2, V33K1, V33K2, WCS365 izolatları

saksı denemesi tekrarlanmıştır. Bu endofit bakteri izolatları içinden *Psl*'ye karşı en başarılısını seçmek için tekrar saksı denemesi kurulmuştur.

Çizelge 4.11 incelendiğinde seçilen 5 endofit bakterinin hastalık şiddetine etkisi istatistik sonuçlarına göre önemli bulunmuştur. Endofit bakteri izolatları T2K2 ve V33K2 hastalık şiddetini önlemede en başarılı izolat olmuştur Hastalık şiddetini engellemede diğer izolatlarla göre en az etki eden izolat T12K1 olmuştur. Bu nedenle en başarılı ilk 4 EB kuraklık stresindeki seçim çalışmasına aktarılmıştır.

Çizelge 4.11 Hıyar bitkisi üzerinde 5 EB'nin *Psl* etmenine karşı hastalık şiddeti üzerine istatistiksel hesaplamaları

İzolat kodu	Hastalık şiddeti
T12K1	31.8±4.03ab
T2K2	17.21±2.12c
V33K1	30.2±2.63a-c
V33K2	21.1±2.13bc
WCS365	30.4±4.45a-c
PK*	34.9±7.33a

*PK: Pozitif Kontrol

**Duncan çoklu karşılaştırma testine göre aynı sütundaki aynı harfler arasındaki fark önemsizdir (p<0.05).

Çizelge 4.12'ye göre hıyar bitkilerinde 5 endofit bakterinin *Psl* etmeninin uygulanması sonucu yeşil aksam yaş-kuru ağırlığında ve kök yaş-kuru ağırlığında istatistiki olarak fark önemli bulunmuştur. Yeşil aksam yaş ağırlığına bakıldığında, en başarılı izolat WCS365'tir. Ardından T2K2 ve V33K2 izolatı gelmektedir. Patojen baskısı altında kök yaş ağırlığını arttırmada, V33K1+P, WCS365+P, T2K2+P ve V33K2+P izolatları etkili olmuştur. Yeşil aksam kuru ağırlığında ise *Psl* etmeni uygulanan gruplar arasında olarak V33K1+P izolatı yeşil aksam kuru ağırlığını PK' ya göre arttırmada başarılı olmuştur.

Çizelge 4.12 Hıyar bitkisi üzerinde 5 EB'nin *Psl* etmenine karşı etkinliğinin belirlenerek bitki biyoması üzerinde istatistiksel hesaplamaları

İzolat Kodu	YAYA (g bitki ⁻¹)	KYA (g bitki ⁻¹)	YAKA (g bitki ⁻¹)	KKK (g bitki ⁻¹)
T12K1	5.76±0.57a-c	0.46±0.08abc	0.36±0.05a-c	0.034±0.00a-c
T2K2	6.46±0.49a	0.65±0.07a	0.34±0.03a-d	0.040±0.00a-c
V33K1	5.49±0.39a-c	0.50±0.05abc	0.32±0.03a-d	0.041±0.00a-c
V33K2	6.30±0.47ab	0.59±0.06a	0.32±0.03a-d	0.041±0.00a-c

Çizelge 4.12 Hıyar bitkisi üzerinde 5 EB'nin *Psl* etmenine karşı etkinliğinin belirlenerek bitki biyoması üzerinde istatistiksel hesaplamaları (devamı)

İzolot Kodu	YAYA (g bitki ⁻¹)	KYA (g bitki ⁻¹)	YAKA (g bitki ⁻¹)	KKA (g bitki ⁻¹)
WCS365	6.49±0.60a	0.64±0.07a	0.36a±0.5a-c	0.037±0.00a-c
NK	5.75±0.26a-c	0.56±0.05ab	0.36±0.02a-c	0.048±0.00a
T12K1+P	4.12±0.38d	0.36±0.04bc	0.24±0.02d	0.026±0.00c
T2K2+P	4.99±0.27b-d	0.56±0.06ab	0.30±0.01a-d	0.038±0.00a-c
V33K1+P	5.02±0.27b-d	0.64±0.06a	0.37±0.02ab	0.045±0.00a-c
V33K2+P	5.00±0.34b-d	0.49±0.07ab	0.28±0.02b-d	0.042±0.00a-c
WCS365+P	4.67±0.40bc	0.60±0.06a	0.36±0.02a-c	0.046±0.00ab
PK	3.90±0.33d	0.34±0.03a	0.25±0.01cd	0.027±0.00bc

* YAYA: Yeşil Aksam Yaş Ağırlığı, YAKA: Yeşil Aksam Kuru Ağırlığı, KYA: Kök Yaş Ağırlığı, KKA: Kök Kuru Ağırlığı PK: Pozitif Kontrol, NK: Negatif Kontrol

**Duncan çoklu karşılaştırma testine göre aynı sütundaki aynı harfler arasındaki fark önemsizdir (p<0.05).

Çizelge 4.13'e bakıldığında 5 endofit bakterinin gövde boyu üzerine etkisi istatistik olarak önemli iken klorofil miktarında bu farklılık önemsiz bulunmuştur. Endofit bakterilerin *Psl* uygulanan gruplar arasında gövde boyunu uzatmada PK'ya göre en etkili uygulama grubu V33K1+P olmuştur.

Çizelge 4.13 Hıyar bitkisi üzerinde 5 EB'nin *Psl* etmenine karşı etkinliğinin belirlenerek klorofil ve gövde boyu üzerine istatistiksel hesaplamaları

İzolot kodu	Gövde boyu	Klorofil ölçümü
T12K1	14.1±0.6ab	39.9±1.45b
T2K2	15.2±0.7ab	41.1±1.4ab
V33K1	13.4±0.4b	42.1±0.9ab
V33K2	12.9±0.6b	41.0±0.6ab
WCS365	15.5±0.6b	42.4±1.15ab
NK	13.0±0.4b	40.0±0.79b
T12K1+P	13.6±0.83b	40.0±1.67b
T2K2+P	13.8±0.83b	44.6±1.06a
V33K1+P	16.6±1.45a	39.0±0.84b
V33K2+P	14.1±0.9ab	40.0±1.06b
WCS365+P	14.7±0.95ab	42.4±1.26ab
PK	13.2±0.6b	40.0±1.27b

*PK: Pozitif Kontrol, NK: Negatif Kontrol

**Duncan çoklu karşılaştırma testine göre aynı sütundaki aynı harfler arasındaki fark önemsizdir (p<0.05).

4.3 Endofit Bakterilerin Kuraklık Stresine Karşı Etkinliklerinin Belirlenmesi

Uygun kuraklık düzeyinin belirlenmesi için yapılan çalışmalarda % 3 PEG düzeyinin oluşturduğu stres seviyesi bitki gelişim aktivitelerini yavaşlatırken ölümüne neden olmamasından dolayı seçilmiştir. Önceki çalışmalar ile hastalığa karşı en etkili olarak seçilen 4 endofit bakterinin bu kuraklık dozuna karşı etkinliği test edilmiştir. Bu

Çalışma ile hem kuraklık stresi hem de hıyarda köşeli yaprak lekeli hastalığına karşı kullanılan endofit bakterilerden en etkin olan tek izolatı belirlemek amaçlanmıştır.

EB uygulamalarının kuraklık stresi nedeniyle oluşan belirtiler üzerine önemli farklar bulunmuştur (izelge 4.14). Bitkilere kuraklık uygulandıktan sonraki haftalarda ölçümler alınmış ve bu ölçümlere göre AUDPC değerleri kuraklık şiddetinin gelişimini belirlemek için hesaplanmıştır.  gözlemde de EB grupları arasında kuraklık şiddetinin en düşük düzeyde gözlendiği izolot V33K2 izolotı olmuştur. En yüksek kuraklık düzeyi ise PK ile WCS365 uygulama gruplarında gözlenmiştir. Bu iki izolatı T2K2 izolatı takip etmiştir. EB uygulamalarının kuraklık stresinin bitkideki seyrini belirlemek amacıyla hesaplanan AUDPC değerlerinde de en düşük değer V33K2 izolatı uygulamasından elde edilmiştir. Bu izolatı V33K1, WCS365 ve T2K2 izolatları takip etmiştir.

Çizelge 4.14 EB uygulanmış hıyar bitkilerinde %3 PEG ile sağlanan kuraklık stresinin 1., 2., ve 3. haftalarda neden olduğu 0-5 skalasına göre belirti düzeyi ve AUDPC değerleri

İzolot Kodu	1. hafta	2.hafta	3.hafta	AUDPC
T2K2	2.13± 0.17b	3.22±0.18a	3.21±0.16a	41.22
V33K1	1.54±0.13c	2.00±0.23b	2.58±0.23b	28.42
V33K2	0.45±0.12d	1.56±0.10b	1.83±0.13c	18.90
WCS365	2.42±0.13ab	2.73±0.16a	3.33±0.12a	39.23
PK (%3 PEG)*	2.62±0.27a	3.17±0.12a	3.58±0.14a	67.51

*PK: Pozitif Kontrol, PEG: Polietilen glikol, AUDPC: Hastalık gelişim eğrisi altındaki alan

** Duncan oklu karşılaştırma testine göre aynı sütundaki aynı harfler arasındaki fark önemsizdir (p<0.05).

Çizelge 4.15 incelendiğinde yeşil aksam yaş ağırlığı, kök yaş ağırlığı, yeşil aksam kuru ağırlığı ve kök kuru ağırlığında istatistik olarak fark önemli bulunmuştur. Yeşil aksam yaş ağırlığında, kuraklık uygulanmayan gruplar arasında WCS365, NK ile aynı oranda iken T2K2 bu ağırlıkları en düşüren izolot olmuştur. Kuraklık uygulanan gruplar arasında V33K1+K izolatı yeşil aksam ve kök yaş ağırlığını arttırmada etkili izolot olmuştur. Bu izolatın ardından da V33K2+K izolatı etkili olmuştur. Yeşil aksam kuru ağırlığını ve kök kuru ağırlığını kuraklık stresi altında sırasıyla V33K1+K ve V33K2+K izolatları arttırmayı başarmıştır. Kuraklık uygulanan gruplar arasında yeşil aksam yaş ağırlığı, kök yaş ağırlığı, yeşil aksam kuru ağırlığı ve kök kuru ağırlıklarını arttırmada etkili olan endofit bakteriler sırasıyla V33K1+K, V33K2+K izolatları olmuştur. Yine T2K2+K kuraklık stresi altında yeşil aksam yaş-kuru ağırlık kök yaş-kuru ağırlığında pozitif kontrol ile istatistik olarak aynı aralıktadır.

Çizelge 4.15 EB uygulanmış hıyar bitkilerinde %3 PEG ile sağlanan kuraklık stresinin bitki gelişim parametreleri üzerine etkileri

İzolat kodu	YAYA* (g bitki ⁻¹)	KYA (g bitki ⁻¹)	YAKA (g bitki ⁻¹)	KKA (g bitki ⁻¹)
T2K2	6.68±0.37c	1.25±0.12de	0.50±0.03b	0.054±0.00f
V33K1	8.68±0.51ab	1.56±0.16c-e	0.54±0.03b	0.066±0.00ef
33K2	8.58±1.12b	1.86±0.25cd	0.71±0.08a	0.073±0.00ef
WCS365	10.34±0.86a	2.18±0.27bc	0.70±0.05a	0.093±0.01d-f
NK	9.90±0.81ab	2.19±0.26bc	0.82±0.06a	0.11±0.00c-e
T2K2+K	2.4±0.18e	1.04±0.12e	0.26±0.02d	0.10±0.00de
V33K1+K	5.25±0.33cd	3.74±0.32a	0.50±0.02b	0.27±0.02a
V33K2+K	4.12±0.47de	2.59±0.25b	0.45±0.03bc	0.20±0.02b
WCS365+K	2.49±0.28e	1.84±0.24cd	0.33±0.03cd	0.15±0.02c
PK (%3 PEG)	2.80±0.19e	1.66±0.17c-e	0.28±0.02d	0.12±0.01cd

* YAYA: Yeşil Aksam Yaş Ağırlığı, YAKA: Yeşil Aksam Kuru Ağırlığı, KYA: Kök Yaş Ağırlığı, KKA: Kök Kuru Ağırlığı PK: Pozitif Kontrol, NK: Negatif Kontrol

**Duncan çoklu karşılaştırma testine göre aynı sütundaki aynı harfler arasındaki fark önemsizdir (p<0.05).

Çizelge 4.16'ya göre EB ve %3 PEG kuraklık dozu uygulandıktan sonra klorofil, yaprak alanı, YOSİ (yaprak oransal su içeriği) sonuçlarına bakıldığında istatistik olarak fark önemli bulunmuştur. Kuraklık stresi altındaki gruplarda klorofili arttırmada en etkili V33K1+K ardından V33K2+K izolatları gelmektedir. Kuraklık uygulanan gruplar arasında T2K2 haricindeki izolatlar pozitif kontrole göre yaprak alanı önemli ölçüde arttırmıştır. Kuraklık uygulanmayan gruplar arasında negatif kontrole göre yaprak alanını arttırmada en etkili izolat V33K2 izolatı olmuştur. YOSİ bakımından NK en yüksek değere sahiptir. En düşük yaprak oransal nem içeriği ise T2K2' de ve V33K1+K grubunda olmuştur.

Çizelge 4.16 Kuraklık stresi altında EB uygulamalarının hıyar bitkilerinde klorofil, yaprak alanı ve YOSİ üzerine etkisi

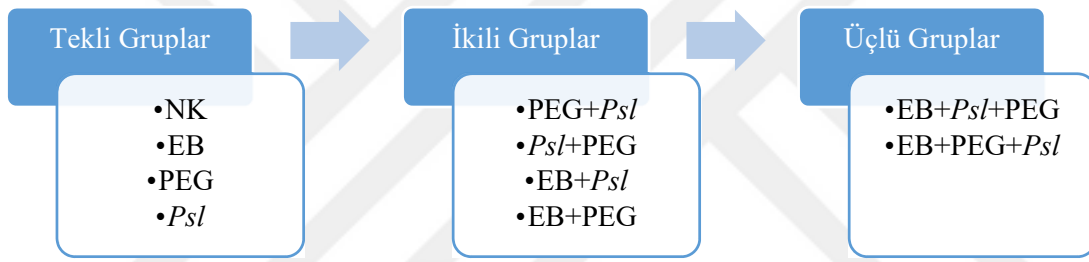
İzolat Kodu	Klorofil	Yaprak Alanı (cm ²)	YOSİ *
T2K2	40.26±0.63ab	11.61±1.77cd	93.67±2.34bc
V33K1	42.26±0.84a	19.33±2.27bc	97.05±1.28a-c
V33K2	39.47±1.03a	30.11±4.36a	99.43±2.36ab
WCS365	39.47±1.04ab	21.22±2.60b	93.74±1.77bc
NK	41.65±1.42ab	24.50±3.36ab	100.57±1.30a
T2K2+K	37.98±1.82b	4.07±0.74d	91.50±2.36c
V33K1+K	41.42±0.88ab	18.33±2.03bc	91.98±2.36c
V33K2+K	39.92±0.83ab	18.23±2.5bc	93.08±2.50bc
WCS365+K	37.89±0.96b	21.22±2.60b	93.74±2.75bc
PK (%3 PEG)	33.82±2.10c	6.69±0.86d	93.57±1.12bc

*YOSİ: Yaprak Oransal Su İçeriği, NK: Negatif Kontrol, PK: Pozitif Kontrol

**Duncan çoklu karşılaştırma testine göre aynı sütundaki aynı harfler arasındaki fark önemsizdir (p<0.05)

4.4 Patojen ve Kuraklık Stresine Maruz Kalan Hıyar Bitkilerine EB'nin Etkilerinin Değerlendirilmesi

Yapılan çalışmalar sonucu *PsI*'nin neden olduğu hastalığa ve %3 PEG ile sağlanan kuraklık stresine karşı en etkili izolatın V33K2 olduğu belirlenmiştir. Çalışmanın bu aşamasında biyotik ve abiyotik strese maruz kalan bitkilerde seçilen EB V33K2 izolatının bitki gelişimi, belirti oluşumu, *PsI* popülasyon yoğunluğu, ilgili enzimatik aktiviteye ve gen ifadelerine etkisi hidroponik ortamda araştırılmıştır (Şekil 4.4). Ayrıca biyotik ve abiyotik stres faktörüne maruz kalma sırasına göre bitkiye, patojene ve EB etkinliğine olan etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla 10 uygulama grup oluşturulmuştur (Şekil 4.3). Bu gruplar abiyotik veya biyotik stresin önce uygulanmasına göre de değişmektedir.



Şekil 4.3 Biyotik ve abiyotik strese maruz kalan bitkilerde EB etkinliğinin belirlenmesine yönelik yapılan çalışmanın uygulama grupları



Şekil 4.4 Biyotik ve abiyotik strese maruz kalan bitkilerin EB etkinliğinin belirlenmesine yönelik hidroponik ortamda geliştirilmesi

4.4.1 Bitki Gelişim Parametrelerine Etkisi

Hidroponik ortamda *PsI* etmeni ve kuraklık stresi üzerine V33K2 izolatının bitki gelişim parametreleri üzerine etkisine bakıldığında; bitkinin toplam ağırlığında, en düşük değer PEG+*PsI* grubunda iken en yüksek değer ise EB ve EB+*PsI* grubunda olduğu görülmüştür. Yalnızca yeşil aksam yaş ağırlığı incelendiğinde, en yüksek değer yine EB grubunda ölçülürken en düşük değer PEG+*PsI* ve PEG gruplarında görülmüştür. Kök yaş ağırlığında en düşük ağırlık PEG+*PsI* grubuyken en yüksek ağırlık EB+PEG ve EB+*PsI*+PEG grubunda tespit edilmiştir. Yeşil aksam kuru ağırlığında en düşük ağırlık PEG+*PsI* grubundayken en yüksek EB+*PsI* ve *PsI* grubunda görülmüştür. Kök kuru ağırlığında en yüksek ağırlık EB+PEG ve EB+*PsI*+PEG grubunda iken bu grubun haricindeki gruplarda düşük ağırlık görülmüştür (Çizelge.4.16).

Kuraklık stresi en fazla biyomas kaybına neden olan stres faktörü olmuştur. Kuraklık ve Patojen uygulamasında (PEG+*PsI*) ise kuraklık stresinin önce uygulanması biyomas kaybını en üst düzeye çıkarmıştır. Benzer tablo diğer gelişim parametrelerinde de gözlenmiştir (Çizelge 4.17).

Çizelge 4.17 Patojen ve kuraklık stresine maruz kalan hıyar bitkilerine EB uygulamasının bitki gelişim parametrelerine etkisi

Uygulamalar	Tüm Ağırlık (g bitki ⁻¹)	YAYA* (g bitki ⁻¹)	KYA (g bitki ⁻¹)	YAKA (g bitki ⁻¹)	KKA (g bitki ⁻¹)
NK	9.71±0.96bc	9.16±0.85b	0.83±0.07de	0.56±0.05c-e	0.04±0.00b
EB	13.70±0.80a	12.58±0.72a	1.02±0.08de	0.69±0.04bc	0.08±0.02b
<i>PsI</i>	12.42±1.92ab	10.93±1.68ab	1.65±0.3bc	0.94±0.14a	0.07±0.01b
PEG	4.35±0.31d-f	3.15±0.21cd	1.17±0.1cd	0.39±0.04e-g	0.08±0.00b
EB+ <i>PsI</i>	11.28±0.95ab	10.03±0.86ab	1.19±0.1cd	0.78±0.07ab	0.06±0.00b
EB+PEG	6.84±0.58cd	4.55±0.34c	2.39±0.2a	0.48±0.04d-f	0.16±0.01a
<i>PsI</i> +PEG	5.35±0.52de	3.44±0.28cd	1.87±0.2b	0.39±0.03e-g	0.13±0.02a
PEG+ <i>PsI</i>	2.25±0.15f	1.60±0.06d	0.56±0.08e	0.19±0.01g	0.06±0.00b
EB+ <i>PsI</i> +PEG	6.93±0.31cd	4.71±0.18c	2.14±0.2ab	0.61±0.03b-d	0.16±0.01a
EB+PEG+ <i>PsI</i>	3.63±0.52ef	2.29±0.33cd	1.15±0.2cd	0.35±0.02fg	0.16±0.01a

* YAYA: Yeşil Aksam Yaş Ağırlığı, YAKA: Yeşil Aksam Kuru Ağırlığı, KYA: Kök Yaş Ağırlığı, KKA: Kök Kuru Ağırlığı, NK: Negatif Kontrol

**Duncan çoklu karşılaştırma testine göre aynı sütundaki aynı harfler arasındaki fark önemsizdir (p<0.05)

Yaprak alanı ölçümleri incelendiğinde gruplar arasındaki fark istatistik olarak önemli bulunmuştur. En yüksek yaprak alanına sahip uygulama EB grubunda görülürken en düşük değer PEG+*PsI* grubunda tespit edilmiştir. Kuraklık stresinin *PsI*'den önce uygulanması Yaprak alanında en fazla düşüşe neden olmuş ve bu azalış yalnız PEG veya

PsI+PEG uygulamalarından dahi daha fazladır. Bu durum ikili ve üçlü uygulama gruplarında da gözlenmiştir (Çizelge 4.18).

Çizelge 4.18 Patojen ve kuraklık stresine maruz kalan hıyar bitkilerine EB uygulamasının yaprak alanına etkisi

Uygulamalar	Yaprak Alanı (cm ²)
NK	37.92±4.41b
EB	54.53±2.88a
<i>PsI</i>	33.76±0.14b
PEG	15.54±0.57d
EB+ <i>PsI</i>	38.73±2.38b
EB+PEG	26.78±1.61c
<i>PsI</i> +PEG	13.63±1.03d
PEG+ <i>PsI</i>	3.44±0.86e
EB+ <i>PsI</i> +PEG	27.11±0.97c
EB+PEG+ <i>PsI</i>	12.71±1.03d

*Duncan çoklu karşılaştırma testine göre aynı sütundaki aynı harfler arasındaki fark önemsizdir (p<0.05).

4.4.2 Patojen ve Kuraklık Stresine Maruz Kalan Hıyar Bitkilerinde EB Uygulamasının Hastalık Şiddetine Etkisi

Çizelge 4.19 incelendiğinde uygulama grupları arasında zaman noktalarına göre istatistik olarak fark önemli bulunmuştur. Tüm gözlem noktalarında en yüksek hastalık şiddeti PEG+*PsI* uygulamasında olmuştur. En düşük hastalık şiddeti EB+*PsI* grubunda olmuş bunu takiben EB+*PsI*+PEG, *PsI*+PEG ve *PsI*'de gözlenmiştir. 4, 7, 14. ve 21. günlerde en düşük EB+*PsI* ve EB+*PsI*+PEG'te görülmüştür. İkili stres altında ise önce kuraklık stresine maruz kalan bitkilerde *PsI*'nin neden olduğu hastalık şiddetinde tüm uygulamalara göre önemli bir artış gözlenmiştir (Şekil 4.5). Buna karşılık önce *PsI*'ye maruz kalan bitkilerde ise PK'ya göre önemli bir istatistiki fark gözlenmemiştir. Tüm zaman noktalarından alınan hastalık şiddeti ölçümleri ile hesaplanan AUDPC göre en yüksek değer PEG+*PsI* grubunda iken en düşük değer EB+*PsI* grubunda görülmüştür.

Çizelge 4.19 Patojen ve kuraklık stresine maruz kalan hıyar bitkilerine EB uygulamasının hastalık şiddetine etkisi ve AUDPC değerleri

UYGULAMA	4.gün	7.gün	14.gün	21.gün	AUDPC
<i>PsI</i>	18.97±1.17b-d	25.42±1.23c	34.02±2.46c	32.20±5.70c	506.41
<i>PsI</i> +PEG	16.14±1.29cd	18.95±1.38c	36.86±4.72bc	34.31±2.39c	497.15
PEG+ <i>PsI</i>	25.66±1.43a	59.51±6.42a	72.83±6.55a	91.84±2.40a	1167.34

Çizelge 4.20 Patojen ve kuraklık stresine maruz kalan hıyar bitkilerine EB uygulamasının hastalık şiddetine etkisi ve AUDPC değerleri (devamı)

UYGULAMA	4.gün	7.gün	14.gün	21.gün	AUDPC
EB+ <i>PsI</i>	16.10±1.64cd	16.66±1.02c	16.17±1.12d	15.73±1.75d	275.76
EB+ <i>PsI</i> +PEG	14.36±1.84d	17.71±1.12c	27.23±4.04cd	28.23±3.71c	399.52
EB+PEG+ <i>PsI</i>	18.21±1.38b-d	39.11±5.17b	48.53±6.10b	52.77±7.43b	747.27

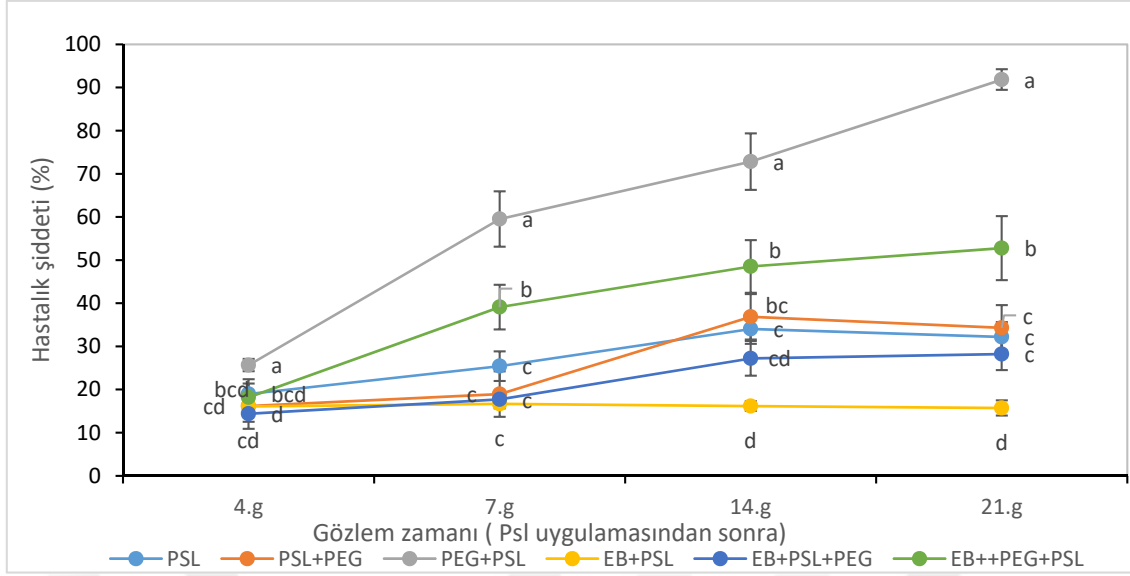
**Duncan çoklu karşılaştırma testine göre aynı sütundaki aynı harfler arasındaki fark önemsizdir (p<0.05).

Çizelge 4.20’de uygulama gruplarının *PsI*’ ye göre etkileri AUDPC sonuçlarına göre yüzde etkisine bakılmıştır. EB+*PsI* hastalık şiddetinin %46 oranında düşürmüştür. PEG+*PsI* hastalık şiddetini % 131 oranında arttırmıştır. EB uygulanmamış gruplara göre yüzde etkiye bakıldığında EB+*PsI*, *PsI*’ye göre hastalık şiddetini %46 oranında düşürmüştür. EB+*PsI*+PEG, *PsI*+PEG’e göre hastalık şiddetini %20 oranında azaltmıştır. EB+PEG+*PsI*, PEG+*PsI*’ye göre hastalık şiddetini %36 düşürmüştür.

Çizelge 4.21 Patojen ve kuraklık stresine maruz kalan hıyar bitkilerine EB uygulamasının AUDPC sonuçlarında *PsI* ’ye göre ve EB uygulanmamış gruplara göre % etki hesaplamaları

Uygulama	<i>PsI</i> ’ye göre yüzde etki (%)	EB uygulanmamış gruplara göre yüzde etki (%)
<i>PsI</i>	-	-
EB+ <i>PsI</i>	%46	%46
<i>PsI</i> +PEG	%1,78	
EB+ <i>PsI</i> +PEG	%21	%20
PEG+ <i>PsI</i>	-%131	
EB+PEG+ <i>PsI</i>	-%48	%36

Genel olarak önce kuraklık stresine maruz kalan gruplarda hastalık şiddetinde artış olduğu gözlenmiştir. Ayrıca EB uygulanan tüm guruplarda hastalık şiddetini önemli düzeyde azaldığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.5 Patojen ve kuraklık stresine maruz kalan hıyar bitkilerine EB V33K2 uygulamasının hastalık HKYL hastalığı üzerine 4., 7., 14. ve 21. günlerdeki etkisinin grafiği

4.4.3 Patojen ve Kuraklık Stresine Maruz Kalan Hıyar Bitkilerinde EB Uygulamasının Kuraklık Belirtilerine Olan Etkisi

Psl etmeni ve %3 PEG kuraklık dozu uygulanan hıyar bitkilerinde EB V33K2 izolatının kuraklık şiddeti üzerine etkileri 4., 7., 14. ve 21. günlerde yapılan gözlemlerle belirlenmiştir. Çizelge 4.21 incelendiğinde 4., 7., 14. ve 21. günde alınan kuraklık şiddeti ölçümlerine göre en yüksek kuraklık şiddeti bütün zaman noktalarında PEG+*Psl* grubunda olmuştur. 4. günde en düşük kuraklık şiddeti EB+*Psl*+PEG’ te görülmüştür. 7. ve 21. günde en düşük kuraklık şiddeti EB+PEG grubunda olmuştur. AUDPC değerlerine göre en yüksek belirti artışı PEG+*Psl* grubunda iken en düşük artış değeri EB+*Psl* grubunda görülmüştür (Şekil 4.6).

Çizelge 4.22 Patojen ve kuraklık stresine maruz kalan hıyar bitkilerine EB uygulamasının kuraklık şiddetine etkisi ve AUDPC sonuçları

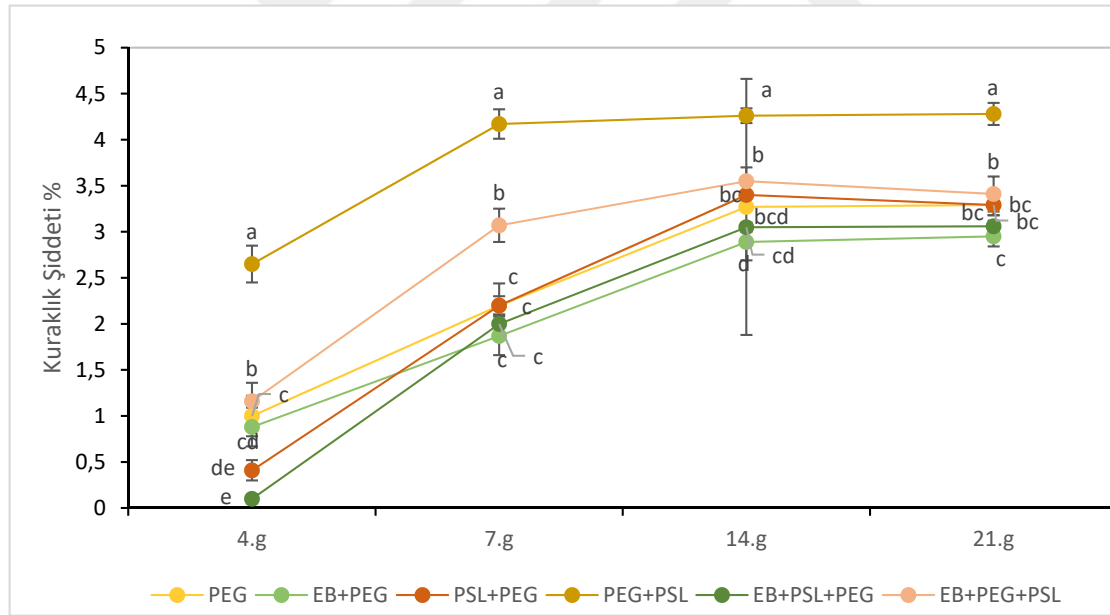
Uygulamalar	4.Gün	7.Gün	14.Gün	21.Gün	AUDPC
PEG	1.00±0.22c	2.20±0.24c	3.27±1.39b-d	3.29±0.11bc	46.59
EB+PEG	0.88±0.21cd	1.87±0.21c	2.89±0.20d	2.95±0.11c	41.34
<i>Psl</i> +PEG	0.41±0.11de	2.20±0.10c	3.40±0.13bc	3.29±0.11bc	47.05
PEG+ <i>Psl</i>	2.65±0.20a	4.17±0.16a	4.26±0.08a	4.28±0.12a	69.66
EB+ <i>Psl</i> +PEG	0.10±0.05e	2.00±0.10c	3.05±0.05cd	3.06±0.06bc	42.01
EB+PEG+ <i>Psl</i>	1.16±0.20b	3.07±0.18b	3.55±0.15b	3.41±0.19b	54.55

*Duncan çoklu karşılaştırma testine göre aynı sütundaki aynı harfler arasındaki fark önemsizdir ($p < 0.05$)

Çizelge 4.22'ye göre %3 PEG uygulanan gruplar arasında AUDPC sonuçlarına göre yüzde etki hesaplanmıştır. PEG'e göre kıyaslanan gruplar arasında EB+PEG kuraklık şiddetini %11 oranında azaltmıştır. PEG+*PsI* grubunda ise kuraklık şiddeti PEG grubuna göre %50 artmıştır. *PsI*+PEG'e göre EB+*PsI*+PEG, kuraklık şiddetini yine %11. EB+PEG+*PsI* %22 oranında düşürmüştür.

Çizelge 4.23 Patojen ve kuraklık stresine maruz kalan hıyar bitkilerine EB uygulamasının AUDPC sonuçlarının PEG'e ve EB uygulanmamış gruplara göre % etki hesaplamaları

Uygulamalar	PEG'e göre yüzde etki %	EB uygulanmamış gruplara göre yüzde etki (%)
PEG	-	-
EB+PEG	%11	%11
<i>PsI</i> +PEG	-%1	
EB+ <i>PsI</i> +PEG	%10	%11
PEG+ <i>PsI</i>	-%50	
EB+PEG+ <i>PsI</i>	-%17	%22



Şekil 4.6 Patojen ve kuraklık stresine maruz kalan hıyar bitkilerine EB V33K2 uygulamasının kuraklık şiddetinin 4.,7.,14. ve 21. günlerdeki etkisinin grafiği

4.4.4 EB ve PEG uygulamasının *PsI* Popülasyonu Üzerine Etkisi

PsI etmeninin ve %3 PEG uygulanan hıyar bitkilerine EB V33K2 izolatının *PsI*'nin popülasyon yoğunluğuna etkisi 24h. 4.gün. 7. gün ve 15. günlerde yapılan

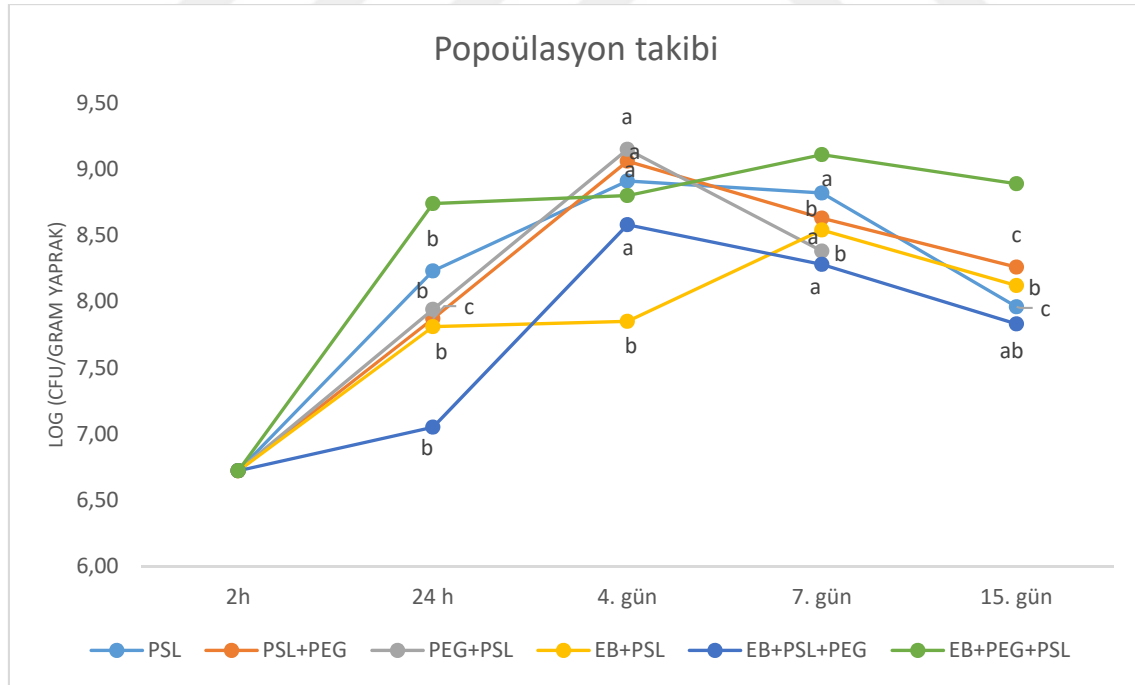
gözlemler ile belirlenmiştir. Popülasyon değerleri “cfu/g yaş yaprak” olarak elde edilmiş ve logaritmik dönüşümleri yapılmıştır. Yapraklardaki *Psl* popülasyonunun zaman noktalarına göre değişimi çizelge 4.22 incelendiğinde *Psl*, *Psl*+PEG, PEG+*Psl*, EB+*Psl*, EB+*Psl*+PEG gruplarında istatistik olarak fark önemli bulunmuştur. *Psl* ve EB+*Psl*+PEG gruplarında 4. günde popülasyon artışı gözlenmiş 7. günde durmuş 15 günde ise azalış gözlenmiştir. *Psl*+PEG, PEG+*Psl* uygulamalarında yine 4. günde popülasyonda artış tespit edilmiş fakat 7. günde azalış başlamış 15.günde ise durmuştur. EB+*Psl* grubunda ise popülasyondaki artış 7. Günde başlamış 15. günde azalmıştır (Çizelge 4.23, Şekil 4.7).

Çizelge 4.24 EB ve PEG uygulaması yapılan gruplarda *Psl*'nin zaman noktalarını göre popülasyon düzeyler

	<i>Psl</i>	<i>Psl</i> +PEG	PEG+ <i>Psl</i>	EB+ <i>Psl</i>	EB+ <i>Psl</i> +PEG	EB+PEG+ <i>Psl</i>
24.saat	8.23±0.08b	7.87±0.11c	7.94±0.08b	7.81±0.06b	7.05±0.36b	8.74±0.07
4.GÜN	8.91±0.04a	9.06±0.12a	9.15±0.06a	7.85±0.15b	8.58±0.30a	8.80±0.15
7.GÜN	8.82±0.13a	8.63±0.09b	8.38±0.21b	8.54±0.06a	8.28±0.33a	9.11±0.35
15.GÜN	7.96±0.06c	8.26±0.16bc	TE	8.12a±0.16b	7.83±0.14ab	8.14±0.05

*TE: Tespit Edilmemiştir

*Duncan çoklu karşılaştırma testine göre aynı sütundaki aynı harfler arasındaki fark önemsizdir (p<0.05)



Şekil 4.7 EB ve PEG uygulaması yapılan gruplarda *Psl*'nin zaman noktalarına göre popülasyon düzeylerinin grafiği

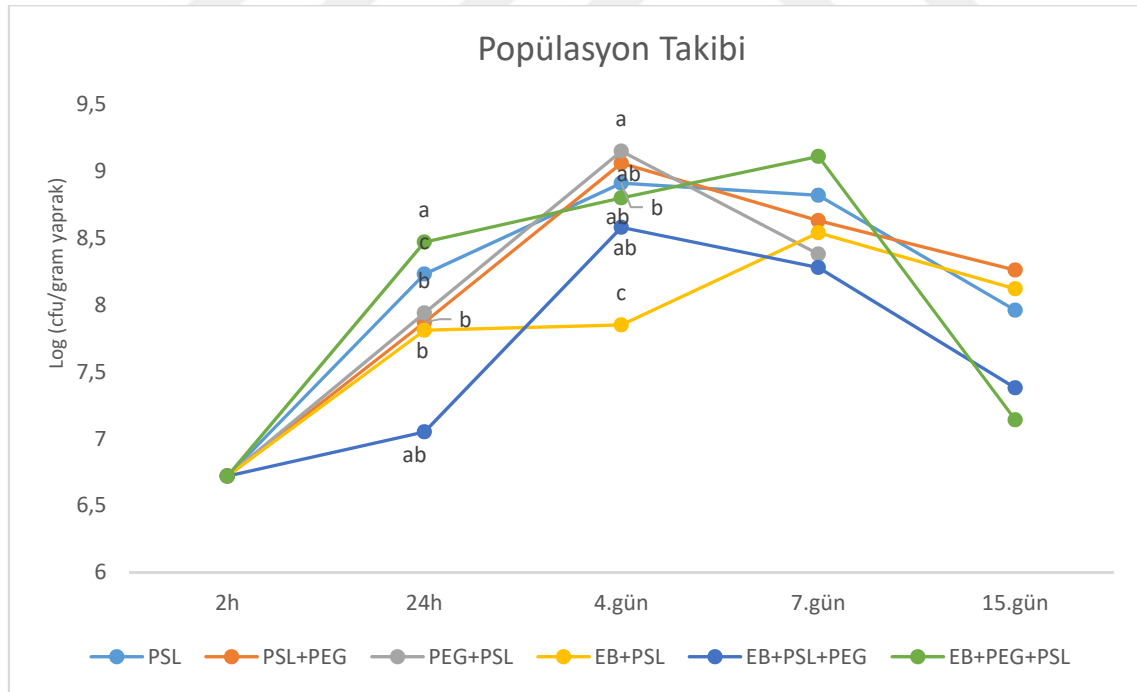
Çizelge 4.24 incelendiğinde, örnekleme zaman noktalarında uygulamalara göre fark istatistiki olarak önemli bulunmuştur. *PsI*'nin uygulanmasından sonra yaprağa tutunduğu görülmüştür. 24 saatte en yüksek popülasyon EB+PEG+*PsI*' de görülürken en düşük popülasyon EB+*PsI*+PEG'te görülmüştür. 4. günde PEG+*PsI* en yüksek popülasyona sahipken EB+*PsI* en düşük popülasyona sahiptir. 7. günde EB+PEG+*PsI* en yüksek popülasyona sahipken en düşük EB+*PsI*+PEG'tir. 15. günde ise en yüksek popülasyon EB+PEG+*PsI*'de iken en düşük EB+*PsI*+PEG'tedir (Şekil 4.8).

Çizelge 4.25 EB ve PEG uygulaması yapılan uygulamalarda *PsI*'nin zaman noktalarından alınan örneklerin gruplara göre takibi

	24h	4.gün	7.gün	15.gün
<i>PsI</i>	8.23±0.08ab	8.91±0.04ab	8.82±0.13	7.96±0.06
<i>PsI</i> +PEG	7.87±0.11b	9.06±0.12ab	8.63±0.09	8.26±0.16
PEG+ <i>PsI</i>	7.94±0.08b	9.15±0.06a	8.38±0.21	TE
EB+ <i>PsI</i>	7.81±0.06b	7.85±0.15c	8.54±0.06	8.12±0.16
EB+ <i>PsI</i> +PEG	7.05±0.36c	8.58±0.30b	8.28±0.33	7.38±0.14
EB+PEG+ <i>PsI</i>	8.47±0.07a	8.80±0.15ab	9.11±0.35	7.14±0.06

*TE: Tespit Edilmemiştir.

*Duncan çoklu karşılaştırma testine göre aynı sütundaki aynı harfler arasındaki fark önemsizdir (p<0.05)



Şekil 4.8 EB ve PEG uygulaması yapılan uygulamalarda *PsI*'nin zaman noktalarından alınan örneklerin gruplara göre grafiği

4.4.5 Patojen ve Kuraklık Stresine Maruz Kalan Hıyar Bitkilerinde EB'in Klorofil *a*, *b* Toplam Klorofil ve Karotenoid İçeriklerine Etkileri

Çizelge 4.25 incelendiğinde *Psl* etmeni ve %3 PEG kuraklık dozu uygulanan hıyar bitkileri üzerine V33K2 izolatının klorofil *a*, toplam klorofil ve karotenoid üzerine etkisi istatistik olarak önemli bulunmuştur. Ancak klorofil *b*'de bu etki önemsiz bulunmuştur. Klorofil-*a* içeriği en yüksek grup EB+*Psl* olmuştur. Toplam klorofil içeriğine bakıldığında, en yüksek içerik ise EB+*Psl* ve EB grubunda tespit edilmiştir. Karotenoid içeriği olarak en yüksek değer EB+*Psl* grubunda iken en düşük PEG+*Psl* grubunda gözlenmiştir.

Çizelge 4.26 Patojen ve kuraklık stresine maruz kalan hıyar bitkilerine EB uygulamasının klorofil *a*, klorofil *b*, toplam klorofil ve karotenoid üzerine etkisi

Uygulamalar	Klorofil- <i>a</i>	Klorofil- <i>b</i>	Toplam Klorofil	Karotenoid
NK	0.70±0.02bc	0.26±0.01	0.96±0.03b	4.85±0.34cd
EB	0.95±0.05b	0.36±0.01	1.32±0.03ab	6.34±0.37b
<i>Psl</i>	0.89±0.09bc	0.32±0.03	1.21±0.13b	5.80±0.67cd
PEG	0.74±0.07bc	0.35±0.11	1.10±0.17b	4.97±0.61cd
EB+ <i>Psl</i>	1.22±0.18a	0.50±0.09	1.71±0.27a	8.89±1.42a
EB+PEG	0.74±0.07bc	0.26±0.02	1.00±0.09b	4.99±0.43cd
<i>Psl</i> +PEG	0.73±0.05bc	0.26±0.01	1.00±0.07b	4.92±0.32cd
PEG+ <i>Psl</i>	0.61±0.07c	0.24±0.02	0.86±0.10b	4.17±0.32d
EB+ <i>Psl</i> +PEG	0.79±0.04bc	0.23±0.01	0.89±0.05b	4.29±0.51cd
EB+PEG+ <i>Psl</i>	0.65±0.04c	0.40±0.14	1.20±0.18b	5.53±0.51cd

*Duncan çoklu karşılaştırma testine göre aynı sütundaki aynı harfler arasındaki fark önemsizdir (p<0.05)

4.4.6 EB ve İkili Stress Altındaki Hıyar Bitkilerinde MDA, SOD VE CAT Enzim Düzeyleri

Bu çalışma ile *Psl* ve kuraklık strasi altında EB V33K2 izolatının uygulandığı ve uygulanmadığı gruplardaki MDA oranı araştırılmıştır. PEG ve EB+PEG grubu en yüksek MDA değerine sahip uygulamalar olmuştur. En düşük MDA değeri ise EB grubunda tespit edilmiştir. Uygulamaların antioksidan enzimlerden olan süperoksit dismütaz (SOD) ve katalaz (KAT) aktivitesi üzerine etkileri ise istatistik olarak önemsiz bulunmuştur (Çizelge 4.26).

Çizelge 4.27 Patojen ve kuraklık stresine maruz kalan hıyar bitkilerine EB uygulamasının MDA, SOD ve CAT üzerine etkisi

Uygulamalar	MDA *	SOD	CAT
NK	25.37±4.99cd	47.10±5.12	0.015±0.00
EB	6.49±2.65d	45.09±5.10	0.008±0.00
<i>PsI</i>	48.42±31.71c	70.11±19.11	0.013±0.00
PEG	201.72±23.22a	40.00 ±2.4	0.014±0.00
EB+ <i>PsI</i>	10.32±2.386cd	46.52 ±5.34	0.080±0.01
EB+PEG	207.09±18.09a	59.41±3.13	0.010±0.00
<i>PsI</i> +PEG	25.33±12.01cd	48.07±6.98	0.021±0.00
PEG+ <i>PsI</i>	175.61±20.14ab	48.06±6.95	0.008±0.00
EB+ <i>PsI</i> +PEG	176.90±47.02ab	61.60 ±9.71	0.013±0.00
EB+PEG+ <i>PsI</i>	95.69±58.31bc	38.19 ±2.58	0.012±0.00

*MDA: Malondialdehit. SOD: Süperoksit dismutaz. CAT: Katalaz

*Duncan çoklu karşılaştırma testine göre aynı sütundaki aynı harfler arasındaki fark önemsizdir (p<0.05)

4.4.7 EB Uygulaması ve İkili Stress Altındaki Hıyar Bitkilerinde Prolin Düzeyi

PsI etmeni ve %3 PEG uygulaması ile oluşturulan kuraklık stresi altındaki hıyar bitkilerinde EB V33K2 izolatının prolin miktarı üzerine etkisine bakılmıştır. Uygulama grupları arasında en yüksek prolin birikimi EB+PEG+*PsI* grubunda olmuştur. En düşük ise hiçbir uygulamanın olmadığı NK grubunda olmuştur (Çizelge 4.27).

Çizelge 4.28 Patojen ve kuraklık stresine maruz kalan hıyar bitkilerine EB uygulamasının gruplar üzerinde prolin içeriği

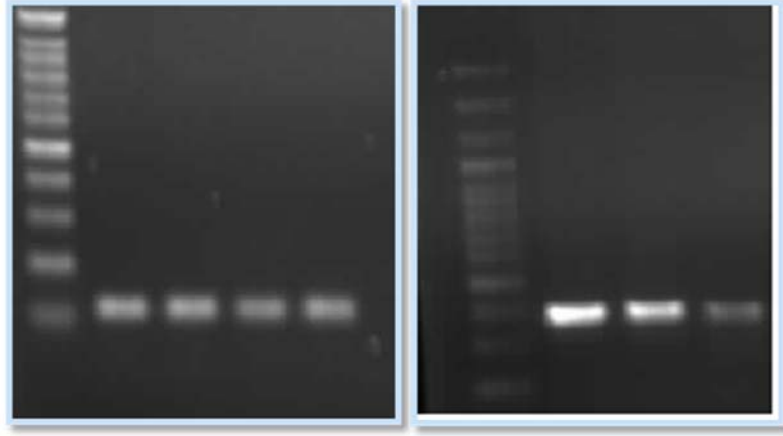
Uygulamalar	Prolin
NK	47.92±4.98e
EB	83.48±8.15c-e
<i>PsI</i>	159.4±34.46b-d
PEG	51.25±8.66de
EB+ <i>PsI</i>	64.59±8.15c-e
EB+PEG	148.29±30.09b-e
<i>PsI</i> +PEG	67.55±6.18c-e
PEG+ <i>PsI</i>	161.63±39.17bc
EB+ <i>PsI</i> +PEG	225.7±34.87b
EB+PEG+ <i>PsI</i>	482.74±73.73a

*Duncan çoklu karşılaştırma testine göre aynı sütundaki aynı harfler arasındaki fark önemsizdir (p<0.05)

4.4.8 Patojen ve Kuraklık Stresine Maruz Kalan ve EB Uygulanan Hıyar Bitkilerinde PR-1, LOX-1, SNRK-2, ACS-3 Genlerinin İfade Düzeyleri

Çalışmanın bu bölümünde ardışık olarak maruz kalan biyotik ve abiyotik stres altındaki hıyar bitkilerine uygulanan EB V33K2 izolatının PR-1, LOX-1, SNRK-2 ve

ACS-3 genlerinin ifade düzeyleri üzerine etkisi incelenmiştir. Toplam RNA'dan oluşturulan cDNA kütüphanesinin başarısını kontrol etmek için çalışmada kullanılan farklı primerlerle rastgele seçilen cDNA örnekleri PCR çalışmasıyla denenerek doğrulanmıştır (Şekil 4.9).

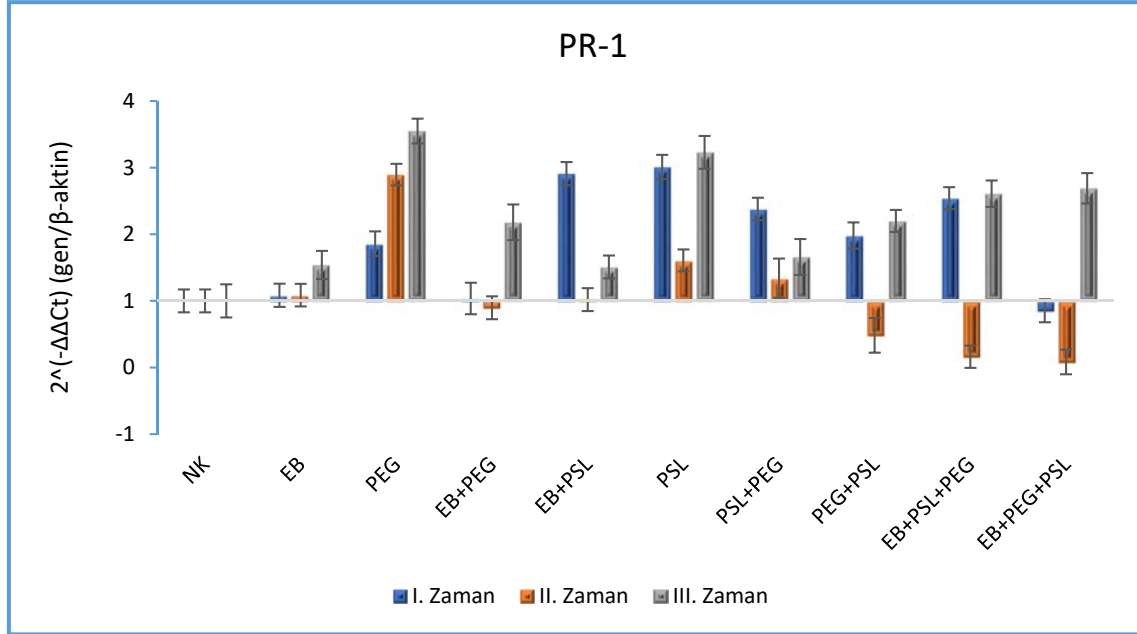


Şekil 4.9 Farklı primerlerle cDNA sentezinin onayı

Gen ifadelerinin belirlenmesi için 3 zaman noktasından örnekleme yapılmıştır. 1. Zaman noktası için alınan örnekler. 1. stresin (abiyotik veya biyotik) uygulanmasından 24 saat sonra alınmıştır. 2. Zaman noktası için örnekler 2. stres (abiyotik veya biyotik) uygulamasından 6 saat sonra alınmıştır. Bu ise 1. Zaman noktasından 72 saat sonraya karşılık gelmektedir. 3. zaman noktası için alınan örnekler ise 2. stresten 24 saat sonra alınmıştır. Bu da 1. örnekleme zamanından 96 saat sonraya karşılık gelmektedir. Genlerin ekspresyonuna bağlı değişiklikler “ $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ ” metodu (Livak vd., 2001) kullanılarak hesaplanmış internal housekeeping gen (Actin) ile normalizasyon çalışması için NK referans alınmıştır (Livak ve Schmittgen. 2001).

PR-1 geni stres kaynağı olan patojenin yoğunluğuna bağlı olarak salisik asitin artmasıyla PR proteinlerinin sentezini kodlayan bu gen aktive olup birikmeye başlar. PR-1 geninin $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ ’ ye göre hesaplanması ile şekil 4.4’e göre 24. saatte EB+PEG+*PsI* grubu haricindeki grupların hepsinin ekspresyon seviyelerindeki artışa bağlı olarak yukarı regüle olmuştur. *PsI* grubu. 3.01 kat ve EB+*PsI* grubu 2.91 kat ile ekspresyon seviyelerini en fazla arttıran gruplar olmuştur (Çizelge 4.28). EB+PEG+*PsI* grubu ise 0.85 kat ile ekspresyon seviyesi en düşük grup olmuştur. 72. saatte; EB. PEG. EB+*PsI*. *PsI*. *PsI*+PEG grupları yukarı regüle olurken. EB+PEG. PEG+*PsI*. EB+*PsI*+PEG. EB+PEG+*PsI*

grupları aşağı regüle olmuştur. PEG grubu. 2.90 kat ile ekspresyon seviyesi en fazla arttıran grup olmuştur. EB+PEG+*PsI* grubu 0.08 kat azalışla ekspresyon seviyesini en düşüren grup olmuştur. 96. saatte ise NK' ya göre tüm gruplar yukarı regüle olmuştur. Ekspresyon seviyelerindeki en yüksek artış. 3.55 kat ile PEG grubunda ve 3.23 kat ile *PsI* grubunda olmuştur (Şekil 4.10).



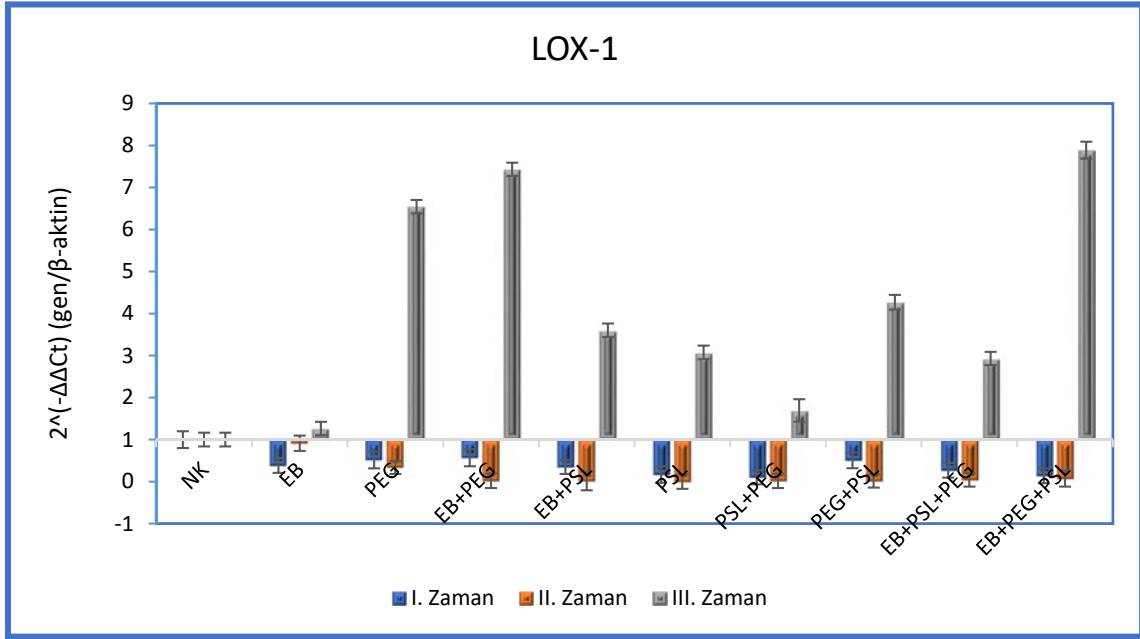
Şekil 4.10 Belirli zaman noktalarından alınan örneklerden PR-1 geninin gen ekspresyonu ifadeleri

Çizelge 4.29 PR-1 geninin $2^{(-\Delta\Delta C_t)}$ ' ye göre hesaplanması

	$2^{(-\Delta\Delta C_t)}$		
	I.zaman	II.zaman	III.zaman
NK	1.00	1.00	1.00
EB	1.08	1.09	1.54
PEG	1.86	2.90	3.55
EB+PEG	1.04	0.90	2.18
EB+ <i>PsI</i>	2.91	1.02	1.51
<i>PsI</i>	3.01	1.61	3.23
<i>PsI</i> +PEG	2.38	1.34	1.66
PEG+ <i>PsI</i>	1.98	0.48	2.20
EB+ <i>PsI</i> +PEG	2.54	0.16	2.61
EB+PEG+ <i>PsI</i>	0.85	0.08	2.69

Lipoksijenaz (LOX) yolları enfeksiyona karşı savunma yanıtları sırasında lipid peroksidasyon süreçleri için çok önemlidir ve patojen büyümesini sınırlar. LOX-1 geninin $2^{(-\Delta\Delta C_t)}$ ' ye göre hesaplanması sonucu oluşturulan grafiği incelediğimizde 24.

ve 72. saatlerde NK'ya göre önemsiz bir azalış gözlenmiştir. Ancak 96. saatte tüm gruplar yukarı yönlü regüle olmuştur. EB+PEG 7.43 kat ile PEG'e göre. EB+*PsI* 3.60 kat ile *PsI*'ye göre. EB+*PsI*+PEG 2.93 kat ile *PsI*+PEG'e göre. EB+PEG+*PsI* 7.89 kat ile PEG+*PsI*'ye göre indüklenmeyi arttırdığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.29. Şekil 4.11).



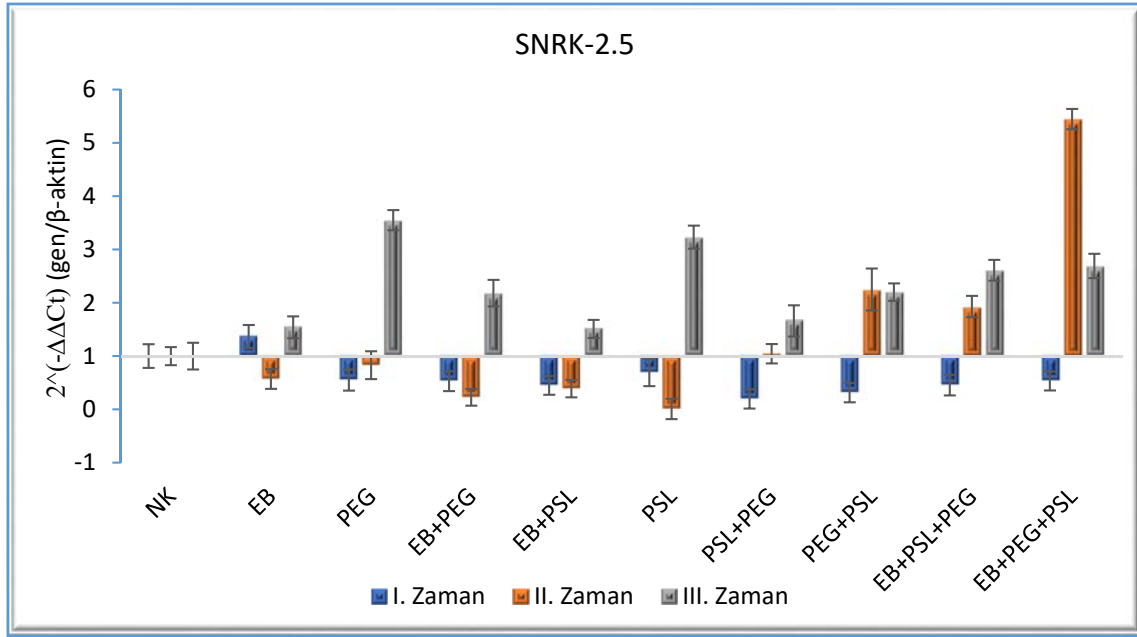
Şekil 4.11 Belirli zaman noktalarından alınan örneklerden LOX-1 geninin gen ekspresyonu ifadeleri

Çizelge 4.30 LOX-1 geninin $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ ' ye göre hesaplanması

	$2^{(-\Delta\Delta Ct)}$		
	I.zaman	II.zaman	III.zaman
NK	1.00	1.00	1.00
EB	0.38	0.91	1.26
PEG	0.52	0.34	6.54
EB+PEG	0.57	0.02	7.43
EB+ <i>PsI</i>	0.35	0.02	3.60
<i>PsI</i>	0.17	0.00	3.07
<i>PsI</i> +PEG	0.10	0.02	1.69
PEG+ <i>PsI</i>	0.51	0.02	4.27
EB+ <i>PsI</i> +PEG	0.27	0.04	2.93
EB+PEG+ <i>PsI</i>	0.14	0.07	7.89

SnRK-2. ABA'nın hücre içi reseptörü olarak görev alır. SNRK-2 geni 24. saatte. NK grubuna göre diğer gruplar karşılaştırıldığında sadece EB grubu yukarı regüle olmuştur ve ekspresyon seviyesini 1.37 kat arttırmıştır. EB grubunun haricindeki diğer grupların hepsinin aşağı regüle olduğu görülmüştür. 72. saat incelediğinde; EB. PEG.

EB+PEG. EB+*PsI*. *PsI* grupları aşağı regüle olurken *PsI*+PEG. PEG+*PsI*. EB+*PsI*+PEG. EB+PEG+*PsI* grupları yukarı regüle olmuştur. 96. saatte ise tüm gruplar yukarı regüle olmuştur. 72. saatte ve 96. Saatte EB+PEG+*PsI* PEG+*PsI*'ye göre EB+*PsI*+PEG ise *PsI*+PEG'e göre indüklenmeyi arttırdığı gözlenmiştir. (Çizelge 4.30. Şekil 4.12).



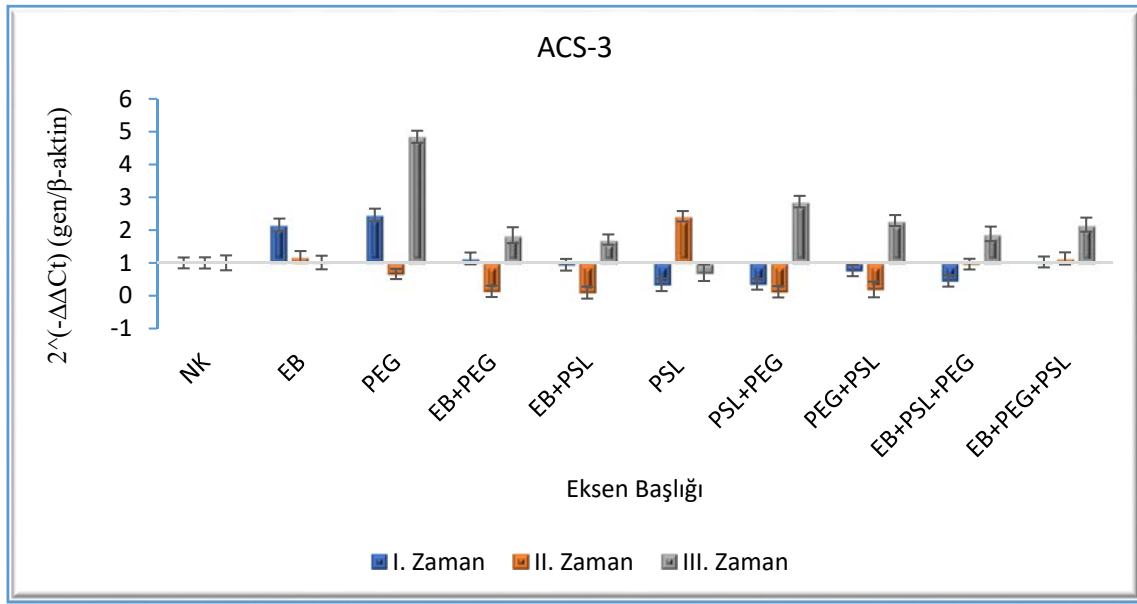
Şekil 4.12 Belirli zaman noktalarından alınan örneklerden SNRK-2 geninin gen ekspresyonu ifadeleri

Çizelge 4.31 SNRK-2 geninin $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ 'ye göre hesaplanması

	$2^{(-\Delta\Delta Ct)}$		
	I.zaman	II.zaman	III.zaman
NK	1	1	1
EB	1.37	0.57	1.54
PEG	0.55	0.83	3.55
EB+PEG	0.53	0.23	2.18
EB+ <i>PsI</i>	0.45	0.39	1.51
<i>PsI</i>	0.69	0.01	3.23
<i>PsI</i> +PEG	0.20	1.04	1.66
PEG+ <i>PsI</i>	0.31	2.25	2.2
EB+ <i>PsI</i> +PEG	0.46	1.93	2.61
EB+PEG+ <i>PsI</i>	0.53	5.45	2.69

ACS-3 geninin. $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ ' ye göre hesaplanması ile ortaya çıkan grafik incelendiğinde. 24. saatte EB. PEG. EB+PEG. EB+PEG+*PsI* grupları yukarı regüle olmuştur. PEG 2.46 kat ile ve EB 2.16 kat ile NK'ya göre en fazla ekspresyonu arttıran gruplar olmuştur. EB+*PsI*. *PsI*. *PsI*+PEG. PEG+*PsI*. EB+*PsI*+PEG grupları ise aşağı

regüle olmuştur. *Psl* grubu. 0.33 kat ile ekspresyonu en fazla düşüren grup olmuştur. 72. saat'te EB. *Psl*. EB+PEG+*Psl* grupları NK'ya göre ekspresyonu arttırarak yukarı regüle olmuşlardır. PEG grubu. 2.46 kat ile ekspresyon seviyesini en fazla arttıran grup olmuştur. PEG. EB+PEG. EB+*Psl*. *Psl*+PEG. PEG+*Psl* grupları ise aşağı regüle olmuşlardır. 96. saat'te ise *Psl* haricinde tüm gruplarda ekspresyon seviyesi yukarı regüle olmuştur. PEG grubu ise 4.85 kat artış ile ekspresyon seviyesini en fazla arttıran grup olmuştur (Çizelge 4.31. Şekil 4.13).



Şekil 4.13 Belirli zaman noktalarından alınan örneklerden ACS-3 geninin gen ekspresyonu ifadeleri

Çizelge 4.32 ACS-3 geninin $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ ' ye göre hesaplanması

	$2^{(-\Delta\Delta Ct)}$		
	I.zaman	II.zaman	III.zaman
NK	1.00	1.00	1.00
EB	2.16	1.18	1.01
PEG	2.46	0.66	4.85
EB+PEG	1.13	0.13	1.84
EB+ <i>Psl</i>	0.94	0.10	1.71
<i>Psl</i>	0.33	2.42	0.70
<i>Psl</i> +PEG	0.35	0.12	2.87
PEG+ <i>Psl</i>	0.76	0.19	2.29
EB+ <i>Psl</i> +PEG	0.45	0.96	1.88
EB+PEG+ <i>Psl</i>	1.03	1.13	2.16

4.4.9 EB İzolat V33K2'nin Moleküler Tanılaması

HKYL hastalığına ve kuraklık stresine karşı sınanan EB izolatlarının içinden en başarılı V33K2 izolatının PCR ürününün dizi analizi yapılmıştır. PCR ürününün Sanger yöntemi ile sekans analizleri sonucuna göre V33K2 izolatı *Acinetobacter calcoaceticus* olduğu tespit edilmiştir.





5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Doğada, bitkiler genellikle aynı anda çoklu biyotik ve abiyotik stres koşullarına maruz kalır (Pandey vd.,2015). Bu stres faktörleri ile yapılan çalışmalarda genellikle tek stres faktörü (biyotik veya abiyotik) hedef alınarak mücadele olanakları araştırılmaktadır. Fakat tek stres faktörü ile yapılan çalışmalar bitki üzerinde o stresin etkisini veya kontrol potansiyelini göstermektedir. Ancak yapılan bu çalışmalar ile elde edilen veriler bitkinin veya yapılan uygulamanın doğal koşullardaki performansını tam olarak ortaya koymaz. Uygulamaların etkisinin veya bitkinin tepkisinin doğal koşullarda öngörebilmek için birden fazla stres faktörünün eşzamanlı olarak incelenmesi ve etkileşimlerinin değerlendirilmesi gerekmektedir. Böylelikle çoklu stres altında bitkinin zarar görmesi ve verim kaybı gibi durumlarda bitkiyi koruyacak daha gerçekçi önlemler geliştirmek mümkün olacaktır.

Stres faktörleri ile mücadele veya önlemler içerisinde yer alan sentetik gübre ve pestisitlerin kötüye kullanılması ciddi ekonomik zarara ve ekolojik tahribatlara neden olmaktadır (Yu vd., 2022). Son yıllarda yapılan umut verici çalışmalar ile hem biyotik hem de abiyotik streslere karşı sürdürülebilir çözüm çerçevesinde verimi ve toleransı artırmak için bitki büyümesini teşvik eden rizobakterlerin (PGPR) kullanımı ön plana çıkmaktadır. Diğer epifit PGPR'lere göre bazı avantajlara sahip olan ve PGPR kapsamında değerlendirilen endofit bakteriler (EB) ise her geçen gün artan bir ilgiyi üzerine çekmektedir.

Bu tez kapsamında dünya çapında yaygın bir stres faktörü olan *PsI*'nin neden olduğu HKYL hastalığı ve tarımsal üretimde ciddi verim kayıplarına sebep olan abiyotik stres faktörlerinin başında gelen kuraklık stresi hıyar bitkilerine hem tekli hem de birlikte ikili stres şekilde uygulanmıştır. Bu uygulamalarda önce kuraklık sonra patojen ve önce patojen sonra kuraklık kombinasyonları yapılarak streslerin birbirlerine olan etkilerini anlamamıza olanak sağlanmıştır. Ayrıca tekli ve ikili stres gruplarına EB uygulanarak bitkiye olan etkisi ve koruma potansiyeli incelenmiştir.

Çalışmamızda da hastalık şiddeti tablosuna bakıldığında kuraklığın patojenden önce uygulandığı gruplarda (PEG+*PsI* ve EB+PEG+*PsI*) hastalık belirtileri patojenin önce uygulandığı gruplara (*PsI*+PEG ve EB+*PsI*+PEG) göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Kısmen benzer olarak yürütülen bir çalışmada HKYL hastalığına ve NaCl

stresine eşzamanlı maruz kalan bitkilerde tuz stresinin hastalık belirtilerini arttırdığı tespit edilmiştir (Skłodowska vd., 2019). Ayrıca kuraklık stresinin aspir bitkisinde *Phytophthora cryptogea* (kök çürüklüğü) düşük inokulum seviyesinde bile ciddi hastalıklara yol açmasına sebep olmuştur (Duniway. 1977). Kuraklık stresi altındaki Arabidopsis bitkilerinin. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*'ya duyarlılığının arttırdığı tespit edilmiştir (Mohr ve Cahill. 2003). Araştırmacılar bu duyarlılık artışının abiyotik stresin bitki savunmasını zayıflatmasından kaynaklı olabileceğini bildirmiştir (Mittler ve Zilinskas. 1994b; Amtmann vd., 2008; Goel vd., 2008).

Diğer taraftan biyotik stresin önce olduğu senaryoda *A. thaliana*'da. *P. syringae* enfeksiyonunda stomaların kapanmasına neden olmuş ve patojen girişini engellemiştir. Bu da enfekteli bitkiden su kaybının azalmasına neden olmuş dolayısıyla bitkilerin kuraklık stresine karşı toleransını arttırmıştır (Goel vd., 2008; Beattie, 2011). Bu kanıtlar önce *PsI*'nin uygulandığı gruplarda benzer adaptasyonun sağlanarak bitkiler sonradan oluşan kuraklık stresine karşı toleransı arttırabileceğini göstermektedir. Öyle ki kuraklık şiddeti sonucuna baktığımızda; *PsI*'nin kuraklıktan önce uygulandığı *PsI*+PEG grubunda PEG+*PsI* grubuna göre kuraklık şiddetinin daha düşük olduğu tespit edilmiştir.

EB'ler bitki iç dokularına kolonize olabildikleri için patojenik stratejilerinin bir parçası olarak bu organları istila eden ve kolonize eden patojenlerle rekabet etme potansiyeline sahiptir (Rosenblueth ve Martínez-Romero. 2006). Hem tekli streste hem de çiftli streste EB uygulaması *PsI*'nin popülasyon yoğunluğunu baskılamada başarılı olmuştur. Bu yukarıda belirttiğimiz hastalık şiddeti tablosuna da yansımıştır. Benzer şekilde birçok bakteriyel ve fungal hastalıklara karşı kullanılan PGPR'ların patojen popülasyonu ve hastalık şiddetini azalttığı tespit edilmiştir (Akköprü ve Özaktan, 2018; Romero vd., 2016; Pal vd., 2001; Trapet vd., 2016). Bu çalışma kapsamında hem tekli streslerde hem de ikili stres kombinasyonlarında uygulanan EB V33K2 izolatının hastalık şiddetini düşürmeyi başardığı tespit edilmiştir.

Uyarılmış direnç böcekler ve mikrobiyal patojenler dahil olmak üzere çeşitli bitki düşmanlarına karşı bitkinin doğuştan gelen bir savunma mekanizmasıdır (Schneider vd., 1996). Temel olarak sistemik kazanılmış direnç (SAR) ve uyarılmış sistemik direnç (ISR) olmak üzere iki tür indüklenmiş direnç olarak tanımlanmıştır (Song ve Ryu, 2013b). SAR sistemik olarak bir patojenle birincil enfeksiyonu takiben artan salisilik asit seviyeleri ve patogeneze ilişkili proteinlerle birlikte uzun süreli etkinlik ve geniş spektrumlu bir direnç

gelişimi ile sonuçlanmaktadır (Ryals vd., 1996). Bitki büyümesini ve verimini arttırarak bitki büyümesini teşvik eden rizobakterler (PGPR). ISR olarak adlandırılan indüklenmiş direnci ortaya çıkarırlar (Kloepper ve Scroth, 1980; Van Loon, 2007) Çoğu PGPR. SA'dan bağımsız olarak jasmonat ve etilen sinyallemesini içeren bir yolakla olan ISR'yi etkinleştirir (Zamioudis ve Pieterse. 2012). Bizim çalışmamızda ilgili genleri ifadesinin belirlenmesine yönelik çalışmalardan görüleceği üzere patojenin yalnız uygulanmasında SAR tetiklenmiştir. EB uygulanan gruplarda *Psl* popülasyonunun baskılanması hem de hastalık şiddeti tablosunda gözlenen düşüşün (Ryan vd., 2008b) belirttiği gibi geniş spektrumlu bir direnç oluşumu olarak değerlendirilebilir

Pantoea alhagi LTJR-11Z suşu fosfat çözünürlüğünü attırması. IAA'yı indüklemesi ve artan EPS üretiminin yanı sıra kuraklık stresi altındaki buğday ve Arabidopsis'te daha iyi ozmotik denge için şeker birikimine yol açtığı bildirilmiştir (Chen vd., 2017b). PEG tarafından oluşturulan kuraklığın indüklenmesiyle endofit bakteri ile muamele edilmiş bitkiler muamele edilmemiş bitkilerden daha güçlü bir kök sistemi gelişmiş fotosentetik aktivite ve daha iyi fizyolojik reaksiyon sergilemiştir (Vigani vd., 2019). *Bacillus licheniformis* HSW-16 suşu ile muamele edilen buğday bitkilerinde stres kaynaklı (tuzluluk) hasarı hafiflettiği ortaya konmuştur (Singh ve Jha, 2016). PGPR'ler bitki tarafından üretilenlerle sinerji içinde hareket edecek ve bitkinin kuraklık veya tuz stresine karşı toleransını destekleyebilecek osmolitler üretebilir (Vurukonda vd., 2016). Bu çalışmada kuraklık şiddeti tablosuna bakıldığında EB uygulamasının tekli ve çiftli stres kombinasyonlarında kuraklık şiddetini düşürmede başarılı olduğu görülmüştür. Bu çalışma kapsamında yapılan prolin analizine baktığımızda EB'ler özellikle kuraklık stresi altında prolinin birikimini arttırdığı ortaya konmuştur. Aynı zamanda en şiddetli kuraklık grubu olan PEG+*Psl* grubunda EB. MDA oranını düşürmeyi başarmıştır. Ayrıca son araştırmalar PR genlerinin aynı zamanda abiyotik stresler dahil olmak üzere çevresel faktörler tarafından da düzenlendiğini göstermiştir (Seo vd., 2008). Bu çalışma kapsamında PR-1 gen ifadesi sonuçlarımızda kuraklık uygulanan gruplarda indüklenmenin olduğu gözlenmiştir.

Bitki toleransındaki ana unsur bitki sağlığına veya gelişimine yapılan katkı ile hastalık semptomlarında görülen azalmadır (Akköprü ve Özaktan. 2018). Kuraklık stresi altındaki mısır fidelerinin *P. putida* suşu FBKV2 (DS + PP) ile aşılınması kök ve sürgün biyokütlelerini önemli ölçüde arttırmıştır (SkZ vd., 2018). Benzer şekilde.

Rhizobacterium P. putida H-2-3 ile aşıl原因an soya fasulyesi bitkileri kuraklık stresi koşullarında bitki büyüme performansını iyileştirdiği rapor edilmiştir (Kang vd., 2014). *Biber bitkilerinin kuraklık stresi altında Bacillus licheniformis* K11 ile aşıl原因masıyla birlikte kuraklık stresi altında kök gövde uzunluğu ile kuru ağırlığını arttırmıştır (Lim ve Kim. 2013) *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* patojeni uygulanan domates bitkilerinde EB ile mücadele eden araştırmacılar bitki gelişim parametrelerine pozitif katkı sağladığını tespit etmişlerdir (UÇAR ve AKKÖPRÜ. 2022). Bu tez çalışmasında da EB'ler gelişim parametrelerinde önemli artışlar sağlamıştır. EB' ler beslenme ve hormonal dengeyi düzenleyerek bitki büyüme düzenleyicileri üreterek besinleri çözündürerek ve bitki patojenlerine karşı direnç oluşturarak bitki büyümesini teşvik edebilir (Nadeem vd., 2014) Nitekim kullandığımız EB'nin siderefor ve fosfataz aktivitesi ile IAA üretebilme yeteneği olmasından dolayı bitki gelişimini arttırdığı söylenebilir.

Stres faktörleri hücre membranına serbest oksijen radikallerinin lipid peroksidasyonu yoluyla zarar vermektedir. Lipid peroksidasyonun birkaç reaksiyon basamağı sonunda melondialdehit (MDA) üretilmektedir. MDA birikimi, hücre tahribatının dolayısıyla doku hasarının bir göstergesidir (Kabay ve Şensoy, 2016). Önceki çalışmalar. PGPR'lerin MDA içeriğini azaltabileceğini. ROS birikimini önleyebileceğini, antioksidan enzimlerin aktivitelerini arttırabileceğini ve su eksikliği altında bitki büyümesini desteklediğini göstermiştir (Silambarasan vd., 2019). *Ziziphus jujuba* (Hünnap) bitkisine PGPR aşılması kuraklık altında sistemik tolerans süreçlerini indüklemiş MDA içeriğinin azalmasına yardımcı olmuştur (Zhang vd., 2020) Yine kuraklık ortamında ayçiçeğinde artan MDA oranını *Planomicrobium chinense* suşu ve *Bacillus cereus* uygulaması ile baskılamayı başarmıştır (Khan vd., 2018). Bu çalışmada PEG+*PsI*'de artan MDA içeriği EB+PEG+*PsI* ile karşılaştırdığımızda EB ikili stresi baskılamayı (MDA miktarını azaltmıştır) başarmıştır. Kuraklık şiddeti tablosuna bakıldığında bu grup şiddetin en yoğun olduğu gruptur. Dolayısıyla reaktif oksijen türlerinin de en şiddetli olduğu söylenebilir. Endofit bakteri bu grupta reaktif oksijen türlerinin üretimini baskılayarak MDA'yı düşürebilmiştir. Böylelikle oksidatif hasarı azaltmaya yardımcı olmuştur.

Prolin özellikle abiyotik stres faktörleri olan kuraklık ve tuzluluğa maruz kalan bitkilerde osmoregülatör olarak görev yapar. Ayrıca stres şartlarında prolin birikimi

bitkilerin adaptasyonunu sağlamaktadır (Delauney ve Verma. 1993). Prolinin hücre su dengesini korumadaki kritik rolüne ek olarak, proteinleri ve diğer kritik biyomoleküler yapıları korumak için ROS temizlemeye aracılık ederek stresin zararlı etkilerini iyileştirir (Abd-Allah vd., 2018). *B. subtilis* ve *P. fluorescens* aşılantı bezelye bitkilerinde artan prolin, tuz stresi toleransı ile sonuçlanmıştır (Sofy vd., 2021). Tütün bitkilerinde kademeli olarak artan tuz stresıyla prolin içeriğinin paralel olarak arttığını ortaya konulmuştur (Kaya ve İnan. 2018). Biberde ozmotik stres. EB ile hem aşılantı hem de aşılantı olmayan bitkilerin yapraklarında serbest prolin içeriğinde bir artışa neden olmuştur. EB ile aşılantı bitkiler, aşılantı olmayan kontrol bitkileriyle karşılaştırıldığında daha yüksek prolin seviyeleri ortaya çıkmıştır (Sziderics vd., 2007). Kuraklık stresi altında hıyar bitkilerine *P. fluorescens* ve *B. subtilis* suşlarının uygulandığı çalışmada bu bakterilerin prolin miktarını arttırarak kuraklığa karşı toleransı arttırdığını ortaya koymuşlardır (Saber-Riseh vd., 2019a). Bizim çalışmamızda PEG grubunda ve çiftli stres uygulanan PEG+*PsI* ve *PsI*+PEG gruplarında bitki prolin biriktirerek adaptasyonunu sağlamaya çalışmıştır. Üstelik EB uygulanan gruplarda (EB+*PsI*+PEG. EB+PEG+*PsI*) prolin artışı EB uygulanmayan gruplara göre daha fazla olmuştur.

SOD ve CAT gibi birçok antioksidan enzim bitkileri oksidatif strese karşı korur (Panuccio vd., 2014; Iqbal vd., 2019). Kuraklık stresine maruz kalan soya fasulyesi üzerinde PGPR uygulamasının SOD ve CAT enzimlerini arttırarak kuraklığın neden olduğu oksidatif stresi iyileştirdiği bildirilmiştir (Waqar vd., 2022). Ancak bizim çalışmamızda gruplar incelendiğinde SOD ve CAT antioksidan enzimlerinde EB kaynaklı bir artış olmamıştır. Burada EB'ler antioksidan enzim aktivitesini indüklemek yerine enzimatik olmayan antioksidanlar (karotenoidler . flavonoidler . tokoferoller . askorbat. glutatyon vb.) veya ozmotik ayarlama ile stresin neden olduğu zararlı etkilerden korumak için prolin gibi osmolitler üreterek katkı sağlamış olabilir. Bu çalışma kapsamında yapılan prolin analizine baktığımızda EB'ler özellikle kuraklık stresi altında prolinin birikimini arttırdığı ortaya konmuştur.

Klorofil farklı dalga boylarında olan ışıkları emerek bitkide fotosentez olayının meydana gelmesine sebep olan yeşil renkli pigmenttir. Klorofil bitkilerde beş çeşit olup başlıca iki türü klorofil “a ve b” dir (Anonim. 2016). Işığın absorbe edilerek klorofil-a'ya aktarılmasını sağlayan karotenoidler. ışık ve oksijen gibi çeşitli stres durumlarında klorofillerin parçalanmasını (fotooksidasyon) önlemektedirler (Ezer vd., 2010). Saber-

Riseh vd., (2019b)'nin kuraklık stresi altında hıyar bitkilerine EB uygulaması yaptıklarında klorofil a. b ve toplam klorofil oranlarını önemli ölçüde etkilediğini tespit etmişlerdir. EB ile aşılanmış bitkilerin klorofil oranında kuraklık uygulanan bitkilere göre düşüş daha az oranda olmuştur (Saber-Riseh vd., 2019b). Tütün bitkilerine kuraklık stresini azaltması için uygulanan PGPR'ler kontrol grubuna kıyasla klorofil *a. b.* toplam klorofil ve karotenoid oranını önemli ölçüde arttırmıştır (Begum vd., 2022). Bu çalışma kapsamında klorofil *b* hariç, klorofil *a.* toplam klorofil ve karotenoid oranında farklılıklar bulunmuştur. Bu üç parametrede de EB+*PsI* grubu ön plana çıkmaktadır. Çünkü hem *PsI* grubuna göre hem de diğer gruplara göre EB bu üç parametreyi arttırmayı başarmıştır. Bu da endofit bakterinin biyotik stresi engelleyerek artan stoma iletkenliği CO₂ alımını artırarak fotosentez hızını da arttırmış olabilir.

SAR ile savunma kapasitesindeki artış her zaman PR'ların birikmesiyle ilişkilendirilir. Özellikle. PR-1 genellikle SAR'ın indüklendiğine dair bir belirteç olarak alınır (Kessmann et al. 1994). Bununla birlikte son araştırmalar PR genlerinin aynı zamanda abiyotik stresler dahil olmak üzere çevresel faktörler tarafından da düzenlendiğini göstermiştir (Seo vd., 2008). EB grubunda 24., 72. ve 96. saatte kontrol grubuyla hemen hemen aynı oranda regülasyon görülmüştür. Bu sonuç V33K2 EB kaynaklı ISR'nin PR birikimini içermediğini ortaya koymaktadır. Aydemir vd., (2022) *P. putida* izolatı TR21/1'nin *Fusarium oxysporum f.sp. radidis lycopersici* ile enfekteli domates fidelerinde. PR-1 geninin kontrole göre aşağı yönlü regüle olduğunu tespit etmişlerdir (Aydemir vd., 2022). Bu tespit çalışma sonucumuzla paralellik göstermektedir.

Çalışmamızda. *PsI* grubunda tüm zaman noktalarında yukarı regülasyon olmuştur. *PsI* grubundaki bu yukarı regülasyon patojen ile muamele edilmiş hıyar bitkilerinde salisik asitin birikmesiyle SAR'ı tetiklediğini ortaya koymuştur. SAR savunma tepkilerinde yer alan çok sayıda patojenez ile ilişkili (PR) gen setinin ifadesini etkinleştirdiğini ve bunun artan bir SA seviyesinin göstergesidir (Pieterse vd., 1996). Kuraklık uygulanan PEG grubunda da 24. saatten 96. saate kadar artan bir şekilde PR-1 geni yukarı regüle olmuştur. Bu da kuraklık aracılığıyla PR-1 transkript seviyesinin yüksek olduğunu gösterdi. PR genlerinin alt kümesi (PR1. PR2 ve PR5) düşük sıcaklık, yüksek tuzluluk ve kuraklık tarafından indüklenebilir (Seo vd., 2008). Bizim çalışmamızda da 24. saatten 96. saatte dahil PEG grubunun indüklenmesi ile PR

genlerinin kuraklık ile ilişkili artışını göstermektedir. *PsI*+PEG grubunda indüklenmenin olması *PsI* tarafından tetiklenen SA aracılı savunma tepkisini ortaya koymaktadır. Ancak PEG+*PsI* grubunda 72. saatte aşağı regülasyon tespit edilmiştir. Kozniowska vd. (2016) yaptığı çalışmada *PsI*, NaCl, NaCl+*PsI* uygulamaları yapılmıştır. *PsI* ve tuz uygulaması yapıldıktan beş gün sonra (T5) PR-1 gen ifadesi kontrole göre arttığı görülmüştür. Ancak NaCl (100)+*PsI*' de aşağı regülasyon tespit edilmiştir. Bu durum SA birikiminin, NaCl uygulamasından kaynaklanan artan ABA içeriği nedeniyle *PsI* tarafından tetiklenen SA aracılı savunma tepkisini bastırmış olabileceğini göstermiştir (Chojak-Koźniowska vd., 2017). Bizim çalışmamızda da kuraklığın önce uygulanmasından dolayı *PsI* tarafından tetiklenen SA aracılı savunma tepkisini bastırmış olabilir.

Örneklemin 96. saatinde EB+*PsI* ve EB+PEG gruplarında EB uygulanmayan *PsI* ve PEG grubuna göre PR-1 geni daha düşük düzeyde gen ifadesi göstermiştir. ET ve JA/MeJA sinyal yolları arasında pozitif bir etkileşim olduğu (Schenk vd., 2000) ancak SA ve JA/MeJA arasında antagonistik bir ilişki olduğu bildirilmektedir (Dong, 1998; Reymond ve Farmer, 1998; Spoel vd., 2003). Bu gruplarda da EB uygulanmayan gruplara göre SA seviyesinin daha aşağıda kalması SA ve JA arasında antagonistik ilişkiden dolayı olabilir. EB+*PsI*+PEG ve EB+PEG+*PsI* gruplarında *PsI*+PEG ve PEG+*PsI*'ye göre PR-1 daha yüksek gen ifadesi göstermiştir. Endofit bakteri uygulanan grupların uygulanmayan gruplara göre hastalık ve kuraklık şiddetinin daha düşük olduğunu tespit etmiştik. Bu doğrultuda özellikle çiftli streste EB bitkinin savunma sistemine pozitif katkıda bulunduğu görülmektedir.

Lipoksijenazlar (LOX'lar) yağ asitlerinin hidroperoksit türevlerine oksijenlenmesini katalize eder (Schaller, 2000). Ayrıca jasmonik asit, metil jasmonik asit ve travmatin gibi oksilipinlere ayrışır (Blée, 2002). Oksilipinlerin gelişme, yaşlanma, tat bileşiklerinin oluşumu, abiyotik ve biyotik streslere karşı savunma yanıtlarında önemli bir rol oynadığı bilinmektedir ((Williams vd., 2000; Ye vd., 2000; Velloso vd., 2007; X. Y. Yang vd., 2012). ISR'yi düzenleyen fitohormon olan jasmonik asidin biyosentez yolunda sentezlenen ilk enzim olan lipoksijenaz LOX-1 dir (Melan vd., 1993). LOX-1 geninde 24. ve 72. saatlerde tüm gruplarda hemen hemen aynı oranda aşağı yönde regülasyon görülmüştür. Jasmonik asit, Salisik asit ve etilen sinyal yolları, sentezledikleri sinyal molekülleri tarafından açık bir şekilde tanımlanmış olsalar da çeşitli tepkilerde işbirliği içinde ve antagonistik olarak etkileşime girerler (Turner vd., 2002).

Örneğin yaralı transgenik bitkilerde. SA'yı ve gen patogenezi ile ilgili protein 1'in (PR-1) transkriptlerini biriktirmiştir. Bu. JA yolunun baskılanmasına sebep olmuştur ((Seo vd., 2008). Bizim çalışmamızda 24. ve 72. saatte aşağı regülasyon göstermesi SA yolunun aktive olup JA yolunu baskılanmasından kaynaklanabilir. 96. saatte ise bütün gruplarda yukarı regülasyon tespit edilmiştir. *Pytophythora melonis'e* Dirençli orta derecede dirençli çeşitlerinde LOX-1 genlerinin ifadesini yüksek Extrem duyarlı genotiplere göre önemli düzeyde arttırdığı tespit edilmiştir (Hashemi vd., 2020c). Duyarlı çeşitlerde bu genin ifadesinin düşük kalması buna karşılık dirençli çeşitlerde bu gen ifadesinin yüksek olması LOX-1 geninin hastalığa karşı bitki savunmasındaki etkin rolünü göstermektedir. Önce hastalık stresinin uygulandığı EB+*Psl*. *Psl*. *Psl*+PEG. EB+*Psl*+PEG gruplarında yukarı regüle olmuş. Ayrıca EB+*Psl*. *Psl*' ye EB+*Psl*+PEG. *Psl*+PEG'e göre daha yukarı regüle olmuştur. Bu da EB uygulamasının uygulanmayan gruplara göre LOX-1 genini arttırarak hastalığa karşı bitki savunmasına katkı sağladığı söylenebilir. Song vd. (2013) yaptığı çalışmada hem bakteriyel köşeli yaprak lekesi patojeni *Psl* hem de *Myzus persicae* (yaprak biti)'e karşı uçucu organik bileşik (VOC) aracılı indüklenmiş direncin etkinliğini araştırdıklarında LOX-1'in yukarı yönlü ekspresyonunu ortaya koymuşlardır (Song ve Ryu, 2013b). Önce kuraklık stresinin uygulandığı PEG. EB+PEG. PEG+*Psl*. EB+PEG+*Psl* gruplarında da önce hastalık stresi uygulanan gruplardaki gibi EB uygulanan gruplar yani EB+PEG. PEG'e göre. EB+PEG+*Psl*. PEG+*Psl*' ye göre daha fazla regüle olmuştur. Kuraklık. (Doares vd., 1995) ozmotik stres (Kramell vd., 1995) gibi çok çeşitli abiyotik stresler JA sinyalini indükleyebilir. Stresle indüklenbilir genler hem ilk stres tepkilerinde hem de bitkilerde stres toleransının oluşturulmasında rol oynar (Nafie vd., 2011). Bizim çalışmamızda da kuraklıkla beraber JA sinyali indüklenerek LOX-1 geni yukarı regüle olmuş bitki stres toleransını oluşturmaya çalışmıştır. EB'li grupların EB uygulanmayan gruplara göre indüklenmenin fazla olması bu toleransı arttırmaya yardımcı olduğunu gösterebilir. Her iki streste de EB'li grupların EB uygulanmayan gruplara göre LOX-1 geninin yukarı yönlü regülasyonun daha yüksek çıkması EB'nin etkinliğinin hastalık şiddeti ve kuraklık şiddeti sonuçlarıyla uyumlu olduğunu göstermektedir.

SnRK'lar bitki stres direncinde önemli bir rol oynayan bitkiye özgü bir tür serin/treonin (Ser/Thr) protein kinazdır (Hardie. 1999; Miko vd., 2000). Protein kinazlar hücre içi sinyal iletiminin ana bileşenleridir ve stres yanıtında önemli bir rol oynarlar

(Wang vd., 2015). SnRK'lar organizmada yüksek oranda korunur ve yalnızca bitki metabolizmasının düzenlenmesine değil aynı zamanda stres tepkisine de katılır (Coello vd., 2011). SnRK2 temel olarak bitki abiyotik stresinin sinyal iletim sürecine katılır (Kulik vd., 2011). ABA aktivasyonuna bağlı olarak, SnRK2 iki alt gruba ayrılabilir. Grup 1; SnRK2-2. SnRK2-3. SnRK2-6. SnRK2-7 ve SnRK2-8 dahil olmak üzere hem ABA hem de ozmotik stresler tarafından aktive edilen kinazlardan oluşur. Diğer grup ise; SnRK2-1. SnRK2-4. SnRK2-5 ve SnRK2-10 dahil olmak üzere sadece ozmotik koşullar tarafından aktive edilen kinazlardan oluşur (Boudsocq ve Laurière. 2005). Çalışmamızda 24. saatte EB grubu hariç tüm gruplarda aşağı yönlü regülasyon görülmüştür. EB grubunda da kontrol grubuyla hemen hemen aynı oranda regülasyon düzeyi ölçülmüştür. 72. Saatte PEG+*PsI*. EB+*PsI*+PEG. EB+PEG+*PsI*' de yukarı regülasyon görülürken. 96. saatte tüm gruplarda yukarı regülasyon görülmüştür.

Luo vd. (2022) hıyara PEG uygulamasının SnRK2.5 gen ifadesinde artış gösterdiğini belirlemiştir. Bu artışta bir dalgalanma gözlemlense de 48. saatte maksimuma ulaşmıştır. Araştırmacılar SnRK2.5 kuraklık stresini düzenlemede önemli bir rol oynayabileceğini ileri sürmüşlerdir (Luo vd., 2022b) Çalışmamızda 96. saatte PEG ve *PsI* uygulamalarında EB uygulanan gruplara göre gen ifadesi daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Yani SnRK2.5 geni 96. saatte EB+PEG ve EB+*PsI* gruplarında PEG ve *PsI* gruplarına kıyasla gen ifadesinde azalış gözlenmiştir.

Ancak *PsI*+PEG. PEG+*PsI*. EB+*PsI*+PEG ve EB+PEG+*PsI* gruplarında yani hem biyotik hem de abiyotik stresin olduğu gruplarda 72. Saatte NK'e göre yukarı doğru indüklenme başlamıştır. Ayrıca SnRK2.5 geni EB uygulanan gruplar olan EB+*PsI*+PEG ve EB+PEG+*PsI*. EB uygulanmayan *PsI*+PEG ve PEG+*PsI*'ye göre daha fazla yukarı yönlü tetiklenmiştir. Ahmed vd., (2023)'nin yaptığı çalışmada *Corchorus olitorius* (Co) ve *C. capsularis* (Cc) türlerinde SnRK2 gen ailesi (Co- ve CcSnRK2.3. Co- ve CcSnRk2.5. Co- ve CcSnRk2.7 ve Co- ve CcSnRK2.8) kuraklık ve tuzluluk streslerine yanıt olarak yukarı doğru aktive olduğu gözlenmiştir (Ahmed vd., 2023). SnRK2 protein kinazlarının (SnRK2.1. SnRK2.4. SnRK2.5. SnRK2.9 ve SnRK2.10) ozmotik strese karşı bitki tepkilerini düzenlediği bildirilmektedir (Soma vd., 2017). Genellikle abiyotik ve biyotik stresin neden olduğu çevresel baskı bitki direncini tetikleyebilir. Bununla birlikte her bir stresle ayrı ayrı karşılaşan bazı bitkilerin aynı anda iki farklı strese maruz

kalmasıyla birlikte bitkinin daha duyarlı olabileceği bildirilmiştir (Tippmann vd., 2006; Suzuki vd., 2014).

Bu çalışmada özellikle uygulanan çiftli stres altında bitkinin SnRK2.5 geninin daha duyarlı olduğu ve 72. saatte yukarı yönlü aktivasyonun başladığı gözlenmektedir. Buna karşılık tekli streste 96. saatte yukarı yönlü aktivasyon gözlenmiştir. Bu gözlemler ikili stres altında EB uygulamaların EB uygulanmayan gruplara göre yukarı yönlü düzenlemesini sağlamıştır. Ayrıca kuraklık stresinin önce uygulandığı grupta (EB+PEG+*PsI*) gen ifadesinin hastalık öncelikli gruba göre daha güçlü olduğu belirlenmiştir. SnRK2.5 geninin hem patojen hem de kuraklıktan kaynaklı ozmotik strese maruz kalan bitkilerin tepkilerinin düzenlenmesine EB uygulaması ve stres türüne göre değişiklik gösterdiği tespit edilmiştir.

Bitki hormonu etilen tohum çimlenmesi, kök tüy gelişimi, kök nodülasyonu, çiçek yaşlanması, dökülme ve meyve olgunlaşması dahil olmak üzere bitki yaşam döngüsünün birçok yönünde önemli roller oynayan bitki büyümesi ve gelişiminin önemli bir düzenleyicisidir (Ecker. 1995; Johnson ve Ecker. 1998). Etilen biyosentezi bitkilerde üç adımda gerçekleşir. Metiyonin. AdoMet sentetaz tarafından S -adenosilmetiyonin (AdoMet) oluşturmak üzere katalize edilir. AdoMet ACC sentaz (ACS) tarafından 1-aminosiklopropan-1-karboksilik aside (ACC) dönüştürülür. ACC daha sonra ACC oksidaz tarafından etilene oksitlenir (Fa Yang ve Hoffman. 1984). Bazı bitki türlerinin çeşitli bitki organlarına (preklimakterik meyve ve çiçekler hariç) ACC uygulandığında etilen üretiminde belirgin bir artış gözlenmiştir (Cameron vd., 1979; Lürssen vd., 1979). Bu. ACC'yi etilene dönüştüren enzim sisteminin büyük ölçüde kurucusu olduğunu ve ACC oluşumunun bu bitki dokularında hız sınırlayıcı adım olduğunu düşündürür (Fa Yang ve Hoffman. 1984). Etilen üretimi ayrıca yaralanma, sıcaklık dalgalanmaları, kuraklık. anaerobiyoz. CO₂ ve viral enfeksiyon gibi çeşitli stres koşulları tarafından da indüklenebilir (Mathooko. 1996; Abeles vd., 2012). Genel çerçevede ACS etilen oluşumu ve hızı için ana unsurlardan biridir.

ACS3 geninin 24. saatinde *PsI* ve *PsI*'nin önce uygulandığı gruplarda (EB+*PsI*. *PsI*+PEG. EB+*PsI*+PEG) aşağı yönlü regülasyon görülürken PEG ve PEG'in (EB+PEG. PEG+*PsI*. EB+PEG+*PsI*) önce uygulandığı gruplarda yukarı yönlü regülasyon görülmüştür. Ayrıca PEG ve PEG'in önce uygulandığı gruplara göre endofit bakterisi uygulanan gruplarda ACS3 gen ifadesi daha düşük düzeyde kalmıştır. Kuraklık ve

hastalık şiddeti tablosuna bakıldığında da PEG öncelikli gruplarda şiddetin daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Kuraklık, ACC sentezini ve bunun etilene dönüşümünü artırarak bitkilerde artan etilen üretimini teşvik ettiği tespit edilmiştir (McMichael vd., 1972; Apelbaum vd., 1981; McKeon vd., 1982). Çalışmamızda 24. saatte patojenden dolayı ACC sentezini arttıran yukarı yönlü bir regülasyon olmamış fakat kuraklığın önce uygulandığı gruplarda etilen üretimi teşvik edilmiştir.

ACS3 geninde 72. saatte; EB, *Psl* ve EB+PEG+*Psl* gruplarında yukarı yönlü regülasyon görülmüştür. Etilen bitkinin büyüme ve gelişimini yönlendirmenin yanı sıra patojen saldırısı (funguslar, böcekler, nematodlar) gibi çevresel saldırılara karşı bitki tepkilerini düzenler (Gamalero ve diğ., 2023). Bu grupların haricindeki tüm gruplarda aşağı yönlü regülasyon görülmüştür. Eun vd., 2019 kuraklık altında ACC sentez geni ACS11'i incelediklerinde strese tepki olarak yukarı yönlü indüklenmediğini tespit etmişlerdir. 72. saatte tekli stres uygulanan gruplara göre (*Psl* ve PEG) endofit bakteri uygulanan gruplar (EB+*Psl*, EB+PEG) ACS3 geninin ifadesini düşürmeyi başarmıştır. Fakat ikili stres uygulanan gruplarda (EB+*Psl*+PEG, EB+PEG+*Psl*) bu durum söz konusu olmamıştır. ACS3 geninde 96. Saatte ise tüm gruplarda yukarı yönlü regülasyon görülmüş ve indüklenme seviyesi diğer saatlere göre en yüksek seviyeye ulaşmıştır. Mısırdaki kuraklık altında ZmACS2 ve ZmACS6 karşılaştırıldığında, ZMACS6 geninin daha düşük ifade edilmesinin yaşlanma sürecini yavaşlatabileceğini belirtmişlerdir (Young vd., 2004). Bizim çalışmamızda da 96. saatte endofit bakteri uygulanan grupların uygulanmayan gruplara göre ACS3 gen ifadesinin düşük kalması bakterinin bitkinin dayanıklılık sistemini uyararak ACC sentezini düşürdüğünü dolayısıyla etilen seviyesini azalttığını söyleyebiliriz. Bu durum stres faktörlerinden dolayı dokularda gözlenen etilen kaynaklı yaşlanma ve semptomların azalmasına neden olmuş olabilir. Öyle ki EB uygulanmış bu gruplarda gözlenen hastalık ve kuraklık şiddetleri düşük kaldığı gözlenmiştir.

Sonuç

Kuraklığın *Psl* etmeninden önce uygulandığı çiftli stres grubunda (PEG+*Psl*) biyotik ve abiyotik hastalık şiddetinin *Psl* etmeninin kuraklıktan önce uygulandığı gruba (*Psl*+PEG) göre daha yoğun olduğu tespit edilmiştir. Abiyotik stres bitkileri duyarlı hale getirip streslerin neden olduğu belirti tablosunun artmasına sebep olmuştur. Diğer yönüyle de biyotik stres faktörü *Psl*'nin kuraklıktan önce uygulandığı grupta bu tablo

daha düşük seyretmiştir. Elde ettiğimiz bulgular sonucunda bitki ikili strese maruz kaldığında vereceği tepkinin streslere maruz kalma öncelik sırasına göre değişebileceğini ve kuraklık stresinin bitkiyi *Psl* stres faktörlerine karşı duyarlı hale getirdiğini tespit etmiş bulunmaktayız. Burada stresler arası etkileşimde; streslerin şiddeti bitkinin yaşı, bitkinin bireysel stresten herhangi birine dayanıklı veya duyarlı olup olmadığı gibi faktörler etkili olabilir. Bu nedenle doğa koşullarında birden fazla strese maruz kalan bitkilerin nasıl davranış sergilediğini tam anlamıyla anlamamız için daha fazla çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Hem tekli stres gruplarında hem de çiftli stres gruplarında EB V33K2 izolatının patojen popülasyonunun hastalık ve kuraklık şiddetini azaltmada etkili olmuştur. Bu çerçevede endofit bakteriler ikili stres altında dahi hastalıkla mücadelede başarı göstermiş ve pestisist kullanımını en aza indirme potansiyeli göstermiştir. Ayrıca kuraklığı önlemede de yenilikçi bir araç olabilir. Üstelik bitkilerin biyotik ve abiyotik stresin bir arada olduğu durumlarda sürdürülebilir tarım çerçevesinde biyolojik mücadele için önemli bir aracı olarak kullanılabilir.

Biyotik veya abiyotik stres ile ilgili bitki sinyalizasyonunda etkili genlerin zaman aralıklarındaki ifade değişimleri o stres altındaki bitkinin gelişimi ile ilgili bize bilgi verebilir. Bu çalışma kapsamında çiftli uygulanan stres altında PR-1 genlerinin EB uygulanan gruplarda bitkinin savunma sistemine etkin olduğu bulunmuştur. LOX-1 geninde 24. ve 72. saatlerde indüklenme olmamış fakat 96. saatte hem tekli hem de çiftli stres altında EB uygulanan gruplarda uygulanmayanlara göre indüklenmesinin daha fazla olduğu gözlenmiştir. SnRK2.5 geninde tekli stres altında hiçbir grupta yukarı yönlü indüklenme olmazken 72. saatte sadece çiftli gruplarda indüklenme olmuştur. 96. saatte EB uygulanan çiftli stres gruplarında indüklenmenin daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. SnRK2.5 geninde PR-1 ve LOX-1 geninde olduğu gibi çiftli streslerde de EB uygulamalarında indüklenmenin olduğu gözlemlenmektedir. ACS-3 geninde ise 24. ve 72. saatte EB ve PEG grubu hariç tüm gruplarda aşağı yönlü regülasyon görülürken 96. Saatte *Psl* ve EB hariç tüm gruplarda yukarı yönlü regülasyon görülmüştür. ACS-3 geninde yine özellikle çiftli streste EB grubu bu geni bastırabilmiştir.

Bu sonuçlar bitkinin hem tekli hem de ikili stres altında tepkilerinin anlaşılmasına katkı sağlamasının yanı sıra EB'lerin bitki sağlığına etkilerini de ortaya koymaktadır. Sürdürülebilir tarım çerçevesinde ikili strese maruz kalan bitkilerin sağlığına EB'lerin

önemli katkılar sunabileceği görölmüşür. Ancak endofit bakteri ve ikili streslere maruz kalmış bitkiler arasındaki ilişkinin tam olarak anlaşılması için daha fazla çalışmanın yapılması gerekmektedir.





KAYNAKLAR

- Abbasi, S., Safaie, N., Sadeghi, A., Shamsbakhsh, M. (2019). Streptomyces Strains Induce Resistance to Fusarium oxysporum f. Sp. Lycopersici Race 3 in Tomato through Different Molecular Mechanisms. *Frontiers in Microbiology*. 10.
- Abd-Allah, E. F., Alqarawi, A. A., Hashem A., Radhakrishnan, R., Al-Huqail, A. A., Al-Otibi, F. O. N, Egamberdieva, D. (2018). Endophytic bacterium Bacillus subtilis (BERA 71) improves salt tolerance in chickpea plants by regulating the plant defense mechanisms. *Journal of Plant Interactions*. 13(1). 37-44.
- Abeles, F. B., Morgan, P. W., Saltveit, M. E. (Mikal E. (2012). *Ethylene in plant biology*. Academic Press.
- Achuo, E. A., Prinsen, E., Höfte, M. (2006). Influence of drought. salt stress and abscisic acid on the resistance of tomato to Botrytis cinerea and Oidium neolyopersici. *Plant Pathology*. 55. 178-186.
- Agrios, G. (2005). *Plant Pathology* (5. ed.). *Advances in Literary Study* Scientific Research Publishing. Inc.: Amsterdam.
- Ahmad, I., Zaib, S., Alves, P. C. M. S., Luthe, D. S., Bano, A., Shakeel, S. N. (2019). Molecular and physiological analysis of drought stress responses in zeamays treated with plant growth promoting rhizobacteria. *Biologia Plantarum*. 63. 536-547.
- Ahmed. B., Hasan, F., Tabassum, A., Ahmed. R., Hassan. R., Amin, M. R., Alam, M. (2023). Genome-wide investigation of SnRK2 gene family in two jute species: Corchorus olitorius and Corchorus capsularis. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 21(1).
- Akbaba, M. (2014). Bitki gelişimini artıran bakteriyel endofitlerin hıyar bakteriyel köşeli yaprak leke hastalığının (Pseudomonas syringae pv. lachrymans) önlenmesinde kullanılabilecek olanakları. Yüksek Lisans Tezi. Ege Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü. İzmir.
- Akhtar, N., Qureshi, M. A., Iqbal, A., Ahmad, M. J., Khan, K. H. (2012). Influence of azotobacter and iaa on lentil yield influence of azotobacter and iaa on symbiotic performance of rhizobium and yield parameters of lentil. *Journal of Agricultural Research*. 50(3), 361-372.
- Akköprü, A. (2012). Hıyar Bakteriyel Köşeli Yaprak Leke Hastalığının (Pseudomonas Syringae Pv. Lachrymans) Bazı Kök Bakterileriyle Biyolojik Savaşımı Üzerinde Araştırmalar. Doktora tezi. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. İzmir. Türkiye.
- Akköprü, A., Özaktan, H. (2018). Identification of rhizobacteria that increase yield and plant tolerance to angular leaf spot disease in cucumber. *Plant Protection Science*. 54(2). 67-73.
- Ali, S., Charles, T. C., Glick, B. R. (2012). Delay of flower senescence by bacterial endophytes expressing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. *Journal of Applied Microbiology*. 113(5). 1139-1144.
- Alizadeh, H., Behboudi, K., Ahmadzadeh, M., Javan-Nikkhah, M., Zamioudis, C., Pieterse, C. M. J., Bakker, P. A. H. M. (2013). Induced systemic resistance in cucumber and Arabidopsis thaliana by the combination of Trichoderma harzianum Tr6 and Pseudomonas sp. Ps14. *Biological Control*. 65(1). 14-23.
- Amtmann, A., Troufflard, S., Armengaud, P. (2008). The effect of potassium nutrition on pest and disease resistance in plants. *Physiologia Plantarum*. 133(4). 682-691.

- Anjum, S. A., Xie, X.-Y., Wang, L.-C., Saleem, M. F., Man, C., Lei, W. (2011). Morphological. physiological and biochemical responses of plants to drought stress. *African Journal of Agricultural Research*. 6(9).
- Annapurna, K., Kumar, A., Kumar, L. V., Govindasamy, V., Bose, P., Ramadoss, D. (2013). PGPR-induced systemic resistance (ISR) in plant disease management. *Bacteria In Agrobiolgy: Disease Management*, 405-425.
- Anonim. (2016). Örtü Altı Hıyar Yetiştiriciliği. **Tatrim Orman Müdürlüğü**. Erişim tarihi: 7 Ekim 2020. Erişim adresi: <https://arastirma.tarimorman.gov.tr/alata/Belgeler/Digerbelgeler/OrtualiHıyarYetistiriciligiVAras.pdf>.
- Anonim. (2019). Tohum Bilgileri. **Balıkesir Bölgesi Tohum Üreticileri**. Erişim tarihi: 7 Ekim 2020. Erişim adresi: <http://tohumcu.org/index.php?page=teknikbilgi1DetayT&pid=43>.
- Anonim. (2022). *Bitkisel Üretim 2.Tahmini*. 2022. <https://data.tuk.gov.tr/Bulten/Index?p=Btksel-Uretim-2.Tahmn-2022-45503>.
- Anonim. (2023). List of countries by cucumber production. **Food and Agriculture Organaziton of the United Nations**. Erişim tarihi: 27 Ocak 2023. Erişim adresi: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize>.
- Apelbaum, A., Shang, A., Yang, F. A. (1981). Biosynthesis of Stress Ethylene Induced by Water Deficit'. *Plant Physiol*. 68. 594-596.
- Armada, E., Roldán, A., Azcon, R. (2014). Differential Activity of Autochthonous Bacteria in Controlling Drought Stress in Native Lavandula and Salvia Plants Species Under Drought Conditions in Natural Arid Soil. *Microbial Ecology*. 67(2). 410-420.
- Ashraf, M., Ozturk, M. (2008). Salinity and Water Stress: : improving crop efficiency. *Springer Science & Business Media*. 44.
- Ashraf, M., Wu, L. (1994). Breeding for salinity tolerance in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 13(1). 17-42.
- Aydemir, Ç., Şahin, B., Gül, A., Özaktan, H., Yolageldi, L. (2022). Pseudomonas putida induces resistance to Fusarium oxysporum f. sp. radicle-lycopersici in tomato plants by activating expression of defense-related genes. *ANADOLU Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Dergisi*. 32(2). 190-202.
- Azevedo, J. L., Maccheroni, W., Pereira, J. O. (2000). Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. *Electronic Journal of Biotechnology*. 3(1), 15-16.
- Bayramoğlu, Z., Karakayacı, Z., Ağızan, K., Ağızan, S., Bozdemir, M. (2021). Başlıca Sebze Ürünlerinde Üretim Maliyetlerini Etkileyen Faktörlerin Belirlenmesi. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi*. 24(3). 603-613.
- Beattie, G. A. (2011). Water relations in the interaction of foliar bacterial pathogens with plants. *Annual Review of Phytopathology*. 49. 533-555.
- Begum, N., Wang, L., Ahmad, H., Akhtar, K., Roy, R., Khan, M. I., Zhao, T. (2022). Co-inoculation of Arbuscular Mycorrhizal Fungi and the Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Improve Growth and Photosynthesis in Tobacco Under Drought Stress by Up-Regulating Antioxidant and Mineral Nutrition Metabolism. *Microbial Ecology*. 83(4). 971-988.
- Bhargava, S., Sawant, K. (2013). Drought stress adaptation: Metabolic adjustment and regulation of gene expression. *Plant Breeding*. 132(1), 21-32.

- Bhat, N. A., Bhat, K. A., Zargar, M. Y., Teli, M. A., Nazir, M., Zargar, S. M. (2010). Current status of angular leaf spot (*Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*) of cucumber. *International Journal Of Current Research*. 8. 1-11.
- Blée, E. (2002). Impact of phyto-oxylipins in plant defense. *Trends in plant science*. 7(7). 315-322.
- Bleecker, A. B., Kende, H. (2000). ETHYLENE: A Gaseous Signal Molecule in Plants. *Annual review of cell and developmental biology*. 16. 1-18.
- Boudsocq, M., Laurière, C. (2005). Osmotic signaling in plants. Multiple pathways mediated by emerging kinase families. *Plant Physiology*. 138(3). 1185-1194.
- Bradbury, J. F. (1986). **Guide to plant pathogenic bacteria**. CAB International.
- Buchholz, K. (2021). The World Map of Drought Risk. *Statista*. Erişim tarihi: 4 Kasım 2022. Erişim adresi: <https://www.statista.com/chart/25101/countres-by-drought-rsk/2/6>.
- Bukhat, S., Imran, A., Javaid, S., Shahid, M., Majeed, A., Naqqash, T. (2020. 1 Eylül). Communication of plants with microbial world: Exploring the regulatory networks for PGPR mediated defense signaling. *Microbiological research*. 238, 126486.
- Cameron, E., Pauling, L., Leibovitz, B. (1979). Ascorbic Acid and Cancer: A Review1. *Cancer Research*. 39(3). 663-681.
- Cameron, R. K., Dixon, R. A., Lamb, C. J. (1994). Biologically induced systemic acquired resistance in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*. 5(5). 715-
- Carsner, E. (1918). Angular-leafspot of cucumber: dissemination. overwintering. and control: Cooperative investigations between the University of Wisconsin and the Bureau of Plant Industry. United States Department of Agriculture. US Government Printing Office.
- Chae, H. S., Faure, F., Kieber, J. J. (2003). The *eto1*, *eto2*, and *eto3* mutations and cytokinin treatment increase ethylene biosynthesis in *Arabidopsis* by increasing the stability of ACS protein. *Plant Cell*. 15(2). 545-559.
- Chen, C., Xin, K., Liu, H., Cheng, J., Shen, X., Wang, Y., Zhang, L. (2017). *Pantoea alhagi*, a novel endophytic bacterium with ability to improve growth and drought tolerance in wheat. *Scientific Reports*. 7(1), 41564.
- Chojak-Koźniewska, J., Linkiewicz, A., Sowa, S., Radzioch, M. A., Kuźniak, E. (2017). Interactive effects of salt stress and *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* infection in cucumber: Involvement of antioxidant enzymes, abscisic acid and salicylic acid. *Environmental and Experimental Botany*. 136. 9-20.
- Coello, P., Hey, S. J., Halford, N. G. (2011). The sucrose non-fermenting-1-related (SnRK) family of protein kinases: Potential for manipulation to improve stress tolerance and increase yield. *Journal of Experimental Botany*. 62(3). 883-893.
- Coutinho, B. G., Licastro, D., Mendonça-Previato, L., Cámara, M., Venturi, V. (2015). Plant-Influenced gene expression in the rice endophyte *Burkholderia kururiensis* M130. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 28(1). 10-21.
- Çelik, Y., Akköprü, A. (2021). Endofit Bakteriler ve Arbusküler Mikorhizal Fungusların Hıyar Köşeli Yaprak Leke Hastalığına Karşı Kullanımı. **Balkan Summit 5th International Applied Sciences Congress**.
- Dal, Y. (2002). Seçilmiş bazı çerezlik kabak (*Cucurbita pepo*) genotiplerinin kurağa tolerans düzeyinin belirlenmesi. Yüksek lisans tezi. Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Konya. Türkiye.
- Delauney, A. J., Verma, D. P. S. (1993). Proline biosynthesis and osmoregulation in

- plants. *The plant journal*. 4(2). 215-223.
- Doares, S. H., Narváez-Vásquez, J., Conconi, A., Ryan, C. A. (1995). Rapid Communication Salicylic Acid Inhibits Synthesis of Proteinase Inhibitors in Tomato Leaves Induced by Systemin and Jasmonic Acid'. *Plant Physiol.* 1. 1741-1742.
- Dolferus, R. (2014. 1 Aralık). To grow or not to grow: A stressful decision for plants. *Plant Science* . 229, 247-261.
- Dong, X. (1998). SA, JA, ethylene, and disease resistance in plants. *Current opinion in plant biology*. 1(4). 316-323.
- Duniway, J. M. (1977). Predisposing Effect of Water Stress on the Severity of Phytophthora Root Rot in Safflower. *Ecology and Epidemiology*. 67(7). 884.
- Ecker, J. R. (1995). The ethylene signal transduction pathway in plants. *Science*. 268(5211). 667-675.
- Eun, H. D., Ali, S., Jung, H., Kim, K., Kim, W. C. (2019). Profiling of ACC synthase gene (ACS11) expression in Arabidopsis induced by abiotic stresses. *Applied Biological Chemistry*. 62(1).
- Ezer, T., Kara, R., Demir, İ. (2010). The comparison of pigment concentration in some aquatic and non-aquatic bryophytes chlorophyll a/b and total carotenoid. *Biyoloji Bilimleri Aras Dergisi*. 3(2). 181-183.
- Fa Yang, S., Hoffman, N. E. (1984). Ethylene Biosynthesis And Its Regulation In Higher Plants. *Annual review of plant physiology*. 35(1). 155-189.
- Farooq, M., Wahid, A., Kobayashi, N. (2009). Plant Drought Stress: Effects. Mechanisms and Management. *Agronomy for Sustainable Development*. 29. 185-212.
- Fujii, H., Verslues, P. E., Zhu, J. K. (2011). Arabidopsis decuple mutant reveals the importance of SnRK2 kinases in osmotic stress responses in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 108(4). 1717-1722.
- Germida, J. J., Siciliano, S. D., Renato de Freitas, J., Seib, A. M. (2006). Diversity of root-associated bacteria associated with field-grown canola (*Brassica napus* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). *FEMS Microbiology Ecology*. 26(1). 43-50.
- Glick, B. R., Cheng, Z., Czarny, J., Duan, J. (2007). Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria. *New perspectives and approaches in plant growth-promoting Rhizobacteria research*. 329-339..
- Goel, A. K., Lundberg, D., Torres, M. A., Matthews, R., Akimoto-Tomiya, C., Farmer, L., Grant, S. R. (2008). The *Pseudomonas syringae* Type III Effector HopAM1 Enhances Virulence on Water-Stressed Plants. *Molecular plant-microbe interactions* .21(3), 361-370.
- Goswami, D., Thakker, J. N., Dhandhukia, P. C. (2016). Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. *Cogent Food & Agriculture*. 2(1), 1127500.
- Gupta, S., Radhakrishnan, A., Raharja-Liu, P., Lin, G., Steinmetz, L. M., Gagneur, J., Sinha, H. (2015). Temporal expression profiling identifies pathways mediating effect of causal variant on phenotype. *PLoS genetics*. 11(6), e1005195.
- Güneri Bağcı, E. (2010). Nohut Çesitlerinde Kuraklıkga Bağlı Oksidatif Stresin Fizyolojik ve Biyokimyasal Parametrelerle Belirlenmesi. Doktora Tezi. Orta Doğu Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Ankara.
- Halefoglu, Y., Kusvuran, E. (2010). Preparation of ceramic pigments by sol-gel and

- combustion methods. *Journal of Ceramic Processing Research*. 11.
- Hallmann, J., Quadt-Hallman, A., Mahafee, W. F., Kloepper, J. W. (1997). Bacterial endophytes in agricultural crop. *Canadian Journal of Microbiology*. 43. 37-42.
- Hardie, D. G. (1999). Plant protein serine/threonine kinases: classification and functions. *Annual review of plant biology*. 50(1). 97-131.
- Hardoim, P. R., van Overbeek, L. S., Elsas, J. D. van. (2008). Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends in Microbiology*. 16(10). 463-471.
- Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Gill, S. S., Fujita, M. (2013). Drought Stress Responses in Plants. Oxidative Stress. and Antioxidant Defense. *Climate Change and Plant Abiotic Stress Tolerance*. 1, 209-250.
- Hashemi, L., Golparvar, A. R., Nasr-Esfahani, M., Golabadi, M. (2020). Expression analysis of defense-related genes in cucumber (*Cucumis sativus* L.) against *Phytophthora melonis*. *Molecular Biology Reports*. 47(7). 4933-4944.
- Iqbal, S., Basra, S. M. A., Afzal, I., Wahid, A., Saddiq, M. S., Hafeez, M. B., Jacobsen, S. E. (2019). Yield potential and salt tolerance of quinoa on salt-degraded soils of Pakistan. *Journal of Agronomy and Crop Science*. 205(1). 13-21.
- Jebara, S., Jebara, M., Limam, F., Aouani, M. E. (2005). Changes in ascorbate peroxidase, catalase, guaiacol peroxidase and superoxide dismutase activities in common bean (*Phaseolus vulgaris*) nodules under salt stress. *Journal of plant physiology*. 162(8). 929-936.
- Johnson, P. R., Ecker, J. R. (1998). The ethylene gas signal transduction pathway: a molecular perspective. *Annual review of genetics*. 32(1). 227-54.
- Jones, J. D. G., Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*. 444. 323-329.
- Kabay, T., Şensoy, S. (2016). Kuraklık Stresinin Bazı Fasulye Genotiplerinde Oluşturduğu Enzim, Klorofil ve İyon Değişimleri. *YYÜ Tarım Bilimleri Dergisi*. 26(3). 380-395.
- Kado, C. I. (2010). Plant Bacteriology. The American Phytopathological Society.
- Kaman, H., Özbek, Ö., Polat, E., Üniversitesi. A. Fakültesi. Z. Yapılar ve Sulama Bölümü. T., Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi. A. (2017). Sera koşullarında hıyar bitkisi üzerine sulamanın etkisi. *Akademik Ziraat Dergisi*. 6 Özel Sayı. 281-288.
- Kang, S. M., Radhakrishnan, R., Khan, A. L., Kim, M. J., Park, J. M., Kim, B. R., Lee, I. J. (2014). Gibberellin secreting rhizobacterium. *Pseudomonas putida* H-2-3 modulates the hormonal and stress physiology of soybean to improve the plant growth under saline and drought conditions. *Plant Physiology and Biochemistry*. 84. 115-124.
- Kasim, W. A., Osman, M. E., Omar, M. N., Abd El-Daim, I. A., Bejai, S., Meijer, J. (2013). Control of Drought Stress in Wheat Using Plant-Growth-Promoting Bacteria. *Journal of Plant Growth Regulation*. 32(1). 122-130.
- Kavi Kishor, P. B., Sreenivasulu, N. (2014). Is proline accumulation per se correlated with stress tolerance or is proline homeostasis a more critical issue?. *Plant, Cell and Environment*. 37(2), 300-311
- Kaya, A., İnan, M. (2018). Kuraklık ve Tuz Streslerine Maruz Kalan Tütün (*Nicotiana tabacum* L.) Bitkisinde Bazı Fizyolojik ve Biyokimyasal Parametreler Üzerine Melatoninin Etkileri. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Doğa Bilimleri Dergisi*. 21(4), 559-564.
- Kende. H. (1993). Ethylene biosynthesis. *Annual review of plant biology*. 44(1), 283-

- Khan, N., Zandi, P., Ali, S., Mehmood, A., Shahid, M. A. (2018). Impact of salicylic acid and PGPR on the drought tolerance and phytoremediation potential of *helianthus annuus*. *Frontiers in Microbiology*. 9.
- Khlaif, H. (1995). Varietal reaction and control of angular leaf spot disease on cucumber. *Dirasat (Pure and Applied Sciences)*. 22(5).
- King, E. O., Ward, M. K., Donald, E. D., Raney, A. B. (1954). Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *The Journal of laboratory and clinical medicine*. 44(2). 301-307.
- Kloepper, J. W., Schippers, B., Bakker, P. A. H. M. (1992). Proposed Elimination of the Term Endorhizosphere. *Phytopathology*. 82(7). 726-727.
- Kloepper, J.W., Scroth, M. N. (1980). Plant Growth-Promoting Rhizobacteria ann Plant Growth Under Gnotobiotic Conditions. *The American Phytopathological Society*. 642-644.
- Kramell, R., Atzorn, R., Schneider, G., Miersch, O., Brckner, C., Schmidt, J., Parthier, B. (1995). Occurrence and Identification of Jasmonic Acid and Its Amino Acid Conjugates Induced by Osmotic Stress in Barley Leaf Tissue. *Journal of Plant Growth Regulation*. 14. 29-36.
- Kulik, A., Wawer, I., Krzywińska, E., Bucholc, M., Dobrowolska, G. (2011). SnRK2 protein kinases—key regulators of plant response to abiotic stresses. *Omics: a journal of integrative biology*. 15(2). 859-872.
- Kuşvuran, Ş. (2010). Kavunlarda Kuraklık Ve Tuzluluğa Toleransın Fizyolojik Mekanizmaları Arasındaki Bağlantılar. Doktora Tezi. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Adana.
- Lamichhane, J. R., Venturi, V. (2015). Synergisms between microbial pathogens in plant disease complexes: A growing trend. *Frontiers in Plant Science*. 6, 385
- Lelliott, R. A., Stead, D. E. (1987). ***Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants***. Blackwell Scientific Publications.
- Levitt, J. (2015). *Water, radiation, salt, and other stresses* (Vol. 2). Elsevier.
- Liang, X., Zhang, L., Natarajan, S. K., Becker, D. F. (2013). Proline mechanisms of stress survival. *Antioxidants & redox signaling*. 19(9). 998-1011.
- Liavonchanka, A., Feussner, I. (2006). Lipoxygenases: Occurrence. functions and catalysis. *Journal of Plant Physiology*. 163(3). 348-357.
- Lichtenthaler, H. K., Wellburn, A. R. (1983). Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society Transactions*. 11(5). 591-592.
- Lim, J. H., Kim, S. D. (2013). Induction of drought stress resistance by multi-functional PGPR *Bacillus licheniformis* K11 in pepper. *Plant Pathology Journal*. 29(2). 201-208.
- Livak, K. J., Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*. 25(4). 402-408.
- Lugtenberg, B., Kamilova, F. (2009). Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology*. 63. 541-556.
- Luo, Y., Niu, Y., Gao, R., Wang, C., Liao, W. (2022). Genome-Wide Identification and Expression Analysis of SnRK Gene Family under Abiotic Stress in Cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Agronomy*. 12(7).
- Lürssen, K., Naumann, K., Schröder, R. (1979). 1-Aminocyclopropane-l-carboxylic Acid - An Intermediate of the Ethylene Biosynthesis in Higher Plants. *Zeitschrift*

- für Pflanzenphysiologie*. 92(4). 285-294.
- Mahalingam, R. (2015). Consideration of combined stress: A crucial paradigm for improving multiple stress tolerance in plants. *Combined Stresses in Plants: Physiological, Molecular, and Biochemical Aspects*. 1-25.
- Maheshwari, D. K., Dubey, R. C., Aeron, A., Kumar, B., Kumar, S., Tewari, S., Arora, N. K. (2012). Integrated approach for disease management and growth enhancement of *Sesamum indicum* L. utilizing *Azotobacter chroococcum* TRA2 and chemical fertilizer. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 28(10). 3015-3024.
- Marquez-Santacruz, H. A., Hernandez-Leon, R., Orozco-Mosqueda, M. C., Velazquez-Sepulveda, I., 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(4). 2372-2380.
- Mathooko, F. M. (1996). Postharvest Biology and Technology Review Regulation of respiratory metabolism in fruits and vegetables by carbon dioxide. *Postharvest Biology and Technology*. 9.
- Mayek-Pérez, N., García-Espinosa, R., López-Castañeda, C., Acosta-Gallegos, J. A., Simpson, J. (2002). Water relations, histopathology and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) during pathogenesis of *Macrophomina phaseolina* under drought stress. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 60(4). 185-195.
- McKeon, R. J., Höke, A., Silver, J. (1995). Injury-induced proteoglycans inhibit the potential for laminin-mediated axon growth on astrocytic scars. *Experimental neurology*. 136(1). 32-43.
- McKeon, T. A., Hoffman, N. E., Yang, S. F. (1982). The effect of plant-hormone pretreatments on ethylene production and synthesis of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid in water-stressed wheat leaves. *Planta*. 155. 437-443.
- McMichael, B. L., Jordan, W. R., Powell, R. D. (1972). Short Communication An Effect of Water Stress on Ethylene Production by Intact Cotton Petioles'. *Plant Physiol.* 49. 658-660.
- Melan, M. A., Dong, X., Endara, M. E., Davis, K. R., Ausubel, F. M., Peterman, T. K. (1993). An Arabidopsis thaliana Lipxygenase Gene Can Be Induced by Pathogens, Abscissic Acid, and Methyl Jasmonate'. *Plant Physiology*. 101(2), 441-450.
- Mengü Pamuk, G., Anaç, S., Özçakal, E. (2011). Kuraklık Yönetim Stratejileri. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*. 48(2). 175-181.
- Miko, M., Awotunde, O. S., Yna Muszy Ska, G., Klessig, D. F., Yna Dobrowolska, G. (2000). Osmotic Stress Induces Rapid Activation of a Salicylic Acid-Induced Protein Kinase and a Homolog of Protein Kinase ASK1 in Tobacco Cells. *The Plant Cell*. 12. 165-178.
- Mishra, A. K., Singh, V. P. (2010). A review of drought concepts. *Journal of Hydrology*. 391(1-2), 202-216.
- Mittler, R., Zilinskas, B. A. (1994). Regulation of pea cytosolic ascorbate peroxidase and other antioxidant enzymes during the progression of drought stress and following recovery from drought. *The Plant Journal*. 5(3). 397-405.
- Mohamed, Z. K., El-Hendawy, H. H., Fayed, O. S. (2000). Physiological and biochemical studies on phytopathogenic bacteria isolated from cucumber in Egypt. *Egyptian Journal of Microbiology*. 35(1). 1-20.
- Mohr, P. G., Cahill, D. M. (2003). Abscissic acid influences the susceptibility of

- Arabidopsis thaliana* to *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and *Peronospora parasitica*. *Functional Plant Biology*. 30(4). 461-469.
- Nadeem, S. M., Ahmad, M., Zahir, Z. A., Javaid, A., Ashraf, M. (2014). The role of mycorrhizae and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in improving crop productivity under stressful environments. *Biotechnology Advances*. 32(2), 429-448.
- Nafie, E., Hathout, T., Mokadem, A., Shyma, A. (2011). Jasmonic acid elicits oxidative defense and detoxification systems in *Cucumis melo* L. cells. *Brazilian Journal of Plant Physiology*. 23. 161-174.
- Naveed, M., Hussain, M. B., Zahir, Z. A., Mitter, B., Sessitsch, A. (2014). Drought stress amelioration in wheat through inoculation with *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN. *Plant Growth Regulation*. 73. 121-131.
- Naznin, H. A., Kimura, M., Miyazawa, M., Hyakumachi, M. (2013). Analysis of volatile organic compounds emitted by plant growth-promoting fungus *Phoma* sp. GS8-3 for growth promotion effects on tobacco. *Microbes and Environments*. 28(1). 42-49.
- Olczak-Woltman, H., Schollenberger, M., Niemirowicz-Szczytt, K. (2009). Genetic background of host-pathogen interaction between *Cucumis sativus* L. and *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*. *Journal of applied genetics*. 50, 1-7.
- Ongena, M., Jacques, P. (2008). *Bacillus* lipopeptides: Versatile Weapons for Plant Disease Biocontrol. *Trends in Microbiology*. 16. 115-125.
- Osakabe, Y., Osakabe, K., Shinozaki, K., Tran, L. S. P. (2014). Response of plants to water stress. *Frontiers in plant science*. 5, 86.
- Öztürk, N. Z. (2015). Bitkilerin Kuraklık Stresine Tepkilerinde Bilinenler ve Yeni Yaklaşımlar. *Türk Tarım -Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi*. 3(5). 307-315.
- Pal, K. K., Tilak, K. V. B. R., Saxena, A. K., Dey, R., Singh, C. S. (2001). Suppression of maize root diseases caused by *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium moniliforme* and *Fusarium graminearum* by plant growth promoting rhizobacteria. *Microbiological research*. 153. 209-223.
- Pandey, P., Sinha, R., Mysore, K. S., Senthil-Kumar, M. (2015). Impact of concurrent drought stress and pathogen infection on plants. *Combined Combined stresses in plants: physiological, molecular, and biochemical aspects*, 203-222.
- Panuccio, M. R., Jacobsen, S. E., Akhtar, S. S., Muscolo, A. (2014). Effect of saline water on seed germination and early seedling growth of the halophyte quinoa. *AoB plants*. 6(plu:47).
- Pieterse, C. M. J., Saskia, Van Wees, C. M., Hoffland, E., Van Pelt, J. A., Van Loon, L. C. (1996). Systemic Resistance in *Arabidopsis* Induced by Biocontrol Bacteria Is Independent of Salicylic Acid Accumulation and Pathogenesis-Related Gene Expression. *The Plant Cell*. 8.
- Pohronezny, K., Leben, C., Larsen, P. (1977). Systemic Invasion Of Cucumber By *Pseudomonas lachrymans*. *Phytopathology*. 67(6). 730-734.
- Porta, H., Rocha-Sosa, M. (2002). Plant lipoxygenases. Physiological and molecular features. *Plant Physiology*. 130(1), 15-21.
- Prabhukarthikeyan, R., Saravanakumar, D., Raguchander, T. (2014). Combination of endophytic *Bacillus* and *Beauveria* for the management of *Fusarium* wilt and fruit borer in tomato. *Pest Management Science*. 70(11). 1742-1750.
- Pustovoitova, T. N., Zhdanova, N. E., Zholkevich, V. N. (2004). Changes in the Levels of IAA and ABA in Cucumber Leaves under Progressive Soil Drought. *Russian*

- Journal of Plant Physiology*. 51. 513-517.
- Ramegowda, V., Senthil-Kumar, M. (2015). The interactive effects of simultaneous biotic and abiotic stresses on plants: Mechanistic understanding from drought and pathogen combination. *Journal of Plant Physiology*. 176, 47-54.
- Reymond, P., Farmer, E. E. (1998). Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. *Current opinion in plant biology*. 1(5). 404-411.
- Rizhsky, L., Liang, H., Mittler, R. (2002). The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in tobacco. *Plant Physiology*. 130(3). 1143-1151.
- Romero, F. M., Marina, M., Pieckenstein, F. L. (2016). Novel components of leaf bacterial communities of field-grown tomato plants and their potential for plant growth promotion and biocontrol of tomato diseases. *Research in Microbiology*. 167(3). 222-233.
- Rosenblueth, M., Martínez-Romero, E. (2006). Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 19(8), 827-837.
- Rovira, A. D. (1965). Interactions between plant roots and soil microorganisms. *Annual Reviews in Microbiology*. 19(1). 241-266.
- Ryals, J. A., Neuenschwander, U. H., Willits, M. G., Molina, A., Steiner, H.-Y., Hunt, M. D. (1996). *Systemic Acquired Resistance. The Plant Cell*. 8.
- Ryan, R. P., Germaine, K., Franks, A., Ryan, D. J., Dowling, D. N. (2008). Bacterial endophytes: Recent developments and applications. *FEMS microbiology letters*. 278(1), 1-9.
- Saberi-Riseh, R., Fathi, F., Moradzadeh-Eskandari, M. (2019). The effect of some probiotic bacteria in induction of drought tolerance in cucumber plants. *Advanced Research in Microbial Metabolites & Technology*. 2. 49-63.
- Sagar, S., Dwivedi, A., Yadav, S., Tripathi, M., Kaistha, S. D. (2012). Hexavalent chromium reduction and plant growth promotion by *Staphylococcus arlettae* Strain Cr11. *Chemosphere*. 86(8). 847-852.
- Saravanakumar, D., Kavino, M., Raguchander, T., Subbian, P., Samiyappan., R. (2011). Plant growth promoting bacteria enhance water stress resistance in green gram plants. *Acta Physiologiae Plantarum*. 33(1). 203-209.
- Sarma, R. K., Saikia, R. (2014). Lleviation of drought stress in mung bean by strain *Pseudomonas aeruginosa* GGRJ21. *Plant and soil*. 377. 111-126.
- Saygılı, H., Şahin, F., Aysan, Y., Soylu, S., Mirik, M. (2008). ***Bitki bakteri hastalıkları***. Saygili, H., Aysan, Y., Ustun, N., Mirik, M., Sahin, F. (2008). *Pseudomonas syringae* pathovars and related pathogens–Identification. epidemiology and genomics. ***Tomato pith necrosis disease caused by Pseudomonas species in Turkey***. 357-366.
- Schaller, F. (2000). Enzymes of the biosynthesis of octadecanoid-derived signalling molecules. *Journal of Experimental Botany*. 52(354). 11-23.
- Schenk, P. M., Kazan, K., Wilson, I., Anderson, J. P., Richmond, T., Somerville, S. C., Manners, J. M. (2000). Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 97(21). 11655-11660.
- Schneider, M., Schweizer, P., Meuwly, P., Métraux, J. P. (1996). Systemic Acquired Resistance in Plants. *International review of cytology*. 168. 303-340.
- Schoeneweiss, D. F. (1975). Predisposition. stress. and plant disease. *Annual review of phytopathology*. 13(1). 193-211.
- Selda, Ö. R. S., Ekinici, M. (2015). Kuraklık stresi ve bitki fizyolojisi. *Derim*. 32(2). 327-

- Selvaraj, K., Fofana, B. (2012). An overview of plant photosynthesis modulation by pathogen attacks. *Advances in Photosynthesis–Fundamental Aspects*. 22,466-484.
- Seo, P. J., Lee, A. K., Xiang, F., Park, C. M. (2008). Molecular and functional profiling of Arabidopsis pathogenesis-related genes: Insights into their roles in salt response of seed germination. *Plant and Cell Physiology*. 49(3). 334-344.
- Seo, P., Xiang, F., Qiao, M., Park, J., Lee, Y., Kim, S., Park, CM. (2009). The MYB96 Transcription factor mediates abscisic acid signaling during drought stress response in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 151. 275-289.
- Shailendra Singh, G. G. (2015). Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Current and Future Prospects for Development of Sustainable Agriculture. *Journal of Microbial & Biochemical Technology*. 07(02).
- Shanker, A. K., Maheswari, M., Yadav, S. K., Desai, S., Bhanu, D., Attal, N. B., Venkateswarlu, B. (2014). Drought stress responses in crops. *Functional & integrative genomics*. 14, 11-22.
- Shila, S. J., Islam, M. R., Ahmed, N. N., Dastogeer, K. M. G., Meah. M. B. (2013). Detection of Pseudomonas Syringae pv. Lachrymans Associated with the Seeds of Cucurbits. *Universal Journal of Agricultural Research*. 1(1). 1-8.
- Siedow, J. N. (1991). Plant Lipoxygenase: Structure And Function. *Annual review of plant biology*. 42(1), 145-188.
- Silambarasan, S., Logeswari, P., Valentine, A., Cornejo, P. (2019). Role of Curtobacterium herbarum strain CAH5 on aluminum bioaccumulation and enhancement of Lactuca sativa growth under aluminum and drought stresses. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 183.
- Singh, R. P., Jha, P. N. (2016). A halotolerant bacterium Bacillus licheniformis HSW-16 augments induced systemic tolerance to salt stress in wheat plant (Triticum aestivum). *Frontiers in Plant Science*. 7.
- Skłodowska, M., Gajewska, E., Naliwajski, M., Wielanek, M., Kuźniak, E., Chojak-Koźniewska, J. (2019). Benzothiadiazole and nitrogen source modify the nitrogen metabolism in cucumber infected with Pseudomonas syringae pv. lachrymans. *Scientia Horticulturae*. 246. 289-297.
- SkZ, A., Vardharajula, S., Vurukonda, S. S. K. P. (2018). Transcriptomic profiling of maize (Zea mays L.) seedlings in response to Pseudomonas putida stain FBKV2 inoculation under drought stress. *Annals of Microbiology*. 68(6). 331-349.
- Smith, B. (1915). Pseudomonas syringae pv. lachrymans. *New Zealand Journal of Agricultural Research*.
- Sofy, M. R., Aboseidah, A. A., Heneidak, S. A., Ahmed, H. R. (2021). ACC deaminase containing endophytic bacteria ameliorate salt stress in Pisum sativum through reduced oxidative damage and induction of antioxidative defense systems. *Environmental Science and Pollution Research*. 28. 40971-40991.
- Soma, F., Mogami, J., Yoshida, T., Abekura, M., Takahashi, F., Kidokoro, S., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2017). ABA-unresponsive SnRK2 protein kinases regulate mRNA decay under osmotic stress in plants. *Nature Plants*. 3.
- Song, G. C., Ryu, C. M. (2013a). Two volatile organic compounds trigger plant self-defense against a bacterial pathogen and a sucking insect in cucumber under open field conditions. *International Journal of Molecular Sciences*. 14(5). 9803-9819.
- Song, G. C., Ryu, C. M. (2013b). Two volatile organic compounds trigger plant self-

- defense against a bacterial pathogen and a sucking insect in cucumber under open field conditions. *International Journal of Molecular Sciences*. 14(5). 9803-9819.
- Spoel, S. H., Koornneef, A., Claessens, S. M. C., Korzelijs, J. P., Van Pelt, J. A., Mueller, M. J., Pieterse, C. M. J. (2003). NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. *Plant Cell*. 15(3). 760-770.
- Sturz, A. V., Christie, B. R., Matheson, B. G., Arsenault, W. J., Buchanan, N. A. (1999). Endophytic bacterial communities in the periderm of potato tubers and their potential to improve resistance to soil-borne plant pathogens. *Plant Pathology*. 48(3). 360-369.
- Sudhir Allu, Kumar, N. P., Audipudi, A. V. (2014). Isolation, biochemical and PGP characterization of endophytic *Pseudomonas aeruginosa* isolated from chilli red fruit antagonistic against chilli anthracnose disease. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 3(2). 318-329.
- Suzuki, N., Rivero, R. M., Shulaev, V., Blumwald, E., Mittler, R. (2014). Abiotic and biotic stress combinations. *New Phytologist*. 203(1). 32-43.
- Sziderics, A. H., Rasche, F., Trognitz, F., Sessitsch, A., Wilhelm, E. (2007). Bacterial endophytes contribute to abiotic stress adaptation in pepper plants (*Capsicum annuum* L.). *Canadian Journal of Microbiology*. 53(11). 1195-1202.
- Şahin, Ü., Kurnaz, L. (2014). İklim Değişiklik ve Kuraklık. https://www.researchgate.net/publication/316190182_Iklim_Degisklg_ve_Kuraklk
- Tippmann, H. F., Schlüter, U., Collinge, D. B. (2006). Common themes in biotic and abiotic stress signalling in plants. *Floriculture, ornamental and plant biotechnology*. 52-67.
- Trapet, P., Avoscan, L., Klinguer, A., Pateyron, S., Citerne, S., Chervin, C., Besson-Bard, A. (2016). The *Pseudomonas fluorescens* siderophore pyoverdine weakens *Arabidopsis thaliana* defense in favor of growth in iron-deficient conditions. *Plant Physiology*. 171(1). 675-693.
- Turner, J. G., Ellis, C., Devoto, A. (2002). The jasmonate signal pathway. *Plant Cell*. 14, 153-164.
- Türküsay, H., Saygili, H. (2000). Studies on the reaction of cucumber cultivars to *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* in Western Anatolia. *EPPO Bulletin*. 30(2). 323-326.
- Türküsay, H., Onoğur, E. (1998). Bazı bitki ekstraktlarının in vitro antifungal etkileri üzerine araştırmalar. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*. 22(3). 267-271.
- UÇAR, C., AKKÖPRÜ, A. (2022). Domateste *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in ikincil enfeksiyonuna karşı endofitik bakterilerin biyokontrol kapasitesinin belirlenmesi. *Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*. 26(1). 50-59.
- Van Loon, L. C. (2007). Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *New perspectives and approaches in plant growth-promoting Rhizobacteria research*, 243-254.
- Van Loon, L. C., Bakker, P. A. H. M. (2006). Induced systemic resistance as a mechanism of disease suppression by rhizobacteria. *PGPR: Biocontrol and biofertilization*. 39-66.
- Van Loon, L. C., Bakker, P. A. H. M., Pieterse, C. M. J. (1998). Systemic Resistance

- Induced By Rhizosphere Bacteria. *Annual Review of Phytopathology*. 36.
- Vardharajula, S., Ali, S. Z., Grover, M., Reddy, G., Bandi, V. (2011). Drought-tolerant plant growth promoting bacillus spp.: Effect on growth, osmolytes and antioxidant status of maize under drought stress. *Journal of Plant Interactions*. 6(1). 1-14.
- Vellosillo, T., Martínez, M., López, M. A., Vicente, J., Cascón, T., Dolan, L., Castresana, C. (2007). Oxylipins produced by the 9-lipoxygenase pathway in Arabidopsis regulate lateral root development and defense responses through a specific signaling cascade. *Plant Cell*. 19(3). 831-846.
- Vessey, J. K. (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*. 255, 571-586.
- Vigani, G., Rolli, E., Marasco, R., Dell'Orto, M., Michoud, G., Soussi, A., Daffonchio, D. (2019). Root bacterial endophytes confer drought resistance and enhance expression and activity of a vacuolar H⁺-pumping pyrophosphatase in pepper plants. *Environmental Microbiology*. 21(9). 3212-3228.
- Vinocur, B., Altman, A. (2019). Recent Advances in the Acclimation Mechanisms and Genetic Improvement of Peanut for Drought Tolerance. *Agricultural Sciences*. 10(09), 1178-1193.
- Vurukonda, S. S. K. P., Vardharajula, S., Shrivastava, M., SkZ, A. (2016). Enhancement of drought stress tolerance in crops by plant growth promoting rhizobacteria. *Microbiological Research*. 184, 13-24.
- Wang, K. L. C., Li, H., Ecker, J. R. (2002). Ethylene biosynthesis and signaling networks. *Plant Cell*. 14.
- Wang, L., Hu, W., Sun, J., Liang, X., Yang, X., Wei, S., He, G. (2015). Genome-wide analysis of SnRK gene family in Brachypodium distachyon and functional characterization of BdSnRK2.9. *Plant Science*. 237. 33-45.
- Wang, M., Jiang, B., Peng, Q., Liu, W., He, X., Liang, Z., Lin, Y. (2018). Transcriptome analyses in different cucumber cultivars provide novel insights into drought stress responses. *International Journal of Molecular Sciences*. 19(7).
- Waqar, A., Bano, A., Ajmal, M. (2022). Effects of PGPR Bioinoculants. Hydrogel and Biochar on Growth and Physiology of Soybean under Drought Stress. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*. 53(7). 826-847.
- Watanabe, Y., Ohuchi, A. (1993). Angular Leaf Spot of Cucumber in Japan. *Jarq-japan Agricultural Research Quarterly*. 17. 112-119.
- Wei, L. J., Deng, X. G., Zhu, T., Zheng, T., Li, P. X., Wu, J. Q., Lin, H. H. (2015). Ethylene is involved in brassinosteroids induced alternative respiratory pathway in cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedlings response to abiotic stress. *Frontiers in Plant Science*. 6.
- Welbaum, G. E., Sturz, A. V., Dong, Z., Nowak, J. (2004). Managing soil microorganisms to improve productivity of agro-ecosystems. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 23(2), 175-193.
- Williams, M., Salas, J. J., Sanchez, J., Harwood, J. L. (2000). Lipoxygenase pathway in olive callus cultures (*Olea europaea*). *Phytochemistry*. 53, 13-19.
- Xu, W., Wang, F., Zhang, M., Ou, T., Wang, R., Strobel, G., Xie, J. (2019). Diversity of cultivable endophytic bacteria in mulberry and their potential for antimicrobial and plant growth-promoting activities. *Microbiological Research*. 229, 126328.
- Yang, J., Kloepper, J. W., Ryu, C. M. (2009). Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends in Plant Science*. 14(1). 1-4.

- Yang, X. Y., Jiang, W. J., Yu, H. J. (2012). The expression profiling of the lipoxygenase (LOX) family genes during fruit development. abiotic stress and hormonal treatments in cucumber (*cucumis sativus* L.). *International Journal of Molecular Sciences*. 13(2). 2481-2500.
- Ye. J., Rawson, R. B., Komuro, R., Chen, X., Davé, U. P., Prywes, R., Goldstein, J. L. (2000). ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Molecular cell*. 6(6). 1355-1364.
- Young, T. E., Meeley, R. B., Gallie, D. R. (2004). ACC synthase expression regulates leaf performance and drought tolerance in maize. *Plant Journal*. 40(5). 813-825.
- Yu, Y., Gui, Y., Li, Z., Jiang, C., Guo, J., Niu, D. (2022). Induced Systemic Resistance for Improving Plant Immunity by Beneficial Microbes. *Plants* 11(3), 386.
- Zamioudis, C., Pieterse, C. M. J. (2012). Modulation of Host Immunity by Beneficial Microbes. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 25(2), 139-150.
- Zhang, M., Yang, L., Hao, R., Bai, X., Wang, Y., Yu, X. (2020). Drought-tolerant plant growth-promoting rhizobacteria. *Plant and Soil*. 452. 423-440.
- Zitter, T. A., Murphy, J. F. (2009.). Cucumber mosaic virus *The Plant Health Instructor*.



ÖZ GEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Ceylan Pınar Uçar

Eğitim Bilgileri

Lisans :
Üniversite : Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi
Fakülte : Ziraat Fakültesi
Bölüm : Bahçe Bitkileri
Mezuniyet Yılı : 2013

Yüksek Lisans :
Üniversite : Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi
Enstitü : Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı : Bahçe Bitkileri
Mezuniyet Yılı : 2017

Akademik Yayınlar

- Uçar. C. & ŞENSOY. S. (2022). Validity control of markers used in molecular marker assisted selection in tomato. *Yuzuncu Yıl University Journal of Agricultural Sciences*. 32(2). 300-309.
- Uçar. C.. & AKKÖPRÜ. A. (2021). Tuz stresi altında gelişen bitkilerden izole edilen endofit bakterilerin bazı bitki gelişimini teşvik etme mekanizmalarının ve hıyar fide gelişimine etkilerinin belirlenmesi. *Mustafa Kemal Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*. 26(3). 635-648.
- Uçar. C.. & AKKÖPRÜ. A. (2022). Domateste *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*' in ikincil enfeksiyonuna karşı endofitik bakterilerin biyokontrol kapasitesinin belirlenmesi. *Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*. 26(1). 50-59.
- Uçar. C. P., Selem. E., Tunçtürk. R., Tunçtürk. M., & Akköprü. A. (2023). The Effect of Some Endophytic Bacteria on Seedling Growth and Physiological Properties of *Salvia officinalis* L. *Yuzuncu Yıl University Journal of Agricultural Sciences*. 33(1). 130-139.

VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
LİSANSÜSTÜ TEZ ORJİNALLİK RAPORU

Tarih 27/11/2023

Tez Başlığı: Endofit Bakteri Uygulamalarının Hastalık ve Kuraklık Stresi Altındaki Hıyarlara Etkilerinin Morfolojik, Fizyolojik ve Moleküler Yöntemler ile Belirlenmesi

Y Yukarıda başlığı belirtilen tez çalışmamın kapak sayfası, giriş, ana bölümler ve sonuç bölümlerinden oluşan toplam 117 (yüzonyedi) sayfalık kısmına ilişkin. 27/11/2023 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından TURNİTİN adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre tezimin benzerlik oranı %11 (onbir) dir.

Uygulanan filtreler aşağıda verilmiştir:

- Kabul ve onay sayfası hariç.
- Teşekkür hariç.
- İçindekiler hariç.
- Simge ve kısaltmalar hariç.
- Gereç ve yöntemler hariç.
- Kaynakça hariç.
- Alıntılar hariç.
- Tezden çıkan yayınlar hariç.
- 7 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç (Limit match size to 7 words)

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Lisansüstü Tez Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılmasına İlişkin Yönergeyi inceledim ve bu yönergede belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini bilgilerinize arz ederim.

Tarih ve İmza
27/11/2023

Adı Soyadı: Ceylan Pınar Uçar

Öğrenci No: 17910001057

Anabilim Dalı: Bitki Koruma

Programı: Fitopatoloji

Statüsü: () Yüksek lisans

(X) Doktora

DANIŞMAN
UYGUNDUR

ENSTİTÜ ONAYI
UYGUNDUR