

T.C.

MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK

ANABİLİM DALI

YENİ BİR *Serratia fonticola* EBS19 İZOLATININ  
KARAKTERİZASYONU VE *Botrytis cinerea'* YA KARŞI  
BİYOLOJİK KONTROL AJANI OLARAK  
KULLANILABİLME POTANSİYELİNİN  
ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

EFE BERK BOZKURT

OCAK 2022

T.C.

MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK

ANABİLİM DALI

YENİ BİR *Serratia fonticola* EBS19 İZOLATININ  
KARAKTERİZASYONU VE *Botrytis cinerea'* YA KARŞI  
BİYOLOJİK KONTROL AJANI OLARAK  
KULLANILABİLME POTANSİYELİNİN  
ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

EFE BERK BOZKURT

OCAK 2022

# MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ

## Fen Bilimleri Enstitüsü

### TEZ ONAYI

**Efe Berk Bozkurt** tarafından hazırlanan **YENİ BİR *Serratia fonticola* EBS19 İZOLATININ KARAKTERİZASYONU VE *Botrytis cinerea*' YA KARŞI BİYOLOJİK KONTROL AJANI OLARAK KULLANILABİLME POTANSİYELİNİN ARAŞTIRILMASI** başlıklı tezin 23/12/2021 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda yüksek lisans derecesi için gerekli şartları sağladığı oybirliği/oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

#### TEZ SINAV JÜRİSİ

|                                                                                                                                   |               |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| Prof. Dr. Ömür BAYSAL( <b>Danışman</b> )<br>Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı<br>Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla | İmza<br>_____ |
| Doç. Dr. Ersin DOĞAÇ<br>Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı<br>Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla                     | İmza<br>_____ |
| Doç. Dr. Alper TONGUÇ<br>Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı<br>Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla                    | İmza<br>_____ |
| Prof. Dr. Kubilay Kurtuluş BAŞTAŞ<br>Fitopatoloji Anabilim Dalı<br>Selçuk Üniversitesi, Konya                                     | İmza<br>_____ |
| Doç. Dr. İbrahim Çağatay KARAASLAN<br>Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı<br>Hacettepe Üniversitesi, Ankara                          | İmza<br>_____ |

#### ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI ONAYI

|                                                                                                                |               |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| Prof. Dr. Reşat ÜNAL<br>Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı<br>Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla  | İmza<br>_____ |
| Prof. Dr. Ömür BAYSAL<br>Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı<br>Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla | İmza<br>_____ |

Tez çalışmalarım sırasında elde ettiğim ve sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgelerin tarafımdan bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde edildiğini; akademik ve bilimsel etik kurallarına uygun olduğunu beyan ederim. Ayrıca, akademik ve bilimsel etik kuralları gereği bu tez çalışması sırasında elde edilmemiş başkalarına ait tüm orijinal bilgi ve sonuçlara atıf yapıldığını da beyan ederim.

Efe Berk BOZKURT

## ÖZET

### **YENİ BİR *Serratia fonticola* EBS19 İZOLATININ KARAKTERİZASYONU VE *Botrytis cinerea*' YA KARŞI BİYOLOJİK KONTROL AJANI OLARAK KULLANILABİLME POTANSİYELİNİN ARAŞTIRILMASI**

Efe Berk BOZKURT

Yüksek Lisans Tezi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Profesör Doktor Ömür BAYSAL

Ocak 2022, 55 sayfa

*Botrytis cinerea*, dünya çapında 100 milyar dolarlık ekonomik kayba yol açabilen gri küf hastalığına sebep olan bitki patojeni bir fungustur. Mücadelede kullanılan yüksek doz fungusitlere karşı genetik yapısını değiştirebilme ve hızla fungusit direnci oluşturabilme kabiliyetine sahiptir. Biyolojik kontrol, patojen üzerinde istenilen inhibitör etkinin yanı sıra mücadele uygulamalarında kullanılan çevreye ve insan sağlığına zararlı etkilere sahip kimyasalların olumsuz etkilerini azaltır. Bu çalışmada, patojene yönelik biyokontrol amaçlı kullanılabilecek bir *Serratia fonticola* bakterisinin, toprak florasından izole edilerek *Botrytis cinerea*'nın spor süspansiyonu üzerinde antibiyoz etkisi olduğu tespit edilmiştir. Fenol ile muamele edilerek, ortama çıkan metabolitlerin hücresiz antibiyoz etkisinden fungus sporunun büyümesini engellendiği gözlenmiştir. Patojen büyümesi üzerindeki inhibisyon sonuçları yapılan tek katlı agar ve çift tabakalı agar deneme sonuçları ile doğrulanmıştır. Daha sonra spektrofotometrik analizlere göre belirlenen optimum konsantrasyon (hücre/ml), minimal inhibisyonu konsantrasyonu (MK) ve inhibisyon yüzdesi tespit edilmiştir. *In vitro* testlerde kontrole kıyasla inokulasyondan 3. günde %85 ve 10. günde %65 inhibisyon etkisi olduğu gözlenmiştir. Bakteri suşu (EBS19), tüm genom dizi analizi ile tür ve cins düzeyinde *Serratia fonticola* olarak tanımlanmış ve NCBI veritabanına yüklenmiştir (Acc. Nr: PRJNA788871). KEGG veritabanı kullanılarak yapılan karşılaştırmalı analizler, patojen büyümesi üzerinde baskılayıcı rol oynayan enzimleri kodlayan genleri sınıflandırılarak genom içerisinde yerleri ileride yapılması düşünülen gene spesifik klonlama çalışmaları için tespit edilmiştir. Bu enzimlerden öne çıkan endoglukanaz/selülaz enzimlerinin aktif olarak bakteri suşu tarafından üretilip üretilmediği *in vitro* denemelerle de doğrulanmıştır. Ayrıca, Biolog sistemiyle yapılan analiz ile söz konusu biyolojik ajanın uygulama sonrası toprak mikroflorasıyla etkileşimi esnasında diğer mikroorganizmalara göre karbon kaynağı bakımında

seçicilik yaratabilecek karbon kaynakları belirlenmiştir. Bu verilerin etkili biyopreparat bileşiminin hazırlanması bakımından ileride uygulamaya yönelik avantajlar sağlayacağı düşünölerek söz konusu biyolojik ajan adayının *in vitro* deneylerle teyit edilmiş kullanabileceği spesifik karbon kaynakları da belirlenmiştir.

**Anahtar kelimeler:** *Botrytis Cinerea*, Bakteriyel Biyokontrol, *Serratia Fonticola*, Tüm Genom Sekanslama, Antibiyosis



## ABSTRACT

### CHARACTERIZATION OF A NOVEL *Serratia fonticola* EBS19 BACTERIA AND INVESTIGATION OF ITS POTENTIAL FOR BIOLOGICAL CONTROL AGENT FOR *Botrytis cinerea*

Efe Berk BOZKURT

Master of Science (M.Sc.)

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Prof. Dr. Ömür BAYSAL

January 2022, 55 pages

*Botrytis cinerea* is a plant pathogenic fungus that causes gray mold disease, which can cause economic loss of \$100 billion worldwide. It has the ability to change its genetic structure and rapidly develop fungicide resistance used in agriculture. In addition to the desired inhibitory effect on the pathogen, biological control reduces the negative effects of chemicals that have harmful effects on the environment and human health used in control applications. In this study, it was determined that a *Serratia fonticola* bacterium, which can be used for biocontrol purposes against the pathogen, was isolated from the soil flora and had an antibiosis effect on the spore suspension of *Botrytis cinerea*. It was observed that the growth of the fungus spore was inhibited by the cell-free antibiosis effect of the metabolites released into the environment by treatment with phenol. The inhibition results on pathogen growth were confirmed by the results of the single layer agar and double layer agar experiments. By spectrophotometric analysis, optimum concentration (cell/ml), minimal inhibition concentration (MIC) and percent inhibition were determined. Compared to control group, in vitro tests showed an inhibition effect of 85% on day 3 and 65% on day 10 after inoculation. The bacterial strain was also identified as *Serratia fonticola* (EBS19) by whole-genome shotgun sequence analysis and the sequence data was submitted to NCBI (Acc. Nr: PRJNA788871). Comparative analyzes using the KEGG database classified genes encoding enzymes that play a suppressive role on pathogen growth, and their locations in the genome were determined for future gene-specific cloning studies. In in vitro experiments, the endoglucanase/cellulase enzymes are actively produced by the bacterial strain has also been verified. Additionally, Biolog analyses

showed the specific carbon sources of the bacteria which will provide new insight for the preparation of effective biopreparate composition and its further application *in vivo* assays, which will direct us for applications expected in practice as promising candidate to be biological control agent.

**Keywords:** *Botrytis Cinerea*, Bacterial Biocontrol, Full-Genome Sequencing, Antibiosis, *Serratia Fonticola*





## ÖNSÖZ

“Fungusit dayanıklılığı olan *Botrytis cinerea*’ya karşı bir bakteriyel biyolojik kontrol ajanının kullanım potansiyelinin araştırılması” adlı 19/079/12/1/2 nolu teşvik projesi olan bu çalışma BAP tarafından desteklenmiştir. Öncelikle Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri’ne teşekkürlerimi sunarım.

Bakteri tüm genom sekanslaması İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi BYP-2018-27942 nolu projesi kapsamında tamamlanmıştır, bu kuruma da destekleri için teşekkür ederim.

Lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca desteğini, tecrübelerini ve bilgilerini hep yanımda hissettiğim, araştırmaya ve gelişmeye yönelik ufkumu genişleten, bana her zaman yol gösterici olan danışman Hocam Prof. Dr. Ömür Baysal’a teşekkürlerimi sunarım.

Tezimi kapsamlı bir şekilde inceleyen ve değerli önerileriyle yol gösteren tez jüri üyelerine, çalışmalarımda bilgi ve tecrübesiyle beni yönlendiren Dr. Ragıp Soner Silme’ye, çalışmalarına katkıda bulunan Dr. Anna Marzec-Grządziel’e, yardımlarını benden esirgemeyen birlikte çalıştığım tüm laboratuvar arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Manevi olarak hep destekçim olan Hilal Büşra Tokgöz’e ve her zaman arkamda olan canım aileme canı gönülden teşekkür ederim.

# İÇİNDEKİLER

|                                                                             |             |
|-----------------------------------------------------------------------------|-------------|
| <b>ÖNSÖZ.....</b>                                                           | <b>viii</b> |
| <b>ÇİZELGELER DİZİNİ .....</b>                                              | <b>xi</b>   |
| <b>ŞEKİLLER DİZİNİ .....</b>                                                | <b>xii</b>  |
| <b>SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....</b>                                 | <b>xiii</b> |
| <b>1. GİRİŞ.....</b>                                                        | <b>1</b>    |
| 1.1. <i>Botrytis cinerea</i> Hakkında Genel Bilgiler .....                  | 1           |
| 1.1.1. <i>Botrytis cinerea</i> 'nın patojenitesi .....                      | 2           |
| 1.1.1.1. <i>Reaktif oksijen türevlerinin patojeniziteye etkisi .....</i>    | <i>2</i>    |
| 1.1.1.2. <i>Hücre dışı proteinlerin patojeniziteye etkisi .....</i>         | <i>3</i>    |
| 1.1.1.3. <i>Çevresel faktörlerin patojeniziteye etkisi .....</i>            | <i>4</i>    |
| 1.1.2. <i>B. cinerea</i> 'ya karşı kontrol stratejileri .....               | 5           |
| 1.1.2.1. <i>Kimyasal kontrol .....</i>                                      | <i>5</i>    |
| 1.1.2.2. <i>Direnç indükleyici moleküllerin etkisi .....</i>                | <i>5</i>    |
| 1.1.2.3. <i>Biyolojik kontrol.....</i>                                      | <i>6</i>    |
| 1.1.3. <i>B. cinerea</i> 'ya karşı bakteriyel kontrol mekanizmaları .....   | 7           |
| 1.1.3.1. <i>Ortam rekabeti .....</i>                                        | <i>7</i>    |
| 1.1.3.2. <i>Antibiyosis etkisi .....</i>                                    | <i>8</i>    |
| 1.1.3.3. <i>Litik enzimlerin etkisi .....</i>                               | <i>8</i>    |
| 1.1.3.4. <i>Uçucu organik bileşiklerin etkisi .....</i>                     | <i>9</i>    |
| 1.1.3.5. <i>Konukçu direncinin indüklenmesi .....</i>                       | <i>10</i>   |
| 1.2. <i>Serratia</i> Türü ve Biyokontrol Ajanı Olarak Rolü .....            | 10          |
| 1.2.1. <i>Biyolojik kontrol ajanı olarak Serratia fonticola .....</i>       | <i>11</i>   |
| <b>2. MATERYAL ve METOD.....</b>                                            | <b>13</b>   |
| 2.1. Materyal .....                                                         | 13          |
| 2.1.1. Bakteri kültürü.....                                                 | 13          |
| 2.1.2. <i>B. cinerea</i> kültürü .....                                      | 13          |
| 2.1.3. Besi yerleri ve bileşenleri .....                                    | 13          |
| 2.2. Metot .....                                                            | 14          |
| 2.2.1. Spektrofotometrik analizler .....                                    | 14          |
| 2.2.2. Antifungal denemeler .....                                           | 14          |
| 2.2.3. Tek agar denemeleri .....                                            | 15          |
| 2.2.4. Çift agar denemeleri .....                                           | 15          |
| 2.2.5. Kongo kırmızısı boyama ve endoglukanaz/selüloz aktivitesi testi..... | 16          |
| 2.2.6. BIOLOG ® GENIII MicroPlate Analizi .....                             | 16          |

|           |                                                                     |           |
|-----------|---------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.2.7.    | Bakteri örneğinin tür tayini ve gen profilinin analizi .....        | 16        |
| <b>3.</b> | <b>BULGULAR VE TARTIŞMA .....</b>                                   | <b>19</b> |
| 3.1.      | Antifungal Etki Denemeleri Sonuçları .....                          | 19        |
| 3.1.1.    | Antifungal deneme sonuçları .....                                   | 19        |
| 3.1.2.    | Tek agar denemeleri sonuçları .....                                 | 19        |
| 3.1.3.    | Spektrofotometrik analizler ve O.D./hücre/mL grafiğinin kurulması.. | 22        |
| 3.1.4.    | Çift agar denemeleri .....                                          | 25        |
| 3.2.      | BIOLOG ® GENIII MicroPlate Analizi Sonuçları.....                   | 27        |
| 3.3.      | Endoglukanaz ve Selülaz Aktivitesi Analizleri.....                  | 32        |
| 3.4.      | Tür Tayini ve Gen Profillerinin Analizi .....                       | 32        |
| 3.5.      | TARTIŞMA .....                                                      | 33        |
| <b>4.</b> | <b>SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>                                       | <b>41</b> |
| <b>5.</b> | <b>KAYNAKÇA .....</b>                                               | <b>42</b> |
| <b>6.</b> | <b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>                                                | <b>56</b> |

## ÇİZELGELER DİZİNİ

|                                                                                                                                                                                                                            |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Çizelge 2.1 Kullanılan besi yerlerinin içerikleri .....                                                                                                                                                                    | 14 |
| Çizelge 3.1 NA besi yerinde yapılan tek agar denemelerinin 3 cm uzaklıkta kurulan örneklerinden elde edilen gelişim yarıçapı ve yüzde inhibisyon değerleri sonuçları (GR: Gelişim yarıçapı, %Inh: Baskılama yüzdesi) ..... | 20 |
| Çizelge 3.2 NA besi yerinde yapılan tek agar denemelerinin 2 cm uzaklıkta kurulan örneklerinden elde edilen gelişim yarıçapı ve yüzde inhibisyon sonuçları (GR: Gelişim yarıçapı, %Inh: Baskılama yüzdesi) .....           | 20 |
| Çizelge 3.3 Sıvı kültürde geliştirilen bakteri örneğinin 8 saat aralıklar ile yapılan spektrofotometrik ölçüm değerleri ve ölçüm anında yapılan ekim sonucu elde edilen hücre/mL sonuçları .....                           | 23 |
| Çizelge 3.4 Çift agar çalışmalarında elde edilen gelişim yarıçapları ve inhibisyon yüzdelerinin değerleri .....                                                                                                            | 25 |
| Çizelge 3.5 Mikroplaka analizinde kullanılan ortam içerikleri .....                                                                                                                                                        | 28 |
| Çizelge 3.6 Sekanslama sonucu elde edilen verilerin BLAST sonucu elde edilen proteaz, kitinaz, selülaz ve glukunaz aktivitesi gösteren gen listesi .....                                                                   | 33 |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|                                                                                                                                                                                                                                                                      |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 1.1 <i>Botrytis cinerea</i> gelişimi ve enfeksiyonunun çevrede ve konukçu üzerindeki döngüsü (Elmer ve Michailides, 2007).....                                                                                                                                 | 2  |
| Şekil 2.1 Sekans verisinin biyoinformatik sekans veri işleme akış şemasıyla gösterimi (BAM/FASTQ: sekans verisi, QC: kalite raporu) .....                                                                                                                            | 17 |
| Şekil 3.1 Tek agar ekim yöntemi ile yapılan bakteri ekiminin merkezden 2 cm uzaklıkta kurulan denemeler. K2: kontrol, 2C: deneme örneği. ....                                                                                                                        | 21 |
| Şekil 3.2 Tek agar çizgi ekim yöntemi ile yapılan bakteri ekiminin merkezden 3 cm uzaklıkta kurulan denemeler. K3: kontrol, 3C: deneme örneği.....                                                                                                                   | 22 |
| Şekil 3.3 Ölçüm deneylerinde 8 saatlik periyotlar ile seyreltilerek ekim yapılan örneklerdeki koloni sayılarının değişimi .....                                                                                                                                      | 23 |
| Şekil 3.4 8 Saatlik periyotlar ile gelişen örneğin spektrofotometrik ölçüm sonucu O.D. değerindeki değişimi.....                                                                                                                                                     | 24 |
| Şekil 3.5 O.D./hücre/mL değişimini belirlemek için koloni sayımı yapılan petriler .                                                                                                                                                                                  | 24 |
| Şekil 3.6 Çift agar denemelerinde yapılan örnekler. Sırasıyla 1 numaralı örnekten 12 numaralı örneğe kadar .....                                                                                                                                                     | 27 |
| Şekil 3.7 Ana gruptaki içerikleri 12 saatlik periyotlar (24-96 saat) ile ölçüm yapılan bozunma analizleri.....                                                                                                                                                       | 30 |
| Şekil 3.8 Mikroplaka uygulamasında hazırlanan 46 çeşit ortam içeriğinin .....                                                                                                                                                                                        | 31 |
| Şekil 3.9 Kongo kırmızı ile boyama deneyinde elde edilen petri sonuçları. Örneklerde boyama öncesi koloni gelişimi gözlenmiş, boyama sonucunda koloni bölgelerinde değişim gözlenmemiştir. Soldan sağa; kontrol, uygulama, kontrol boyanmış, uygulama boyanmış ..... | 32 |

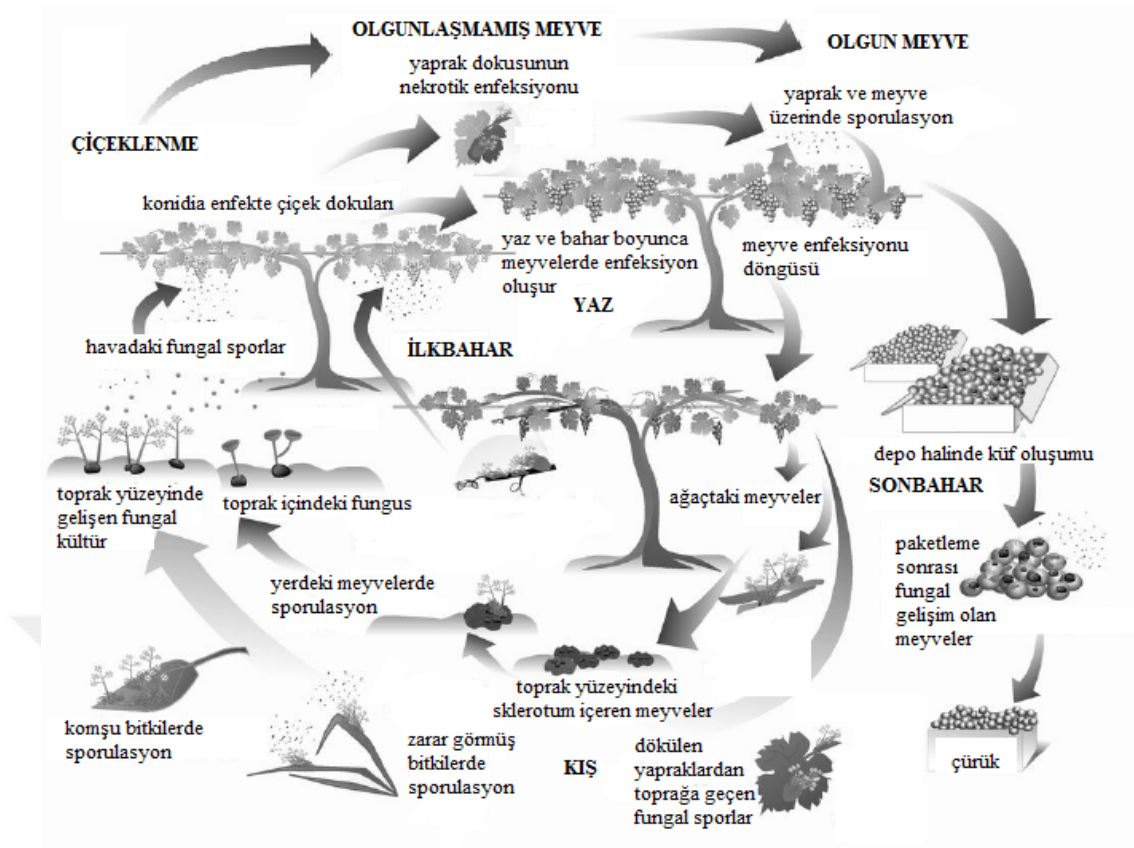
## SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

|                               |                                       |
|-------------------------------|---------------------------------------|
| ROS                           | Reaktif oksijen türevleri             |
| GY                            | Gelişim yarıçapı                      |
| SS                            | Standart sapma                        |
| NOX                           | NADPH oksidasyonu                     |
| NADPH                         | Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat |
| $\Delta$ bcnoXR               | BcNoxR silinen mutant suş             |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | Hidrojen peroksit                     |
| HDPE                          | Hücre duvarı parçalayıcı enzimler     |
| SA                            | Salisilik asit                        |
| JA                            | Jasmonik asit                         |
| MeJA                          | Hücre dışı üretilen jasmonik asit     |
| ASC                           | Askorbat                              |
| GSH                           | Glutatyon                             |
| NA                            | Nutrient agar besiyeri                |
| NB                            | Nutrient broth besiyeri               |
| PDA                           | Patates dekstrozu agar besiyeri       |
| CMCA                          | Karboksimetilselüloz besiyeri         |
| O.D.                          | Optik yoğunluk                        |
| C.F.U.                        | Koloni oluşturabilen birim sayısı     |
| MK                            | Minimum konsantrasyon                 |

# 1. GİRİŞ

## 1.1. *Botrytis cinerea* Hakkında Genel Bilgiler

*Botrytis cinerea*, gri küf hastalığına sebep olan nekrotrof bitki patojeni bir fungustur. Ekonomik değeri yüksek çok sayıda tarımsal ve botanik bitki türlerinde, üretim ve depolama süreçlerinde miktar ve kalite değerlerinde önemli ölçüde kayba neden olmaktadır (Williamson vd., 2007; Sharma vd., 2009). Yalnızca üretim sırasında değil, taşıma ve depolanma süreçlerinde de hastalık oluşumu göstermesi mücadelesinde ekonomik yük ve zorluklar çıkarmaktadır. *Botrytis* üzerinde etkin fungusit kullanımları dirençli suşların gelişimi (Leroux, 2004; Walker vd., 2013; Hahn, 2014; Romanazzi ve Feliziani, 2014) insan ve çevre sağlığı üzerindeki etkileri göz önüne alındığında, giderek artan bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır (Komárek vd., 2010). Sahip olduğu genetik yapısını kolaylıkla değiştirme, kısa hayat döngüsü ve üreme hızı *Botrytis cinerea* patojeninin fungusitlere direnç geliştirme bakımından yüksek riskli sınıfta yer almasına neden olmaktadır (Leroux vd., 2002). Günümüzde fungusit direncine sahip *Botrytis* izolatları tüm dünyada birçok bitki çeşidinde tespit edilmiştir (Leroux, 2004; Zhao vd., 2010; Walker vd., 2013; Hahn, 2014). Bu bağlamda, kimyasal kullanımına alternatif olabilecek zararsız mikroorganizmaların biyolojik kontrol ajanı olarak kullanımı, umut vadeden bir yaklaşım olarak görülmektedir. Ancak günümüzde efektif olan mikrobiyal kontrol ajanları sınırlı miktardadır (Nicot vd., 2011; Romanazzi vd., 2016).



Şekil 1.1 *Botrytis cinerea* gelişimi ve enfeksiyonunun çevrede ve konukçu üzerindeki döngüsü (Elmer ve Michailides, 2007)

### 1.1.1. *Botrytis cinerea*'nın patojenitesi

*Botrytis cinerea*'nın konukçu üzerinde hastalık yapabilme kabiliyeti şu metabolik faaliyetlere göre değişiklik göstermektedir.

#### 1.1.1.1. *Reaktif oksijen türevlerinin patojeniziteye etkisi*

Reaktif oksijen türevleri (ROS), DNA'ya zarar vermesi, lipid peroksidasyonu ve protein oksidasyonuna sebep olmasıyla canlıya zararlı etkileri bulunmaktadır (Heller ve Tudzynski, 2011; Qin vd., 2011). Bunun yanı sıra ROS membrandan geçebilen sinyal molekülü görevi görebilmektedir (Orozco-Cardenas vd., 2001; Heller ve Tudzynski, 2011). Enfeksiyonun erken evrelerinde konukçu bitkiler işgalci patojene karşı oksidatif yanma göstererek yüksek seviyede ROS üretimi gerçekleştirir (Mellersh vd., 2002; Tian vd., 2013). Buna karşın nekrotrof özellikteki *B. cinerea*, enfeksiyona karşı üretilen ROS moleküllerini ve kendi üretebildiği ROS moleküllerini enfeksiyonun gelişimi adına kullanabilmektedir. *B. cinerea* ROS moleküllerini



metabolik etkinliğinde yan ürün veya ana ürün olarak NADPH oksidasyonu (NOX) ile üretebilir (Li vd., 2016). NOX, NADPH'tan aldığı elektron ile oksijenin süper okside dönüşmesini sağlayan çok birimli komplekstir (Bedard vd., 2007). Alt ünitelerinin her ikisi de patojenisite ve sklerotium oluşumunda, farklı olarak BcNoxA konukçu üzerinde kolonileşmede, BxNoxB birincil enfeksiyonun oluşumunda etkilidir (Siegmond vd., 2015; Marschall vd., 2016; Segmuller vd., 2008). Yapılan çalışmalarda regülatör alt birim olan BcNoxR'nin yokluğunda büyüme, sporulasyon ve belirli tür bitkilerde patojenezitenin azaldığı gözlenmiştir (Li vd., 2016). BcNoxR gen bölgesi silinen mutantlarda ( $\Delta$ bcnoxR) 49 özel proteinin değişim gösterdiği ve BcNoxR'nin stres regülasyonu, karbonhidrat metabolizması, translasyon ve hücre içi sinyal iletimi gibi olaylarda etkili proteinlerin ekspresyonunun etkilendiği gözlenmiştir (Li vd., 2016). ROS moleküllerinde  $H_2O_2$  diğer ROS'lara göre daha kararlı yapıdadır ve çalışmaya daha uygundur (Waghray vd., 2005).  $H_2O_2$  hücre içi ve hücreler arası sinyal molekülü olarak görev yapabilmektedir ancak lipid hücre zarından serbest difüzyon ile geçişi mümkün değildir (Pletjushkina vd., 2006; Rice, 2011, Seaver ve Imlay, 2001). Zar üzerinde yer alan kanal proteinlerinin yardımına ihtiyaç duyar. Aquaporinler  $H_2O_2$ 'nin transportunda etkin kanal yollarıdır. *B. cinerea*'da yer alan aquaporin8 (BcAQP8) ROS'ların membranlar arasında transportunda ve ROS kaynağı olan mitokondrinin parçalanmasında etkilidir. BcAQP8, ROS transportunun yanı sıra BcNoxR ekspresyonunu da etkilemektedir ve yokluğu durumunda *B. cinerea*'nın büyüme, sporulasyon ve patojenezite etkinliğinde azalma gözlenmektedir (An vd., 2016).

#### 1.1.1.2. Hücre dışı proteinlerin patojeneziteye etkisi

Bitki hücre duvarı patojenlere karşı ilk savunma hattı olarak yer alan polisakkarit ve protein bileşenlerden oluşan bir yapıdır (Kubicek vd., 2014). *B. cinerea* yapısal olarak bitki hücre duvarına ulaşmada yeterli değildir (Choquer vd., 2007), bu nedenle hücre duvarı parçalama enzimlerinin (HDPE) üretimine ihtiyaç duyar. Bu enzimler sayesinde hücre duvarının aşılması ve konukçu hücrelere entegrasyon gerçekleştirilebilir. *B. cinerea*'da 1155 genin glikosidik bağların yapım, düzenlenme ve yıkımında görevli olduğu düşünülmektedir. Bunların bir kısmı hücre dışı matrikste sinyal sekansı olarak görev alırken, az sayıda gen *B. cinerea*'nın patojenezitesinde fonksiyonel olduğu belirlenmiştir (Fillinger ve Elad, 2016). Endopoligalakturonaz

enzimleri (BcPG, BcPG2) *B. cinerea* 'nın virülensliğinde etkilidir (ten Have vd., 1998). Domates bitkisinde BcPG1 birincil enfeksiyon oluşumu için elzem değildir ancak kolonileşme ve yayılım durumlarında gereklidir. BcPG2 ise enfeksiyon oluşumu ve lezyon gelişiminde etkilidir (Kars vd., 2005). Birçok hücre duvarını parçalayan enzim (HDPE) *B. cinerea* 'nın enfeksiyon oluşturmada etkili olmasına rağmen ana rol oynamazlar. Yapılan çalışmalarda HDPE silinen mutant bireylerin virülens etkinliklerinde bir değişiklik gözlenmemiştir. Bu enzimlerin çok sayıda ve miktar olarak yüksek oranda bulunmasından, birlikte çalışma ve fonksiyon göstermesiyle patojen enfeksiyonu esnasında beraber etkinlik oluşturduğu ileri sürülmektedir (Kars vd., 2005).

#### 1.1.1.3. Çevresel faktörlerin patojeniziteye etkisi

Ortam pH'sı ve ışık *B. cinerea* 'nın patojenizitesinde etkin çevresel faktörler arasında yer alır. Ortamın pH değeri *B. cinerea* 'nın konukçu ile interaksiyonunda başlıca etmendir. Bitki yapılarında farklı dokulardaki hücreler farklı pH değerlerine sahiptir. Meyve kısımları 3,32 ile 4,39, yaprak, kök ve gövde kısımları 5,81 ile 6,3 pH değerleri arasında ortama sahiptir (Manteau vd., 2003). Yapılan çalışmalarda farklı pH değerlerinde interaksiyona sokulan *B. cinerea* 'nın, ürettiği proteinlerin analizinde pH 4 değerinde proteinlerin çoğunlukla proteoliz, pH 6 değerinde ise büyük çoğunluğunun HDPE ile konukçu hücrelerini etkilediği belirlenmiştir. Protein farklılığının yanı sıra, *B. cinerea* 'nın ortamın farklı pH değerlerinde regülasyon göstererek transkripsiyon seviyelerinde ince ayarlamalar ile enfeksiyonun sağlanması adına değişiklik gösterdiği gözlenmiştir (Li vd., 2012). *B. cinerea*, bulunduğu bitki dokusunda oksalik asit salınımıyla ortamın pH değerinin asidik olmasına neden olur.

Işık, *B. cinerea* için enerji kaynağı, sinyal ve stres faktörü olarak yaşamsal öneme sahiptir (Manteau vd., 2003). *B. cinerea*, ışığa karşı duyarlıdır ve aktif olarak ışık durumunu algılayarak gelişimini ve patojenizitesini ayarlar (Zhang vd., 2016). Işığın bulunması veya ortamda olmaması *B. cinerea* 'nın sklerotium veya konidiyum formlarını oluşturmada tetikler (Fillinger ve Elad, 2016). Konidiyum, ışığın bulunduğu durumda gözlenen aseksüel yapı olup, hızlı gelişim ve üreme gösteren halidir (Brandhoff vd., 2017). Sklerotium ise ışığın bulunmadığı durumda zorlu çevre

şartlarında fungusun devamlılığını sağlamak adına oluşturduğu seksüel sporlardır (Hua vd., 2018).

#### 1.1.2. *B. cinerea*' ya karşı kontrol stratejileri

*B. cinerea*'nin konukçusu olan bitkilerin üretim alanlarında patojen tarafından oluşan ekonomik zararları düşürmek amaçlı anti fungal etki gösteren kimyasalların yanı sıra, bitkilerin direnç gelişimini tetikleyen dayanıklılık teşvikleyici bileşikler ve biyolojik kontrol ajanları ile kontrol stratejileri düşünülmektedir.

##### 1.1.2.1. Kimyasal kontrol

Kimyasal kontrol yöntemlerinde temel amaç *B. cinerea* tarafından oluşan hastalıkların gelişimini sentetik fungusitler kullanmak suretiyle engellemektir (Leroux, 2007). Ancak fungusit kullanımı *B. cinerea*'nin direnç geliştirmesi ve uygulanan fungusitlerin doz miktarının fazla olması ve fungusit maliyetlerinin artması şeklinde iki ana problemi beraberinde getirmektedir (Hua vd., 2018). Bunlara ek olarak kullanılan kimyasalların toksik kalıntıları çevre ve insan sağlığına da olumsuz etkileri olmaktadır (Droby vd., 2009).

##### 1.1.2.2. Direnç indükleyici moleküllerin etkisi

Salisilik asit (SA) ve jasmonik asit (JA) gibi sinyal molekülleri bitkilerin fungal patojenlere karşı direnç gelişiminin tetiklenmesine neden olabilir (Park vd., 2007; Robert-Seilanianantz vd., 2011). SA'nın farklı fungal patojenlerde lezyon gelişimini düşürdüğü ve antioksidan proteinlerin, ısı şoku proteinlerin ve dehidrogenaz enzimlerinin dirençte etkin olduğu gözlenmiştir (Chan vd., 2008). Spreyleme şeklinde domates bitkilerinin toprak üstü kısmına jasmonik asit ve metil jasmonik asit (MeJA) uygulamaları *B. cinerea* enfeksiyonuna karşı yüksek direnç neden olmuş, askorbat (ASC) ve glutatyon (GSH) miktarının artışı gözlenmiştir. Esasen, ASC ve GSH molekülleri ROS'ların ortamdan uzaklaştırılmasında ve oksidatif hasarın azaltılmasında etkilidir (Zhu ve Tian, 2012). MeJA uygulanan Çin koca yemişinde, birincil direnç yanıtının oluşumunun, hidrojen peroksit miktarının artışı ile dayanıklılık ile ilgili proteinlerin ve antimikrobiyal bileşenlerin üretiminin yükseldiği ve fungal patojenlere karşı direncin geliştiği gözlenmiştir (Wang vd., 2014).

#### 1.1.2.3. *Biyolojik kontrol*

Beattie ve arkadaşlarına göre (2006), bitki hastalıklarını engelleyici veya hastalık yapıcı etkisini düşürücü bakteriler “biyokontrol ajanı”, patojene karşı antagonistik etkiye sahip bakteriler ise “antagonist” olarak tanımlanmıştır. Biyolojik kontrol stratejilerinde biyolojik mikroorganizmaların kullanımı ile tarımsal ürünlerde gelişim esnasında ve tüketime kadar depolanma süresince hastalık gelişiminin engellenmesi düşünülmektedir (Sharma vd., 2009). Yapılan çalışmalar ile antagonistik mayaların ürünlerde toplanma sonrasında *B. cinerea*’nın neden olduğu bozulmaları etkili şekilde engellediği gözlenmiştir (Piano vd., 1997; Fan ve Tian, 2001; Tian vd., 2002; Qin vd., 2004). Mayaların fungal patojenlere karşı ortam rekabeti, konukçu direnci indüklemeye veya hücre duvarını parçalayıcı litik enzimlerin üretilmesi gibi yollarla patojenlere karşı etki gösterdiği tespit edilmiştir (Janisiewicz vd., 2000; Chan ve Tian, 2005, Navazio vd., 2007; Tian vd., 2007; Yang vd., 2009; Hermosa vd., 2012). Antagonistik mayalar patojen ile etkileşimi sonucu toksik sekonder metabolit üretimi göstermediğinden bakterilere kıyasla daha güvenli bulunmaktadır (Tian, 2006). Buna karşın, antifungal mayaların etkileri fungusit kullanımı ile elde edilen sonuçlara göre çok daha düşüktür, bunların fungusit veya farklı bileşikler ile ortak kullanımı daha etkili sonuç göstermiştir (Droby vd., 2009). Kalsiyum klorid (An vd., 2012), salisilik asit (Qin vd., 2003; Chan ve Tian, 2006; Zhang vd., 2010), sodyum bikarbonat (Yao vd., 2004), silikon (Qin ve Tian, 2005), boron (Cao vd., 2012) ve glisin betain (Liu vd., 2011) gibi bileşikler ile uygulanan mayalar biyokontrol etkinliğinin artmasına ve hasat sonrası hastalık oluşumunun engellenmesinde önemli derecede etkili oldukları gösterilmiştir.

Yapılan çalışmalarda *B. cinerea*’ya karşı farklı mekanizmalarında etkinlik gösteren bakteriyel biyokontrol ajanları ortamdaki besin maddelerinin patojen aleyhine sınırlandırması, *B. cinerea*’nın gelişim ve çoğalmasının hızlı olduğu konidium oluşumunu inhibe ettiğini göstermiştir (Haidar vd., 2016; Köhl vd., 2011). Bitki büyümesini teşvikleyici rhizobakter (BBTR) türlerinin bitki hastalıklarına karşın biyokontrolde de etkili olduğu gözlenmiştir (Bloemberg ve Lugtenberg, 2001; Labuschagne vd., 2010; Karunaratne, 2011; Pan ve Bhagat, 2011; Bhattacharyya ve Jha, 2012; Glick, 2012; Gupta vd., 2015).

### 1.1.3. *B. cinerea*'ya karşı bakteriyel kontrol mekanizmaları

#### 1.1.3.1. Ortam rekabeti

Ortamdaki besinler ve ekolojik niş açısından oluşan rekabet bitkilerin patojenlere karşı biyolojik kontrol etkinliği olan bakteriler tarafından korunmasında önemlidir (Cabrefiga vd., 2007; Lugtenberg ve Kamilova, 2009). *B. cinerea* konidium oluşumu, germ tüpü gelişimi ve enfeksiyonun tamamlanması bakımından dış kaynaklara bağlıdır. Bu nedenle rekabete karşı oldukça duyarlıdır (Elad ve Stewart, 2004; Haidar vd., 2016). Bu duyarlılık ürünlerin hasat sonrası korunmasında ana yöntem olarak ele alınmaktadır (Duffy, 2001; Spadaro ve Gullino, 2004; Sharma vd., 2009; Jamalizadeh vd., 2011). Antagonistik ajanların hasat sonrası ürünler üzerinde *B. cinerea*'dan önce kolonize olması hastalık oluşumunun engellenmesinde önemlidir (Nunes vd., 2001, 2002; Sharma vd., 2009; Jamalizadeh vd., 2011). Yapılan çalışmalarda, ortama sınırlı miktarda besin maddesi verildiğinde bakterinin yaralandığı besin miktarı anahtar rol oynamaktadır (Huang ve Erickson, 2005; Haidar vd., 2016). Ortamda besin miktarının azaltılması, *B. cinerea*'ya kalan kaynak miktarını kısıtlamakta ve enfeksiyon oluşumunu baskılamaktadır. Sera koşullarında *Pseudomonas putida* Cha94 ve *Bacillus amyloliquefaciens* BL3i biber bitkisinin çiçek ve yaprak kısımlarına uygulanması sonucu bu noktalarda kolonileşmesi ile *B. cinerea* enfeksiyonunu kontrol edilmesi sağlanmıştır (Park vd., 1999). Bitkinin kök kısmında rizosfer bölgesinde bakterilerin optimum gelişmesi biyokontrol etkinliği açısından kritiktir. Mercimek fidelerinde *Pantoea agglomerans* LRC954 ve *Pseudomonas fluorescens* LRC1788 bakterilerinin rizosfer kolonizasyonu ile *B. cinerea* semptomlarının baskılandığı gözlenmiştir (Huang ve Erickson, 2002, 2005). *B. cinerea*'nın konidium oluşumu ortamın besin miktarına doğrudan bağlı olmasının yanı sıra sonrasında, enfeksiyon gelişimi de besin miktarının bakteri tarafından daha etkin kullanılması ile engellenebilir. Rekabet oluşturacak antagonistik bakterilerin bitkinin çeşitli kısımlarına uygulanarak kolonize edilmesi, *B. cinerea*'nın ortamdaki besin kaynaklarına erişimini kısıtlayacaktır. Rekabete bağlı olarak patojenin uzaklaştırılması, bitkinin olgunlaşma ve hasat sonrası depolama süresince korunmasına yönelik uygun bir metod olarak görülmektedir (Wilson ve Wisniewski, 1994; Liu vd., 2013; Spadaro ve Droby, 2016.)

#### 1.1.3.2. Antibiyosis etkisi

Antibiyosis etkisi, bakterilerin biyokontrol aktivitesinde önemli olan mekanizmalardan biridir (Ghaouth vd., 2004). Mikroorganizmalar tarafından üretilen antimikrobiyal özellikteki organik ve düşük moleküler ağırlıkta bileşikler diğer mikroorganizmalara karşı büyümede ve metabolik aktivitelerin engellenmesinde önemli derecede bir etkiye sahiptir. Literatürde *B. cinerea*'ya karşı antifungal metabolit üretimi gösteren bakterilerin *in vitro* koşullarda ve geniş konukçu türlerinde potansiyel biyokontrol aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir. *Bacillus subtilis* türünün siklo-halkalı lipopeptidleri de içeren geniş çeşitlilikte güçlü antifungal metabolit ürettiği ve pek çok bitki patojeninin büyüme ve gelişmesini inhibe edici etki gösterdiği belirlenmiştir (Haidar vd., 2016). Bakteri translokasyonu, sitotoksik aktivite, antimikrobiyal aktivite ve bitki patojenizitesi gibi farklı fonksiyonlara sahip olan lipopeptidler yüzeysel aktif madde olarak biyoteknolojik ve biyofarmakositik uygulamalarda kullanılma potansiyelleri vardır (Ongena ve Jacques, 2008). Lipopeptidlerin antimikrobiyal etkisi, patojenlerde lipid membrana bağlanarak yapısal değişim ve hasara yol açmasıdır (Henry vd., 2011; Patel vd., 2011; Pérez-García vd., 2011). Antibiyosis etkisine sahip bakterilerin biyokontrol ajanı olarak kullanım potansiyelinin arttığı düşünülmektedir (Raaijmakers vd., 2002; Raaijmakers ve Mazzola, 2012). Ancak saha çalışmalarında antimikrobiyal bileşiklerin etkileri çeşitli abiyotik faktörlerden etkilenmektedir. Doğal hava koşullarında yağmur etkisi bu bileşiklerin ortamdan uzaklaştırılmasına sebep olmaktadır (Tampakaki vd., 2009; Pretorius vd., 2015). Bu tipte saha çalışmalarında düşük seviyede antibiyosis etkisi gösteren biyokontrol ajanlarının kullanımı daha uygundur. Ancak belli antimikrobiyal bileşenlere karşı da direnç geliştirmiş *B. cinerea* türleri olduğu belirlenmiştir (Schoonbeek vd., 2002; Duffy vd., 2003; Bardin vd., 2015).

#### 1.1.3.3. Litik enzimlerin etkisi

Bazı enzimler patojenlerin virülens faktörlerini degrade ederek veya toksitesini engelleyerek etki gösterir (Germeier vd., 1994). Oksalik asit, *B. cinerea*'nın virülenslik göstermesine katkıda bulunur ve oksalat degradasyonu gösteren bakteriyel suşların *B. cinerea* patojenizitesini düşürdüğü gözlenmiştir (Germeier vd., 1994, Schoonbeek vd., 2007). Hücre dışı hücre duvarı parçalayıcı enzimler bakterilerin biyokontrol kabiliyetleri ile ilişkilendirilmiştir. Kitinaz, glukanaaz, selüloz, proteaz ve lipaz

patojenik fungusun hücre duvarının parçalanmasında etkili olduğundan bunların belli yollarla baskılanması patojen engellenmesinde önemlidir (Neeraja vd., 2010; Maksimov vd., 2011; Bouizgarne, 2013). Yapılan çalışmalarda hücre dışı antifungal enzimler ile *in vitro* koşullarda *B. cinerea* 'nın baskılanması sağlanmıştır. Farklı bakteri türlerinin *B. cinerea* enfeksiyonuna karşı farklı etki mekanizmalarıyla baskılama gösterdiği gözlenmiştir. *Serratia plymuthica* ve *S. marcescens* 'ın kitinaz ve proteaz gibi litik enzimler salgıladığı ve *B. cinerea* dahil bazı patojenlerin gelişimini baskıladığı gözlenmiştir (Essghaier vd., 2009). Biyokontrol ajanı bakterilerin gösterdiği bir diğer etki *B. cinerea* 'ya ait olan ve konukçu interaksyonunun sağlanmasında önemli role sahip hidrolitik enzimlerin inhibisyonu mekanizmasıdır (Baarlen vd., 2007; Nakajima ve Akutsu, 2014; Nafisi vd., 2015). Yapılan çalışmalarda asma bitkisinde *Bacillus circulans* bakterisinin *B. cinerea* 'ya ait pektinliyaz ve poligalakturonaz aktivitesini düşürdüğü ve bu yolla biyokontrolünün sağladığı gözlenmiştir (Paul vd., 1997). Bu etki mekanizmasının patojenin bulunma durumu ele alındığında düşük seviyede bir etkinlik olduğu düşünülmektedir ve biyolojik ajan *B. cinerea*, konukçu üzerinde enfeksiyonu oluşturmada önce bitki yüzeyinde kısa süreli olarak tutunabilmektedir (Wiśniewski vd., 1991; Zimandvd., 1996; Kapat vd., 1998; Spadaro ve Droby, 2016). Litik enzimler, mayaların biyokontrol aktivitesinde bakterilere göre daha öncü role sahiptir. Yapılan çalışmalarda mayalar tarafından üretilen enzimler ve bu enzimlerin hasat sonrası korumada etkinliği hakkında bilgiler edinilmiştir (Pretorius vd., 2015, Spadaro ve Droby, 2016).

#### 1.1.3.4. Uçucu organik bileşiklerin etkisi

Bakteriyel uçucu organik bileşikler patojenler üzerinde çalışılmış ve bu bileşiklerin bitki patojenlerine karşı başarılı biyokontrol yöntemi olduğu düşünülmektedir (Ryu vd., 2004; Effmert vd., 2012). Bakteriyel bileşikler, fungus gelişimini ve spor oluşumunu engelleyici veya bitki gelişimini destekleyici etki gösterebilir (Kai vd., 2007; Kai vd., 2009). Ancak bir bakteriden elde edilen bileşikler farklı patojenler üzerinde aynı türde ve seviyede etki göstermeyebilir. Bu etki özel bakteri-fungus eşleşmelerine bağlı olabilir (Kai vd., 2009). *Streptomyces* türlerinden elde edilen VOC'ların *Botrytis spp.* tarafından çilekte meyve çürümesini, pirinçte ve kolza tohumunda yaprak solmasını azalttığı gözlenmiştir (Wan vd., 2008). Farklı bakterilerden elde edilen VOC'lar *B. cinerea* üzerinde farklı seviyelerde inhibisyon

gösterdiği gözlenmiştir. Güçlü antimikrobiyal potansiyelinin yanı sıra VOC'lar bitki gelişimini ve abiyotik strese karşı toleransını ve indüklenen sistemik direnç gelişimini tetikleyebilir (Ryu vd., 2003, 2004; Bhattacharyya vd., 2015; Kanchiswamy vd., 2015; Liu ve Zhang, 2015).

#### 1.1.3.5. *Konukçu direncinin indüklenmesi*

Bitki büyüme destekleyici bakterilerin (PGPR) bir kısmında indüklenen sistemik direnç (ISR) mekanizmasını tetikleyerek konukçu bitkinin savunma mekanizmalarını arttırarak patojenlere karşı korunumu sağlayabilir. Bu etki ile patojene karşı daha etkili ve hızlı yanıt oluşumu sağlanabilir (Van Loon vd., 1998; Bloemberg ve Lugtenberg, 2001). Bakteriler tarafından salgılanan birçok bileşiğin *B. cinerea*'ya karşı ISR mekanizması ortaya konmuştur (Ongena vd., 2005; Ongena ve Jacques, 2008; Wu vd., 2015.) Bu etki konukçu bitki içerisinde enerji aktarımı ile ilişkilidir. Bu aktarım bitki gelişiminde savunma mekanizmalarının lehine gerçekleşir ve bakterinin konukçu ile simbiyotik etkileşimi patojenin üzerinde e negatif etkilere sebep olabilir (Walters ve Heil, 2007; Walters vd., 2013).

### 1.2. *Serratia* Türü ve Biyokontrol Ajanı Olarak Rolü

*Serratia* türleri *Enterobacteriaceae* ailesine mensup gram negatif bakterilerdir. Doğada su ve toprakta, bitkiler ve insan dahil hayvanlar içerisinde bulunur. Bitki etkileşimli alt türleri endofit ve serbest yaşamsal formlarında bulunabilmektedir (Hallmann vd., 1997). İzole edilen birçok alt türü bitki büyüme destekleyici veya toprak kaynaklı fungal patojenlere karşı potansiyel biyokontrol ajanı olarak bilinmektedir. *Serratia* türleri bitki kök ve dokularına yerleşir ve büyümeyi indükler. Kolonize olan *Serratia* türüne bağlı olarak fosfat çözünmesi ve siderofor oluşumu ile nutrient alımının artması, indol-3-asetik asit gibi uyarıcı bitkisel hormonların sentezi gibi yolaklar aracılığıyla bitki büyümesinin desteklenmesi gerçekleşir (Kloepper vd., 1993; de Queiroz ve de Melo 2006; Tripura vd., 2007). *Serratia* türleri bitkilerin ISR gelişimini teşvik eder. *Serratia* türleri sahip oldukları potansiyel nedeniyle araştırmacılar tarafından ilgi çekmektedir.

*Serratia* türleri, ayrıca toprakta patojen ile ortam rekabetinde ve metabolit üretimi konusunda en etkili türler arasındadır. Üretilen metabolitler arasında antibiyotikler,



sideroforlar, hidrojen siyanür (HCN), hücre duvarı parçalayıcı enzimler, quorum-sensing molekülleeri ve N-Açıl homoserin lakton (AHLs) yer almaktadır (Kloepper 1993; Ebebak vd., 1998; Someya vd., 2002, 2003, 2005; Liba vd., 2006; Tripura vd., 2007; Koo ve Cho 2009; Chakraborty vd., 2010; Zahir vd., 2011; Ryu vd., 2013). *Serratia* tarafından sağlanan biyolojik kontrol fungal hücre duvarını parçalayıcı kitinaz, glukanaaz gibi hidrolitik enzimlerin sentezi, besinve kolonileşme açısından ortam rekabeti, bitkinin enfeksiyona karşı stresi regüle etmesine yönelik etilen regülasyonu ve antibiyotik ve siderofor üretimi ile gerçekleşir. *Serratia* türlerinin pirinç (Jaiganesh vd., 2007), patates (Berg vd., 2005; Gould vd., 2008), turunç (de Queiroz ve de Melo 2006), salatalık (Kamensky vd., 2003; Roberts vd., 2005), domates (Yazici vd., 2011), çilek (Kurze vd., 2001), biber (Shen vd., 2002, Kim vd., 2008) bitkilerinde toprak kaynaklı patojenlere karşı yüksek seviyede inhibisyon göstererek antagonistik etkisi belirlenmiştir.

#### 1.2.1. Biyolojik kontrol ajanı olarak *Serratia fonticola*

Bezelye köklerinden izole edilen *S. fonticola* türleri *Rhizoctonia* patojenine karşı hastalığı baskılama ve nutrient alımını arttırarak bitki sağlığına direkt etki gösterdiği, fosfat çözünmesi ve indol-3-asetik asit, amonyak, HCN ve siderofor üretimi sağladığı gözlenmiştir (Devi vd., 2013). 1-aminosiklopropan-1-karboksilat (ACC) deaminaz enzimine sahip *S. fonticola* türleri mercimek bitkisi üzerinde büyüme, yumrulanma ve verim açısından kayda değer artışlara sebep olmuştur. *S. fonticola* türünün farklı destekleyici bakteriler ile inokülasyonu, saksı denemelerinde ve arazi koşullarında tahıllar üzerinde azot konsantrasyonunu arttırdığı gözlenmiştir (Zahir vd., 2011). *S. fonticola* *in vitro* koşullarda marul ve şeker pancarı bitkileri üzerinde *Rhizoctania solani* patojenine karşı litik enzimler ve biyolojik olarak aktif maddeler ürettiği belirlenmiştir (Faltin vd., 2004). *S. fonticola* 'nın çilek bitkisinin çeşitli dokularında, gri küf hastalığı oluşumuna sebep olan *Botrytis cinerea* 'ya karşı antagonistik etkisi olduğu belirlenmiştir (İlhan ve Karabulut 2013). Atık depolama alanlarında izole edilen *S. fonticola* RB-25 izolatının bitki gelişimini arttırdığı ve genom içerisinde ilave ChiC geninin bulunduğu, ChiB geninin ise yer almadığı gözlenmiştir. *S. fonticola* RB-25 izolatının tellür elementine karşı homolog direnç genlerini içerdiği ve prodigiosin, bakteriyosin, çoklu direnç proteinleri ve kitinaz bulunmasından kaynaklı *in vitro*

koşullarda *Ralstonia solanacearum*, *Fusarium oxysporum* ve *Sclerotinia sclerotiorum* 'a karşı antagonist potansiyeli taşıdığı belirlenmiştir (Kshetri vd., 2019).



## 2. MATERYAL ve METOD

### 2.1. Materyal

#### 2.1.1. Bakteri kültürü

*Botrytis cinerea* enfeksiyonu gözlenmiş olan sera alanlarından alınan toprak örnekleri distile su ile karıştırılarak sıvı örnekler oluşturulmuştur. Sıvı karışımlar nutrient agar (NA) (Merck 105443 kat.no.) besi yerlerine ekim yapılarak geliştirilmiştir. Gelişim gösteren bakteri kolonileri tek koloni seçilimi sağlanarak saflaştırılmış, +4° ve -20°C sıcaklıklarda katı ve sıvı halde muhafaza edilmiştir.

#### 2.1.2. *B. cinerea* kültürü

T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı'na bağlı İzmir Bornova Zirai Mücadele Araştırma Enstitüsü'nden alınan ITS gen sekans analizleri ile daha önceden tür ve cins ayrımı yapılmış *Botrytis cinerea* örnekleri patates dekstrozu agar (PDA) (Merck 110130 kat.no.) besi yerine aktararak çoğaltımı ve gelişimi sağlanmıştır.

#### 2.1.3. Besi yerleri ve bileşenleri

Besi yerleri bileşenlerin hazırlama yönergesine göre düzenlenmiş ve 121°C'de 15 dakika süre ile otoklavlanmıştır. Hazırlanan besi yerlerinin içerik konsantrasyonları aşağıda verildiği gibidir (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1 Kullanılan besi yerlerinin içerikleri

| Besi Ortamının Adı                    | İçeriği                                                                        | Toplam Hacmi              |
|---------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|
| Nutrient Agar besi yeri (NA)          | 13 g/L agar agar<br>8.0 g/L nutrient<br>broth                                  | 1 Litre dH <sub>2</sub> O |
| Nutrient broth besi yeri (NB)         | 8.0 g/L nutrient<br>broth                                                      | 1 Litre dH <sub>2</sub> O |
| Patates dekstroz agar besiyeri (PDA)  | 4.0 g/L patates<br>ekstraktı<br>20 g/L dekstroz<br>15 g/L agar agar            | 1 Litre dH <sub>2</sub> O |
| Karboksimetil Selüloz besiyeri (CMCA) | 26 g CMC<br>0.5 g/L KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub><br>0.25g MgSO <sub>4</sub> | 1 Litre dH <sub>2</sub> O |

## 2.2. Metot

### 2.2.1. Spektrofotometrik analizler

Antifungal denemeler öncesinde seçilen bakteri örneği absorbans/hücre sayısı/mL (OD. /hücre/mL) grafiğinin oluşturulması için NB besi yerinde kültüre edilmiştir. Gelişen kültürlerden belirli aralıklarda örnekler alınmış, alınan örnekler küvet vasıtasıyla 600nm’de spektrofotometrik analiz gerçekleştirilmiştir. Analiz uygulanan örnekler belirli oranlarda seyreltilerek NA besi yerine ekim yapılmış ve 27°C’de 1 gün inkübasyona bırakılmıştır. Elde edilen spektrofotometrik ölçüm ve dilusyon yöntemiyle hücre/ml sayımları gerçekleştirilmiştir.

### 2.2.2. Antifungal denemeler

Saf kültürden alınan örnekler NA besi yerlerine nokta ekimi yapılmış ve 1 gün 27°C’de inkübasyona bırakılmıştır. Gelişim sonucu örneklerin petri kapları ters çevrilerek kapak kısımlarına 250 µL fenol damlatılmış ve kapatılarak 1 gün bekletilmiştir. PDA besi yerinde geliştirilen *B. cinerea* kültürleri distile su ile muamele edilerek elde edilen fungal misel-su karışımı, fenol uygulanmış besi yerlerine eklenerek 5 dakika muamele

edilmiş, ardından fazla sıvı uzaklaştırılmıştır. Örnekler tekrar 27°C’de inkübasyona bırakılmıştır.

### 2.2.3. Tek agar denemeleri

Antifungal denemeler sonucu seçilen bakteri örneği aşağıda verilen adımlar izlenerek tek agar denemeleri hazırlanmıştır.

1. NA besiyeri petri kaplarına hazırlanmıştır.
2. Petri merkezine *B. cinerea* kesitleri ekilmiştir.
3. *B. cinerea* kesitinden 2 ve 3 cm uzaklıktaki bölgelere OD. değeri 1.00 olan sıvı kültürlerden çizgi ekimi yapılmıştır.
4. Örnekler 16 saat aydınlık 27°C’de, 8 saat karanlık 20°C’de inkübasyona bırakılmıştır.
5. Örneklerin *B. cinerea* gelişim yarıçapları günlük ölçülmüştür.
6. Deneyler üçer denemede, üçer tekrarlı şekilde hazırlanmıştır.

### 2.2.4. Çift agar denemeleri

Antifungal denemeler sonucu seçilen bakteri örneği aşağıda verilen adımlar izlenerek çift agar denemeleri hazırlanmıştır (Baysal vd., 2013).

1. NA besi yeri petri kaplarına hazırlanmıştır.
2. Sıvı bakteri kültüründen 100 µL alınarak NA besi yerine yayma ekim gerçekleştirilmiştir.
3. Ekim yapılan NA besi yeri 8 saat inkübasyona bırakılmıştır.
4. İnkübasyon sonunda örnekler üzerine PDA besi yeri eklenmiştir.
5. PDA besi yeri üzerine *B. cinerea* kesitleri eklenerek 16 saat aydınlık 27°C’de, 8 saat karanlık 20°C’de inkübasyona bırakılmıştır.
6. Örneklerin *B. cinerea* gelişim yarıçapları günlük ölçülmüştür.
7. Deneyler beşer tekrarlı şekilde hazırlanmıştır.

#### 2.2.5. Kongo kırmızısı boyama ve endoglukanaz/selüloz aktivitesi testi

Bakteri örneğinin endoglukanaz ve selüloz etkinliğinin incelenmesi için CMC agar besiyeri hazırlanmıştır. Hazırlanan besiyeri yerine 50, 100 ve 150 µL bakteri kültürlerinin yayma ekimi yapılarak 27°C’de 2 gün inkübe edilmiştir. Enzim aktivitesi Kongo kırmızısı ile boyama metodu ile doğrulanmıştır.

Kongo kırmızı ile boyama işleminde aşağıdaki adımlar izlenmiştir.

1. CMC agar üzerinde inkübe edilen örneklerin üzerine %0,1’lik Kongo kırmızısı çözeltisi eklenerek 30 dakika beklenilmiştir.
2. Örnekler üzerindeki Kongo kırmızısı dökülerek uzaklaştırılmıştır.
3. Distile su ile durulama gerçekleştirilmiştir.
4. Örnekler üzerine 1 M sodyum klorid (NaCl) eklenerek 5 dakika beklenmiştir.
5. Örnekler içindeki sıvı dökülerek 4. adım tekrarlanmıştır.
6. Örneklerdeki sodyum klorid uzaklaştırıldıktan sonra %5’lik asetik asit eklenerek 5 dakika beklenmiştir.
7. Asetik asit uzaklaştırılarak örneklerde bölge oluşumları kayıt altına alınmıştır.

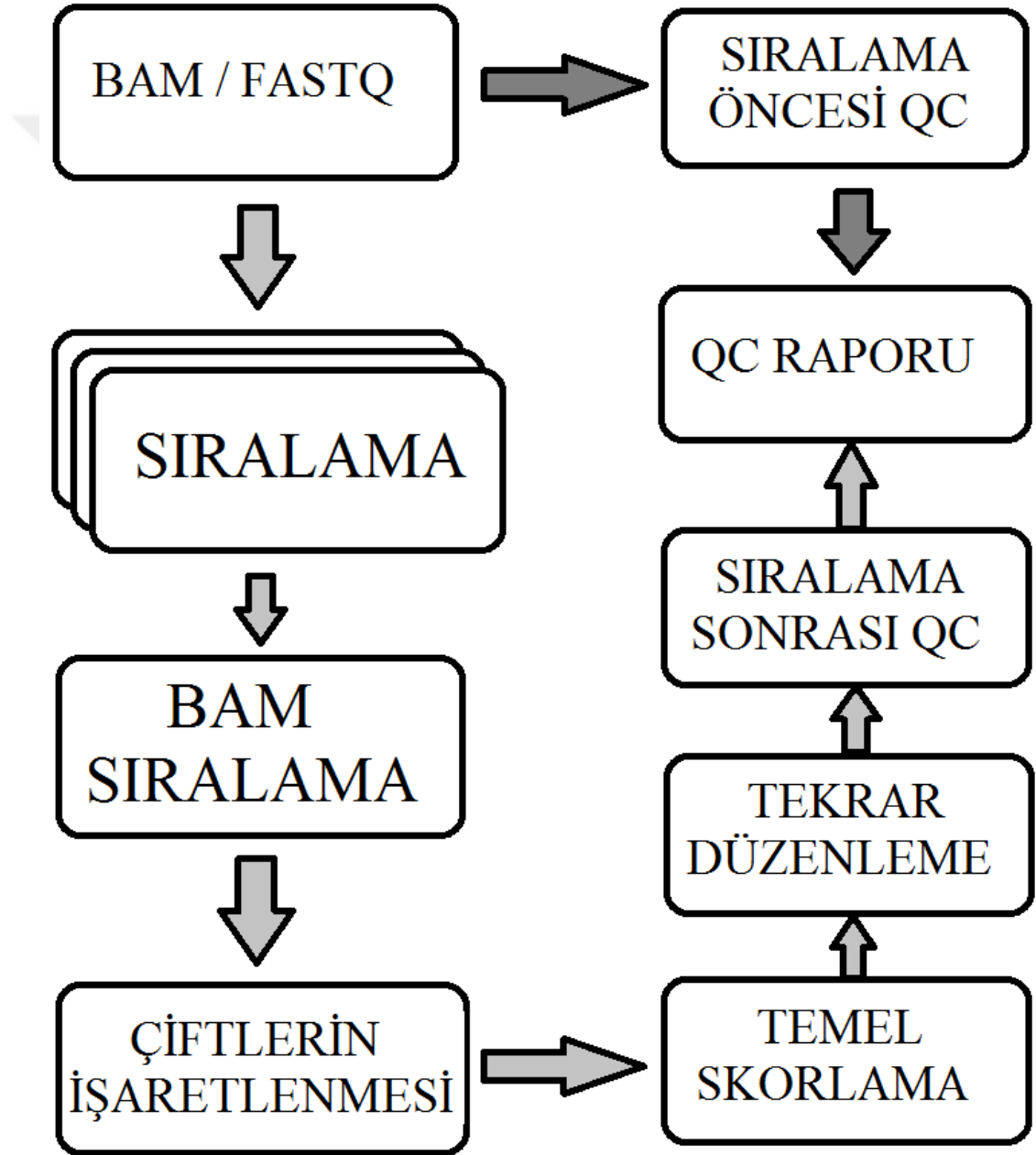
#### 2.2.6. BIOLOG ® GENIII MicroPlate Analizi

BIOLOG marka GENIII Microplate model cihazda, üreticinin talimatlarına göre protokol A yönergesinde hazırlanmıştır. Bakteri örnekleri NA besiyerinde 25°C’de 48 saat inkübe edilmiştir. Gelişen bakteri örneği 1 mL steril NaCl (0.85) içerisine aktarılmıştır. Hazırlanan karışım hücre yoğunluğu %95-98 olacak şekilde inokülasyon sıvısı A içerisine aktarılmıştır. Süspansiyonlar kuyulara 100 µL olacak şekilde GEN III mikropalakalara uygulanmıştır. Plakalar 25°C’de 96 saat OmniLog inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. Her plaka 30 dakikada bir okunmuştur.

#### 2.2.7. Bakteri örneğinin tür tayini ve gen profilinin analizi

NB besiyerinde 1 gün boyunca kültüre edilmiş bakteri örneği daha sonra santrifüj edilmiş ve pelet kısımlarından CTAB metodu (Nishiguchi vd. 2002) ile DNA saflaştırılması gerçekleştirilmiştir. Ekstrakte edilen genomik DNA’nın %1’lik agaroz

jelde saflığının kontrolü gerçekleştirilmiştir. Saflaştırılan DNA, 500 baz çifti uzunluğunda parçalar halinde küt üç birleşmelerine bağlı olarak kütüphane şeklinde hazırlanmıştır. Hazırlanan veriler Illumina Hi-Seq 2500 sekanslama sistemi tarafından sekanslanmıştır. Daha sonra ham sekans verisi hizmet alımı şeklinde edinilen veri aşağıda verilen biyoinformatik veri işleme iş-akış şemasıyla uyumlu bir biçimde “Galaxy genome sequence analysis pipeline” kullanılarak Prof. Dr. Ömür Baysal tarafından belirlenen ayıklanmış contig gen sekansları üzerinden manalandırılarak sınıflandırılmıştır (Şekil 2.1).



Şekil 2.1 Sekans verisinin biyoinformatik sekans veri işleme akış şemasıyla gösterimi  
(BAM/FASTQ: sekans verisi, QC: kalite raporu)

Sekans verileri, KEGG veritabanında incelenerek bakteri örneğine ait gen profilleri oluşturulmuştur. Sekans verilerinde 16S dizileri ile tür tayini gerçekleştirilmiştir, *Serratia fonticola* DSM 4576 referans genomu (NCBI acc. num. NZ\_CP011254) göre tüm genom haritalanmıştır.





### 3. BULGULAR VE TARTIŞMA

#### 3.1. Antifungal Etki Denemeleri Sonuçları

##### 3.1.1. Antifungal deneme sonuçları

İzole edilen bakteri örnekleri saflaştırılmasından sonra yeni kültürlerle aktarılmış ve 1 gün 27°C’de inkübasyona bırakılan örneklerin sonuçları değerlendirilmiştir. Denemeler sonucunda nokta ekim yapılan örneklerin gelişim yarıçapları farklı ölçülmüştür. Fenol uygulaması sonrasında besi kaplarına, *B. cinerea* kültüründen alınan misel-su süspansiyonu eklendiğinde ölü bakteri kolonilerinin su yüzeyine çıktığı gözlenmiştir. Fazla misel-su süspansiyonunun uzaklaştırılmasından sonra inkübe edilen örneklerde petri kabının ortasında ekimi yapılan ve gelişen bakteri kolonisinin çevresinde farklı uzaklıklarda fungal gelişim gözlenmiştir. Bakteri kolonilerinin fenol uygulamasıyla ölümü sonucunda bakteri örnekleri tarafından üretilen metabolitlerin farklı seviyelerde fungal gelişimi engelleme etkisine sahip olduğu gözlenmiştir. Yapılan denemeler sonucunda yüksek seviyede antifungal etkiye sahip bakteri örneği görsel değerlendirme ile seçilerek ileri adımlarda denenmek üzere belirlenmiştir.

##### 3.1.2. Tek agar denemeleri sonuçları

Antifungal etki denemeleri sonucu seçilen bakterinin farklı besi yerlerinde gelişimini ve anti fungal etki seviyesini gözlemlemek önemlidir. Denemelerde bakteri örneği belirli konsantrasyonda fungal ekim yapılan noktaya farklı uzaklıklarda ekimi yapılmıştır. Farklı mimari yerleşimde kurulan denemelerde farklı seviyelerde baskılama oranları elde edilmiştir. Farklı besi yerlerinde kurulan denemelerde bakteri ve fungal gelişiminin anlamlı farkı olmadığı ve birbirine yakın değerlerde sonuçların elde edildiği gözlenmiştir.

Tek agar denemelerinin NA besi yerinde petri merkezindeki *B. cinerea* ekimine 3 cm uzaklıkta kurulan çizgi ekim denemelerinde 3, 5 ve 7 günlük ölçümler yapılmış ve fungal gelişim yarıçapı (GR) ölçülerek inhibisyon yüzdesi(%Inh) hesaplanmıştır

(Çizelge 3.1). 7. Gün ölçümü sonucunda kontrol örneğindeki fungal gelişim petri çeperine ulaştığından ölçüm sonlandırılmıştır. Kurulan denemelerde 3 defa gerçekleştirilerek, her denemede örnekler 3 tekrarlı halde hazırlanarak elde edilen sonuçlar standart sapma hesaplanarak değerlendirilmiştir.

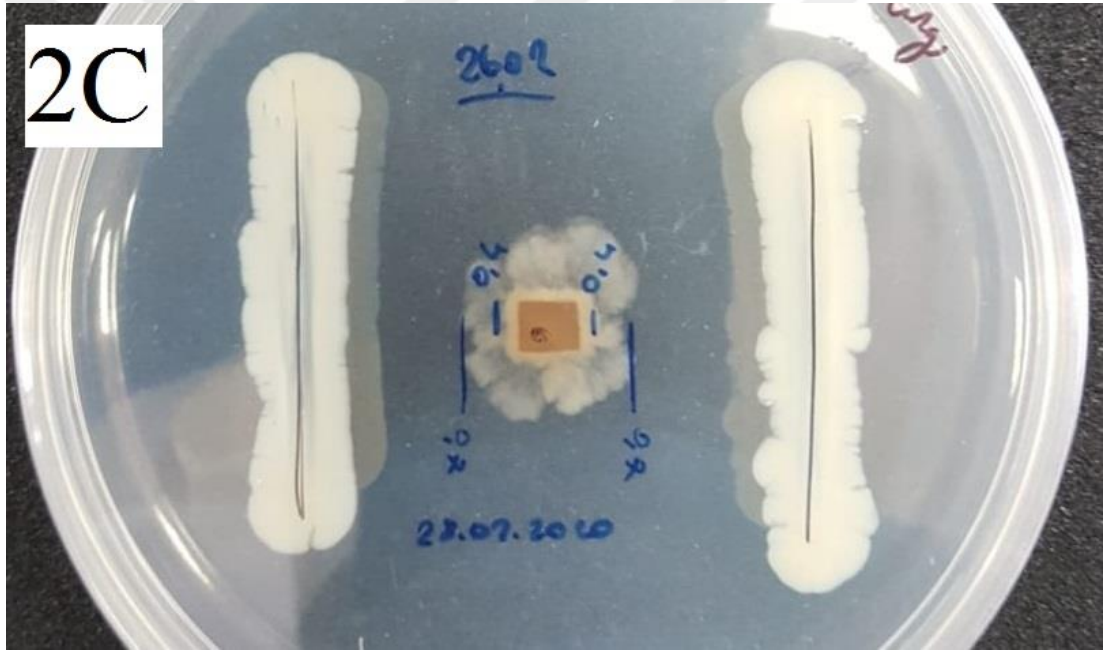
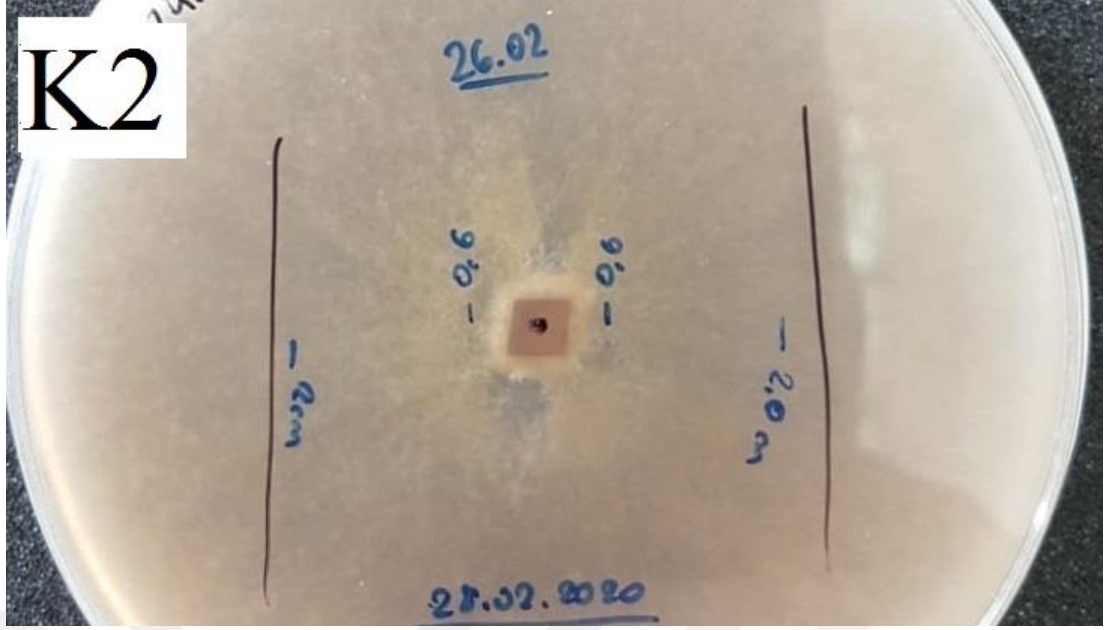
**Çizelge 3.1 NA besi yerinde yapılan tek agar denemelerinin 3 cm uzaklıkta kurulan örneklerinden elde edilen gelişim yarıçapı ve yüzde inhibisyon değerleri sonuçları (GR: Gelişim yarıçapı, %Inh: Baskılama yüzdesi)**

| Örnek | 3. GÜN          |      | 5. GÜN          |       | 7.GÜN           |      |
|-------|-----------------|------|-----------------|-------|-----------------|------|
|       | GR<br>(cm)(±SS) | %Inh | GR<br>(cm)(±SS) | %Inh  | GR<br>(cm)(±SS) | %Inh |
| K     | 1.4             | -    | 3               | -     | 4.4             | -    |
| N3C-1 | 0.63 (±0.02)    | %45  | 1.3 (±0.04)     | %56,7 | 1.3 (±0.03)     | %71  |
| N3C-2 | 0.56 (±0.03)    | %40  | 1.55 (±0.05)    | %48,3 | 1.75 (±0.06)    | %61  |
| N3C-3 | 0.57 (±0.03)    | %41  | 1.48 (±0.04)    | %51,7 | 1.69 (±0.05)    | %62  |

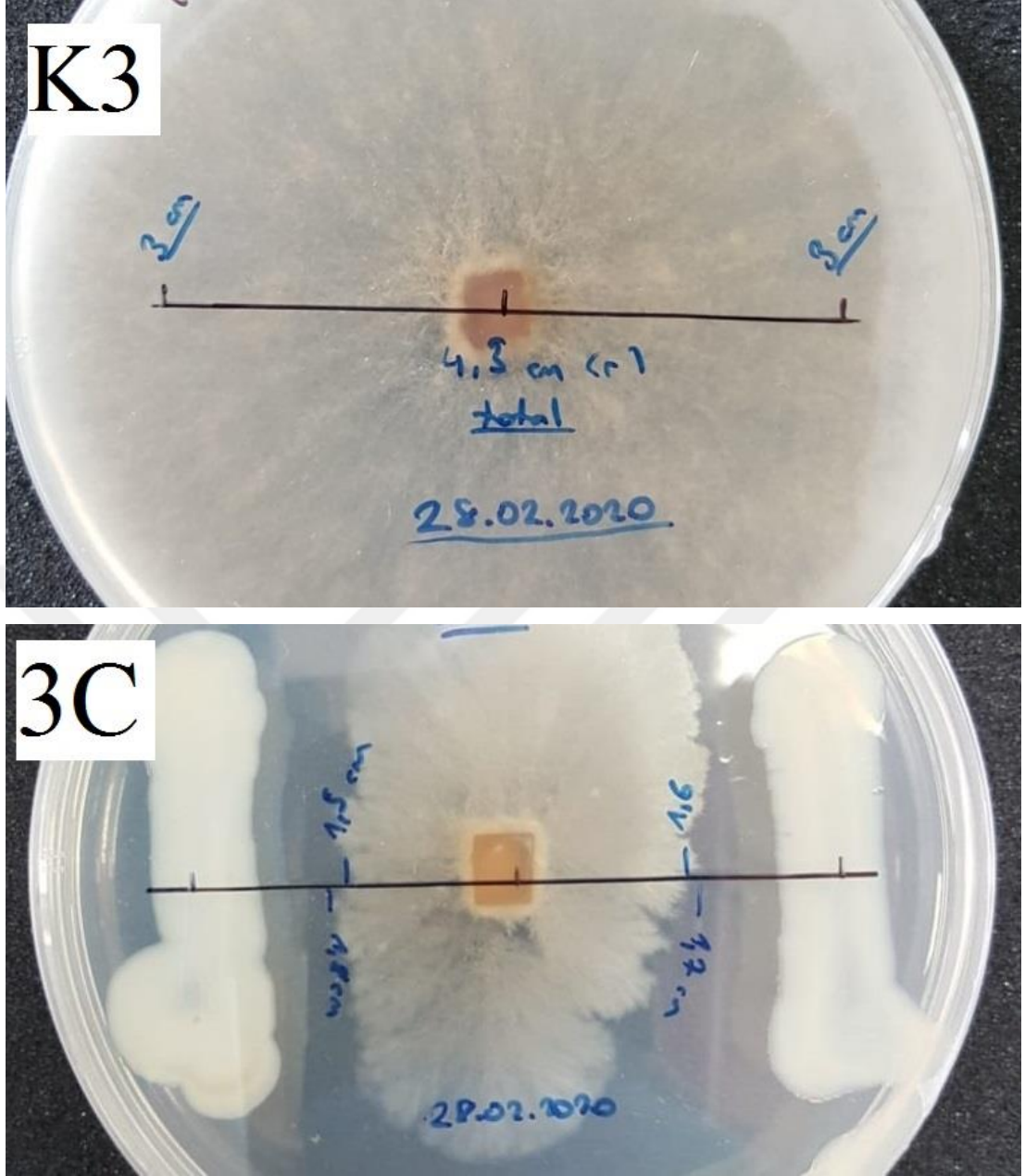
Tek agar denemelerinin NA besi yerinde petri merkezindeki *B. cinerea* ekimine 2 cm uzaklıkta kurulan çizgi ekim denemelerinde 3, 5 ve 7 günlük ölçümler yapılmış ve fungal gelişim yarıçapı ölçülerek inhibisyon yüzdesi hesaplanmıştır (Çizelge 3.2).

**Çizelge 3.2 NA besi yerinde yapılan tek agar denemelerinin 2 cm uzaklıkta kurulan örneklerinden elde edilen gelişim yarıçapı ve yüzde inhibisyon sonuçları (GR: Gelişim yarıçapı, %Inh: Baskılama yüzdesi)**

| Örnek | 3. GÜN          |      | 5. GÜN          |       | 7.GÜN           |       |
|-------|-----------------|------|-----------------|-------|-----------------|-------|
|       | GR<br>(cm)(±SS) | %Inh | GR<br>(cm)(±SS) | %Inh  | GR<br>(cm)(±SS) | %Inh  |
| K     | 1.2             | -    | 2               | -     | 4.4             | -     |
| N2C-1 | 0.6 (±0.03)     | %50  | 0.7 (±0.05)     | %65   | 0.7 (±0.064)    | %85,1 |
| N2C-2 | 0.3 (±0.02)     | %75  | 0.45 (±0.04)    | %77,5 | 0.85 (±0.05)    | %80,7 |
| N2C-3 | 0.5 (±0.03)     | %59  | 0.60 (±0.04)    | %70   | 0.75 (±0.05)    | %83   |



Şekil 3.1 Tek agar ekim yöntemi ile yapılan bakteri ekiminin merkezden 2 cm uzaklıkta kurulan denemeler. K2: kontrol, 2C: deneme örneği.



Şekil 3.2 Tek agar çizgi ekim yöntemi ile yapılan bakteri ekiminin merkezden 3 cm uzaklıkta kurulan denemeler. K3: kontrol, 3C: deneme örneği

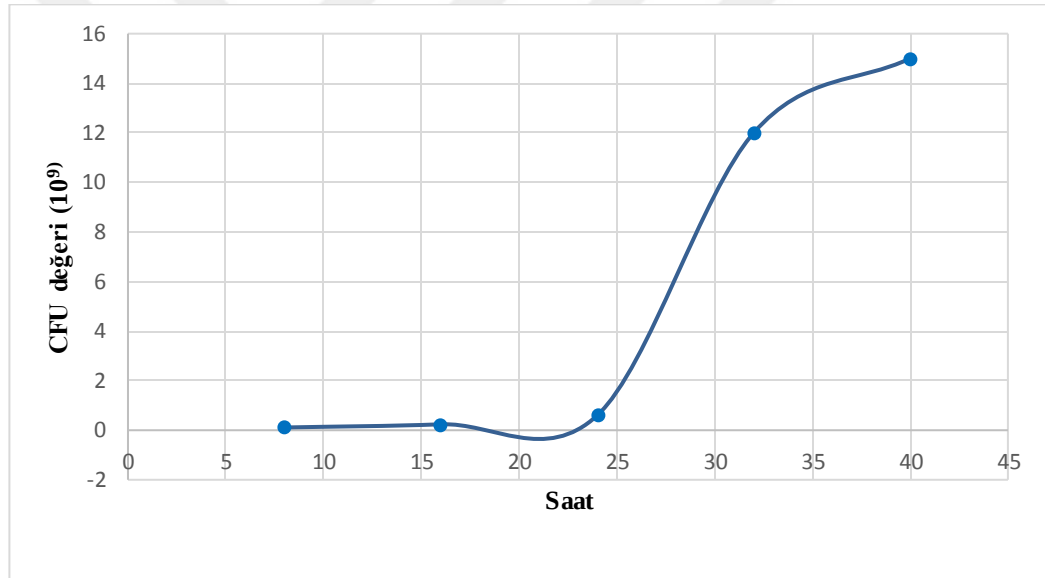
### 3.1.3. Spektrofotometrik analizler ve O.D./hücre/mL grafiğinin kurulması

İncelenen bakteri örneğinin fungal inhibisyon oranını belirlemek ve minimum inhibisyon konsantrasyon değerini (MK) belirlemek için ölçümler yapılmıştır. 8 Saat aralıklı yapılan ölçümlerde kültürden alınan örneklerin 600 nm'deki absorbans değeri ölçülmüş ve  $10^9$  oranında seyreltilerek NA besiyerine ekim yapılarak 1 gün 27°C'de inkübe edilmiştir. Elde edilen veriler aşağıda verilmiştir (Çizelge 3.3). Elde edilen

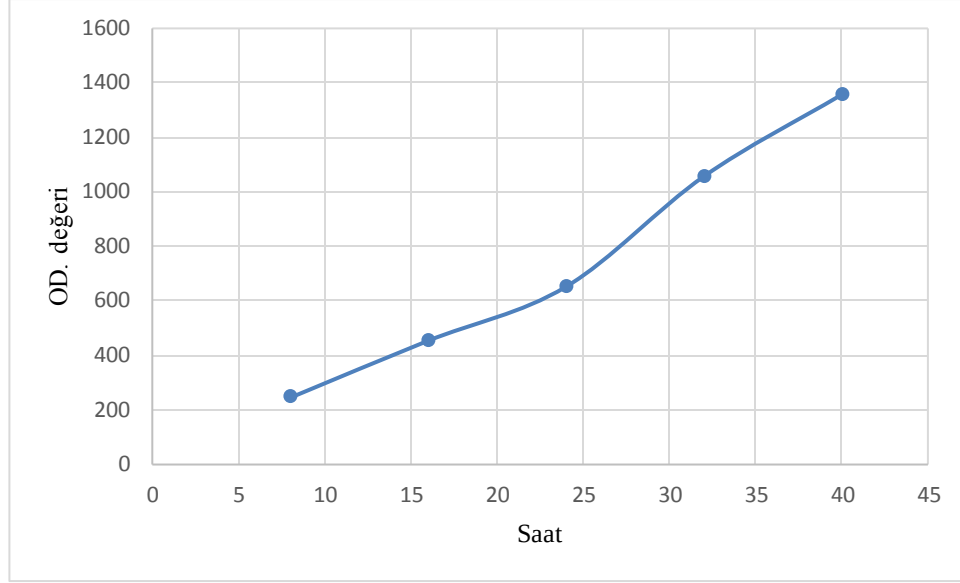
verilerle Hücre-Saat (Grafik 3.1) ve O.D.-Saat (Grafik 3.2) grafikleri oluşturulmuştur. Grafikte yer alan verilerin eğrileri oluşturulmuştur.

**Çizelge 3.3 Sıvı kültürde geliştirilen bakteri örneğinin 8 saat aralıklar ile yapılan spektrofotometrik ölçüm değerleri ve ölçüm anında yapılan ekim sonucu elde edilen hücre/mL sonuçları**

| Ölçüm zamanı (saat) | O.D. değeri (600nm) | CFU/mL            |
|---------------------|---------------------|-------------------|
| 8.                  | 0.24522             | $1.1 \times 10^8$ |
| 16.                 | 0.45408             | $2.4 \times 10^8$ |
| 24.                 | 0.65242             | $6.0 \times 10^8$ |
| 32.                 | 1.05742             | $1.2 \times 10^9$ |
| 40.                 | 1.35782             | $1.5 \times 10^9$ |



**Şekil 3.3 Ölçüm deneylerinde 8 saatlik periyotlar ile seyreltilerek ekim yapılan örneklerdeki koloni sayılarının değişimi**



**Şekil 3.4 8 Saatlik periyotlar ile gelişen örneğin spektrofotometrik ölçüm sonucu O.D. değerindeki değişimi**



**Şekil 3.5 O.D./hücre/mL değişimini belirlemek için koloni sayımı yapılan petriler**

#### 3.1.4. Çift agar denemeleri

Çift agar metodunun kurulum aşamasının optimizasyonunda besiyerlerinin eklendiği sıcaklık ve bakteri kültürü ekimi sonrası inkübasyon aralığı önem arz etmektedir. İlk aşamada hazırlanan NA besi yerine yapılan bakteri ekiminde yeni ortama yerleşme ve alışma süreci bakteri gelişimi açısından önemlidir. Yapılan denemelerde ikincil besiyeri eklenmesinden önce inkübasyon süresinin minimum 6 saat tutulması gerektiği belirlenmiş, ileri sürelerde anlamlı farklılıklar oluşmadığı gözlenmiştir. Deney çalışmalarının 8 saatlik ilk inkübasyon adımı şeklinde kurulumu kararlaştırılmıştır. İkincil besiyeri eklenmesi anında otoklavlanan ikincil besiyeri hazırlık zamanına bağlı olarak yüksek sıcaklıklarda olabilir. İkincil besiyerinin katılma sıcaklığından önce uygun sıcaklığa gelmesi beklenmelidir. Besiyeri aktarımından petri kabının ortasından eklenmeye başlanması besiyeri kalınlığının eşit dağılması noktasında önemlidir. Besiyerinin eklendikten sonra uygun katılma gösterdiği zaman fungal kesitin petri kabının ortasına yerleştirilerek aydınlık ve karanlık periyotlarda inkübasyona bırakılmıştır.

Çift agar metodu ile yapılan denemelerde bakteri örneğinin fungal gelişimi inhibe ettiği gözlenmiştir. İnhibisyon gösterdiğinin teyit edilmesinden sonra MIC değerinin hesaplanması adına farklı konsantrasyonlarda bakteri ekimi yapılarak inhibisyon seviyelerine bakılmıştır (Çizelge 3.4). 12 Farklı O.D. değerine sahip bakteri örneğinden çift agar çalışması yapılmış ve 3., 7. ve 10. günlerde ölçüm gerçekleştirilmiştir. *B. cinerea* kesitinin gelişim yarıçapı ölçülerek inhibisyon yüzdesi hesaplanmıştır.

Çizelge 3.4 Çift agar çalışmalarında elde edilen gelişim yarıçapları ve inhibisyon yüzdelерinin değerleri

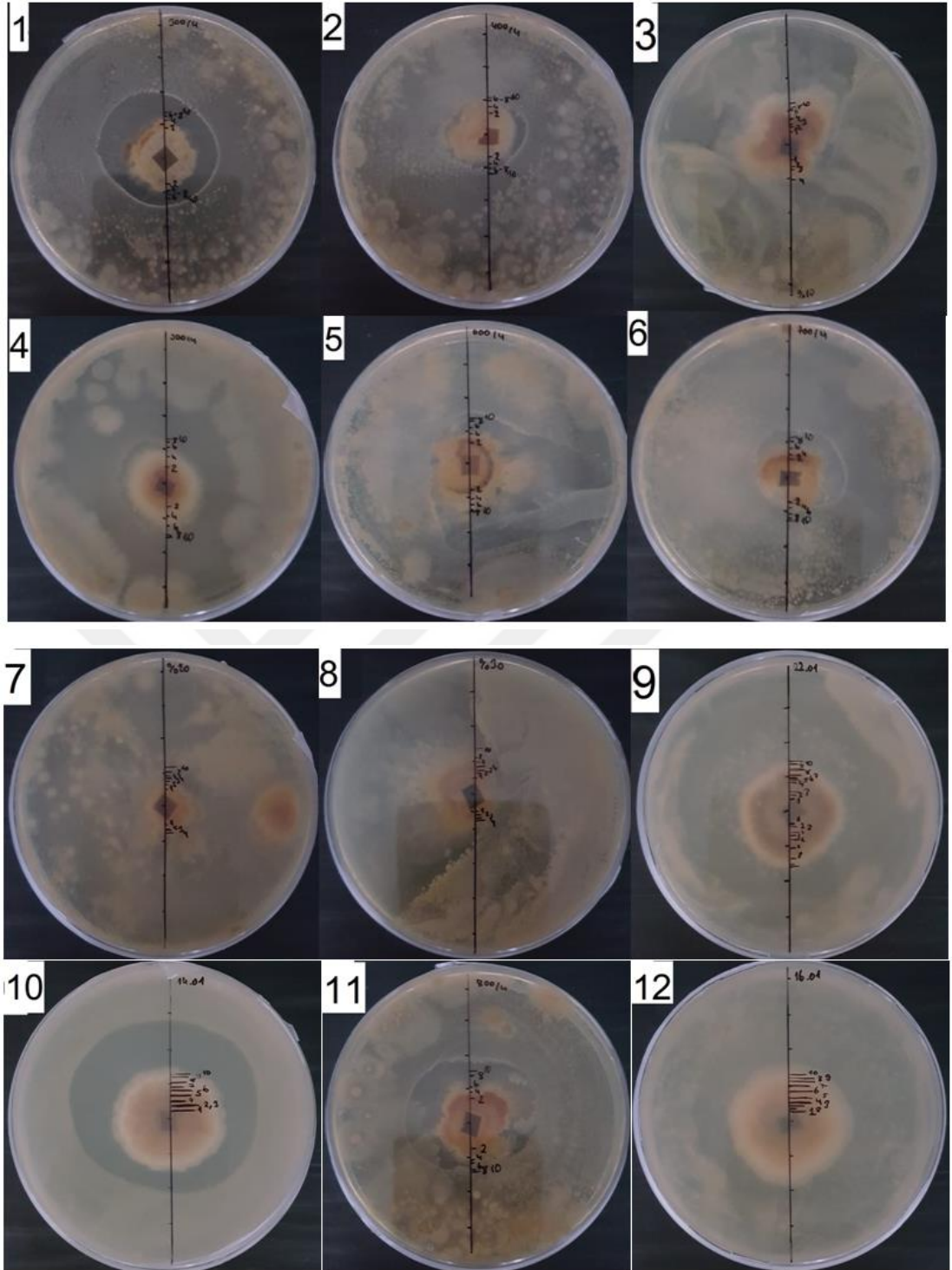
| Örnekler | OD. değeri | Gün | GR.<br>(cm)(±SS) | %Inh |
|----------|------------|-----|------------------|------|
| Kontrol  | -          | 3   | 1.8              | -    |
| 1        | 0.041      | 3   | 0.9 (±0.028)     | 50%  |
| 2        | 0.050      | 3   | 0.7 (±0.016)     | 62%  |
| 3        | 0.061      | 3   | 0.7 (±0.025)     | 62%  |
| 4        | 0.072      | 3   | 0.6 (±0.017)     | 67%  |
| 5        | 0.081      | 3   | 0.8 (±0.021)     | 56%  |
| 6        | 0.093      | 3   | 0.6 (±0.017)     | 67%  |
| 7        | 0.118      | 3   | 0.7 (±0.015)     | 62%  |
| 8        | 0.410      | 3   | 0.7 (±0.012)     | 62%  |

**Çizelge 3.4. Çift agar çalışmalarında elde edilen gelişim yarıçapları ve inhibisyon yüzdelerinin değerleri (devamı)**

|         |       |    |                     |     |
|---------|-------|----|---------------------|-----|
| 9       | 0.685 | 3  | 0.5 ( $\pm 0.014$ ) | 73% |
| 10      | 0.758 | 3  | 0.4 ( $\pm 0.009$ ) | 78% |
| 11      | 1.108 | 3  | 0.5 ( $\pm 0.012$ ) | 73% |
| 12      | 1.292 | 3  | 0.4 ( $\pm 0.012$ ) | 78% |
| Kontrol | -     | 7  | 3                   | -   |
| 1       | 0.041 | 7  | 1.3 ( $\pm 0.04$ )  | 57% |
| 2       | 0.050 | 7  | 1.1 ( $\pm 0.06$ )  | 63% |
| 3       | 0.061 | 7  | 1.3 ( $\pm 0.045$ ) | 57% |
| 4       | 0.072 | 7  | 1.3 ( $\pm 0.049$ ) | 57% |
| 5       | 0.081 | 7  | 1.4 ( $\pm 0.05$ )  | 53% |
| 6       | 0.093 | 7  | 1.2 ( $\pm 0.049$ ) | 60% |
| 7       | 0.118 | 7  | 1.2 ( $\pm 0.032$ ) | 60% |
| 8       | 0.410 | 7  | 1.3 ( $\pm 0.047$ ) | 57% |
| 9       | 0.685 | 7  | 1.4 (0.04)          | 53% |
| 10      | 0.758 | 7  | 1.3 ( $\pm 0.052$ ) | 57% |
| 11      | 1.108 | 7  | 1.4 ( $\pm 0.07$ )  | 53% |
| 12      | 1.292 | 7  | 1.4 ( $\pm 0.053$ ) | 53% |
| Kontrol | -     | 10 | 4.3                 | -   |
| 1       | 0.041 | 10 | 1.4 ( $\pm 0.02$ )  | 68% |
| 2       | 0.050 | 10 | 1.2 ( $\pm 0.04$ )  | 72% |
| 3       | 0.061 | 10 | 1.4 ( $\pm 0.039$ ) | 68% |
| 4       | 0.072 | 10 | 1.4 ( $\pm 0.042$ ) | 67% |
| 5       | 0.081 | 10 | 1.4 ( $\pm 0.046$ ) | 67% |
| 6       | 0.093 | 10 | 1.3 ( $\pm 0.047$ ) | 70% |
| 7       | 0.118 | 10 | 1.3 ( $\pm 0.030$ ) | 70% |
| 8       | 0.410 | 10 | 1.3 ( $\pm 0.034$ ) | 70% |
| 9       | 0.685 | 10 | 1.4 (0.031)         | 68% |
| 10      | 0.758 | 10 | 1.3 ( $\pm 0.042$ ) | 70% |
| 11      | 1.108 | 10 | 1.4 ( $\pm 0.052$ ) | 68% |
| 12      | 1.292 | 10 | 1.3 ( $\pm 0.040$ ) | 70% |

Çift agar denemelerinde kontrol örneğinin 10. gün sonunda petri çeperine ulaştığı gözlenmiştir. Örneklerin bir kısmında 7. gün yapılan ölçümden sonra *B. cinerea* kesitinin gelişim göstermediği belirlenmiştir. Besi yerlerinde 10. gün sonrasında *B. cinerea* gelişiminin devam etmediği gözlenmiştir. Ölçülen gelişim yarıçapları ve hesaplanan inhibisyon yüzdelerinin güvenilirliği açısından istatistiki analiz yapılmış ve ki-kare tablosunda %5 güvenilirlik düzeyinde belirlenmiş, elde edilen sonuçların anlamlı ifade olduğu belirlenmiştir.





Şekil 3.6 Çift agar denemelerinde yapılan örnekler. Sırasıyla 1 numaralı örnekten 12 numaralı örneğe kadar

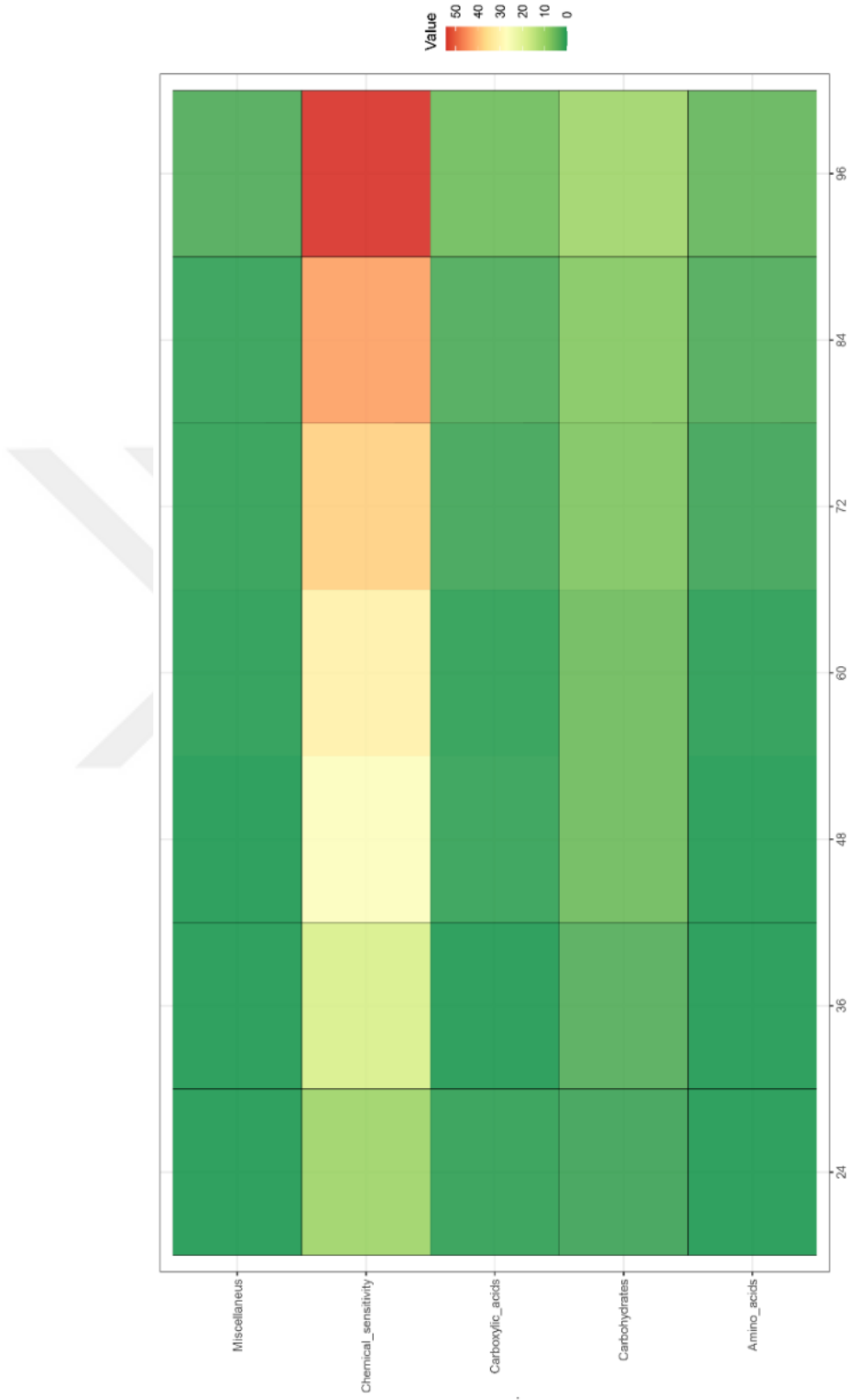
### 3.2. BIOLOG ® GENIII MicroPlate Analizi Sonuçları

Mikroplaka deneylerinde bakteri örneğinin 46 farklı içerikte kültürde gelişimini analiz edilmiştir. Analiz yapılan kültür içerikleri Çizelge 3.5'te verilmiştir.

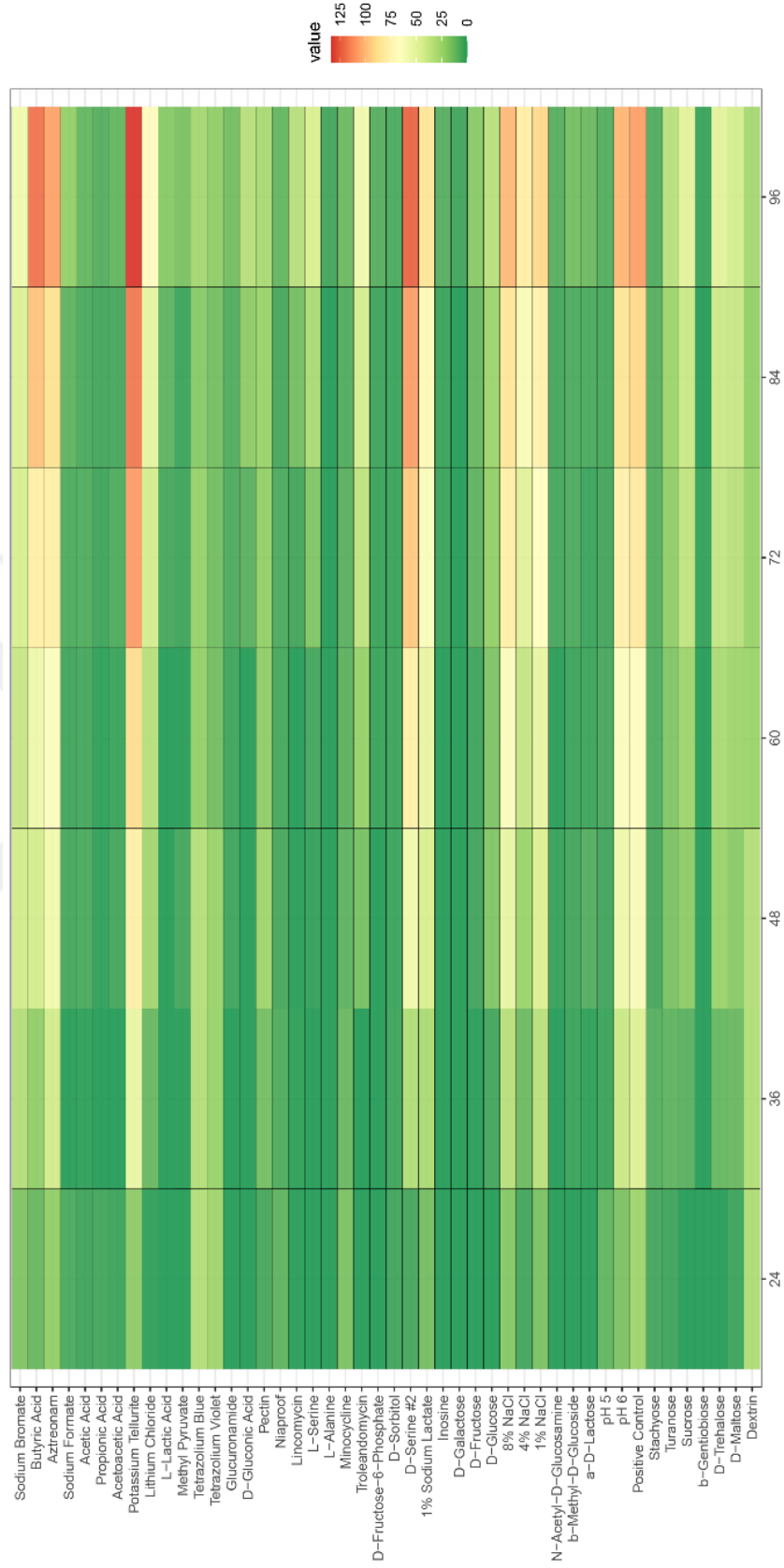
Çizelge 3.5 Mikroplaka analizinde kullanılan ortam içerikleri

|                           |                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|---------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Pozitif Kontrol           | -                                                                                                                                                                                                                                                                |
| amino asitler             | L-serin<br>L-alanin                                                                                                                                                                                                                                              |
| karbonhidratlar           | b-gentobioz<br>D-galaktoz<br>a-D-lactoz<br>b-methyl-D-glukozid<br>dekstrin<br>D-fruktoz-6-fosfat<br>a-D-glukoz<br>D-maltoz<br>D-sorbitol<br>D-trehaloz<br>N-asetil-D-glukozamin<br>Pektin<br>stachyose<br>sükroz<br>D-turanos                                    |
| karboksilik asitler       | asetoasetik asit<br>D-glukonik asit<br>glucoronamid<br>L-laktik asit<br>Metil pirüvat<br>Sodyum format<br>Asetik asit<br>Propiyonik asit                                                                                                                         |
| nükleosid                 | inosin                                                                                                                                                                                                                                                           |
| kimyasal hassasiyet grubu | 1% NaCl<br>1% sodium laktat<br>4% NaCl<br>8% NaCl<br>aztreonam<br>D-serin<br>linkomisin<br>Lityum klorid<br>minosiklin<br>niaproof<br>pH 5<br>pH 6<br>Potasyum tellürit<br>Sodyum bromat<br>Sodyum bütirat<br>tetrazolim violet<br>troleadomycin<br>Bütirik asit |

OmniLog platformu ile substratların zaman içindeki bozunma kinetiğini analiz edilmiştir. Substrat bozunmaları 24 saat sonrasında 12 saatlik periyotlarla ölçümü yapılmıştır. 24 Saat sonucunda yapılan ilk ölçümde 23 substratın ortalama yüzde 24.211 bozunma gözlenmiştir. 36 Saatte yapılan ölçümde 28 substratın ortalama yüzde 29.474, 48 saat sonunda 31 substratın ortalama yüzde 32.632, 60 saat sonunda 34 substratın ortalama yüzde 35.79, 72 saat sonunda 37 substratın ortalama yüzde 38.947, 84 saat sonunda 39 substratın 41.053, 96 saat sonunda 46 substratın ortalama yüzde 48.421 bozunma gösterdiği ölçülmüştür. En hızlı bozulmanın ölçümü 12 saatlik inkübasyondan önce dekstrin, stachyose, pH 5, pH6, %1 NaCl, %8 NaCl, %1 sodyum laktat, D-serine, minosiklin, niaproof 44, tetrazolyum violet/blue ve sodyum bromat substratı içeren kültürlerden elde edilmiştir. En yüksek yüzde bozulmanın ölçümü pH6, %1 NaCl, %8 NaCl, D-serine, potasyum tellür, aztreonam ve sodyum bütirat substratlarından elde edilmiştir. En düşük seviyede bozunma b-gentobioz, D-galaktoz, inosin, D-sorbitol, D-fructose-6-phosphate, L-alanin, propiyonik asit ve asetik asit substratlarında ölçülmüştür. 96 Saat sonunda en yüksek bozunma %54.246 ile kimyasal hassasiyet grubundan, en düşük bozunma %2.889 ile çeşitli-grubunda gözlenmiştir.



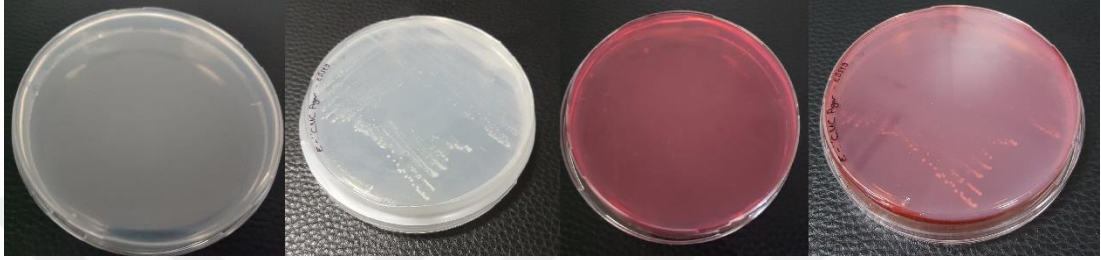
Şekil 3.7 Ana gruptaki içerikleri 12 saatlik periyotlar (24-96 saat) ile ölçüm yapılan bozunma analizleri



Şekil 3.8 Mikroplaka uygulamasında hazırlanan 46 çeşit ortam içeriğinin 12 saatlik periyotlardaki bozunma değişiminin analizi

### 3.3. Endoglukanaz ve Selülaz Aktivitesi Analizleri

Aktivite gösterdiği bilinen bakteri izolatu, ekim yapılmayan negatif kontrol ve deney grubu olmak üzere deney planı kurulmuştur. Yapılan ekim, inkübasyon ve analiz sonucunda negatif kontrol ve deney grubunda aktivitenin görsel konformasyonu sağlanmamıştır. Pozitif kontrol grubu olan örneklerde selülaz aktivitesini doğrulayan görsel sonuçlar elde edilmiştir.



Şekil 3.9 Kongo kırmızı ile boyama deneyinde elde edilen petri sonuçları. Örneklerde boyama öncesi koloni gelişimi gözlenmiş, boyama sonucunda koloni bölgelerinde değişim gözlenmemiştir. Soldan sağa; kontrol, uygulama, kontrol boyanmış, uygulama boyanmış

### 3.4. Tür Tayini ve Gen Profillerinin Analizi

Yapılan işlemler sonucu oluşturulan sekans verisi veritabanı üzerinde karşılaştırıldığında çalışılan bakteri örneğinin *Serratia fonticola* türü ile uyduğu gözlenmiştir. En yüksek benzerliği *Serratia fonticola* DSM 4576 suşu ile %93,21 oranında göstermektedir. 16S dizilerinin analizi ile *Serratia fonticola* DSM 4576 suşuna yakınlığı teyit edilmiştir.

KEGG veritabanı üzerinden sekans verisinin potansiyel gen bölgelerinin ve bu dizilerin etkin olduğu yolların analizi gerçekleştirilmiştir. Yapılan analizlerde incelenen örneğin kitinaz ve proteaz gibi antifungal etkiye sebep olabilecek genlerin var olabileceği belirlenmiştir.

Sekans verisinde proteaz aktivitesi gösteren 21 gen, kitin degradasyonunda sorumlu 2 gen, karakterize edilmemiş olan 1 gen ve glukanaaz ve selülaz aktivitesine sahip birer gen belirlenmiştir (Çizelge 3.6).

**Çizelge 3.6 Sekanslama sonucu elde edilen verilerin BLAST sonucu elde edilen proteaz, kitinaz, selülaaz ve glukanaaz aktivitesi gösteren gen listesi**

| Gen Fonksiyonu                | Gen İfadesi                                         |
|-------------------------------|-----------------------------------------------------|
| proteaz                       | ATP- bağlı proteaz                                  |
| proteaz                       | ATP-bağlı Clp proteaza daptör protein ClpS          |
| proteaz                       | ATP- bağlı Clp proteaz ATP-bağlayıcı alt ünite ClpA |
| proteaz                       | ATP- bağlı Clp proteaz ATP-bağlayıcı alt ünite ClpX |
| proteaz                       | ATP- bağlı Clp proteaz proteolitik alt ünite        |
| proteaz                       | ATP- bağlı proteaz alt ünite HslV                   |
| proteaz                       | ATP- bağlı çinkometaloproteaz FtsH                  |
| proteaz                       | Karboksi terminal-işlemepeptidaz                    |
| proteaz                       | CAAX amino terminal proteaz self-bağışıklık         |
| proteaz                       | Protein HflK                                        |
| proteaz                       | HyaD/HybD ailesi hidrogenaz olgunlaşma endopeptidaz |
| proteaz                       | peptidaz PmbA                                       |
| proteaz                       | proteaz TldD                                        |
| proteaz                       | proteaz HtpX                                        |
| proteaz                       | Protein HflC                                        |
| proteaz                       | Putative sinyaleptidpeptidaz SppA, 36K type         |
| proteaz                       | Rhomboid proteaz GlpG                               |
| proteaz                       | Çinko metalloproteaz                                |
| proteaz                       | Periplazmik serin endoproteaz DegP-benzer           |
| proteaz                       | Periplazmik serin endoproteaz DegP-benzer           |
| proteaz                       | V8-benzer Glu-sfesifik endopeptidaz                 |
| kitinaz                       | Katinaz                                             |
| kitinaz                       | Kitin bağlayıcı protein                             |
| selülaaz                      | Selülaaz                                            |
| glukanaaz                     | Glukanaaz                                           |
| karakterize edilmemiş protein | Karakterize edilmemiş protein                       |

Sekans verisinin incelenmesi sonucu bakır, arsenik, kadmiyum gibi ağır metallere karşı direnç bölgelerinin bulunduğu ve çoklu ilaç direnci ile ilişkilendirilmiş sekansların varlığı gözlenmiştir. Faj etkileşimine karşı direnç bölgeleri belirlenmiştir.

Sekans verileri KEGG veri tabanında üzerinde çalışılarak bakteri örneğine ait gen profilleri oluşturulmuştur. Sekans verilerinde 16S ve 23S rRNA dizileri ile tür tayini gerçekleştirilmiştir.

### 3.5. TARTIŞMA

*B. cinerea* ve buna bağlı olarak gelişen gri küf hastalığı gibi fungal patojen kaynaklı hastalıklar geçmişten günümüze pek çok tarımsal öneme sahip bitkide hastalığa sebep olmuştur. Günümüzde fungal kökenli pek çok patojenden kaynaklanan hastalıklara karşı belirli mücadele stratejileri oluşturulmuştur. Hastalıklara karşı etkili ve ucuz uygulamaya sahip kimyasal ajanların kullanımı günümüzde hastalık etmenlerinde gelişen direnç dolayısıyla etkisini kaybetmiştir. Ayrıca bu ajanların insan sağlığı ve

çevre üzerindeki negatif etkilerinin belirlenmesiyle hastalıklara karşı yeni mücadele metodlarının geliştirilmesi ihtiyacı doğmuştur. Bu mücadele yöntemleri yeni faydalı mikroorganizmaların araştırılması ve bitki patojenlerine karşı kontrol yöntemlerinde kullanımını içermektedir. Özellikle bakteriler, bitkilerin gelişim metabolizmalarını destekleme yönünden ön plana çıkan kontrol grupları arasında yer almaktadır. *Serratia* spp. türleri konukçu bitki ile oluşturduğu pozitif etkileşim ve sahip olduğu biyokontrol potansiyeli ile ön plana çıkan türler arasında yer almaktadır.

*B. cinerea* hastalık etmeni olduğu 500'den fazla türden dolayı en çok araştırma gerçekleştirilen fungal patojenler arasında yer almaktadır. Açık tarım alanları, seralar, botanik bahçeleri gibi geniş ve farklı alanlarda hastalık oluşturmaktadır (Williamson vd., 2007, Dean vd., 2012). Farklı ortam koşullarında, tarım ürünleri üzerinde hastalık oluşturabilmektedir. Fungal gelişimi ve sporulasyonu hasat öncesi ve sonrası farklı şekillerde gelişmektedir. Uygun koşullar altında çoğalma ve gelişimi hızlı olan konidium formunda, zorlu şartlarda hayatta kalmaya yönelik olarak sclerotia formunda hayat döngüsüne devam eder. Konidium formu çoğalma ve gelişmeye hazır, aseksüel mantar sporu halidir. Gelişimi açısından uygun koşullarda altında bu formda gelişme göstererek konukçu üzerinde hastalık oluşumu göstermektedir. Konukçu üzerinde bu iki form arasında değişim göstererek hayat döngüsüne devam edebilir (Şekil 3.10).

Sun ve arkadaşlarının (2019) yaptığı çalışmada ginseng bitkisinde meydana gelen *B. cinerea* enfeksiyonunun antagonistik etkiye sahip bakteri ile kontrolü çalışılmıştır. İzole edilen bakteri örnekleri üzerinde antibiyotik aktivite denemeleri ve antifungal etki ölçümü için sera koşullarında saksı denemeleri yapılmıştır. Denemelerde en yüksek baskılama gösteren bakteri örneğinin hastalık lezyonlarının baskılanmasında fungusit uygulamasından yüksek seviyede etki gösterdiği ve ginseng bitki dokularında bitki gelişimini arttırdığı gözlenmiştir. Elde edilen veriler ışığında belirlenen bakteri izolatının ginseng bitkisi üzerindeki gri küf hastalığının potansiyel biyokontrol ajanı olarak sunulmuştur (Zhuo vd., 2019).

Deng ve arkadaşları (2020) yaptığı çalışmada üzüm üzerinde *Penicillium digitatum* tarafından oluşan yeşil küf hastalığına karşı biyokontrol ajanı denemeleri gerçekleştirmiştir. Seçilen bakterinin *in vitro* şartlarda misel gelişimini inhibe etti ve enfeksiyon bulunan dokulara uygulaması sonucu patojen varlığının uzaklaştırıldığı gözlenmiştir. Uygulama yapılan konukçularda bitki gelişimini artırıcı ve hastalık



direncini geliştirici etmenlerin kontrol gruplarına göre daha fazla olduğu gözlenmiştir. Elde edilen veriler ile seçilen mikroorganizmanın *Penicillium digitatum* kaynaklı yeşil küf hastalığına karşı engellemeye ve tedaviye yönelik olarak kullanım potansiyeli olduğu belirtilmiştir (Deng vd., 2020).

Çalışma başlangıcında izole edilecek toprak örneklerinin seçilimi mikroorganizma çeşitliliği açısından önemlidir. Hastalık etmeninin gözlemlendiği aktif tarım alanlarından alınacak örneklerde hasta bireylere yakın örneklerin yanı sıra sağlıklı bireylerin bulunduğu alanlarda örnekler alınması sağlıklı bireylerin etkileşimde olduğu potansiyel biyokontrol ajanlarının varlığına işaret olabilir. Toprak örneklerinin kültüre alınması sürecinde dışarıdan kaynak alınması araştırmanın sağlığı açısından tehlikelidir. Çalışmada izole edilen mikroorganizma örneklerinin saflaştırılması ve çalışma süresince saf halde saklanması önemlidir. Elde edilecek verilerin güvenilirliği açısından çalışılan patojen ve mikroorganizma örneklerinin saf kültürlerde saklanması gereklidir. Yapılan denemelerde saf kültürlerin kullanılması elde edilen verilerin güvenilirliğini artırmıştır.

Antifungal denemelerde elde edilen veriler eldeki örneklerin çalışılan patojenin gelişimini baskılama potansiyelini belirten sonuçlar ortaya koymuştur (Çizelge 3.4, Şekil 3.7). Uygulama sonucunda bakteri gelişimi gözlenen noktaların çevresinde fungal gelişimi engelleyen etmenlerin varlığı düşünülmüştür. Ekim yapılan kültürlerde bakteri gelişimi sonrası bakterilerin ürettiği metabolitlerin fungal gelişim üzerinde etkisi olduğu ve fungal gelişimin engellendiği alanda yarı çap uzunluğu en yüksek olan örneklerin fungal gelişimi baskılamada potansiyel olabileceği düşünülmektedir. Örneklerin saf kültürlerden çalışılması biyokontrol potansiyelinin belirlenmesi açısından önemlidir.

İlk denemelerde mikroorganizmaların büyüme miktarı göz önüne alınmadığından engelleme yüzdelerinin hesaplanması doğru sonuçlar oluşturmaz. Ancak örneklerin kültüre alınma süreçleri ve gelişim performansları aynı tutularak planlanan denemelerde elde edilecek sonuçlarda örneklerin fungal gelişimi engellediği alanların yarıçapı baskılama potansiyelinin kuvvetini belirlemede varsayımsal yaklaşımlar oluşturabilir. Bakterilerin fenol uygulaması ile öldürülmesi fungus kültüründen alınan misel karışımının ortamda gelişmesi açısından gerekli olduğu düşünülmektedir. Fenol

uygulamasý yapýlmadan yapýlacak denemelerde bakteri geliřimini devam etmesi fungal misel geliřiminin gözlemlenebilir seviyeye ulařmasına engel oluřturabilmektedir.

Yapýlan çalışmalarda ilk denemelerde incelenen mikroorganizmaların antifungal aktivite denemeleri, mikroorganizma gelişimi sonrası kùltùrlerden yapýlan hücre ekstratlarının diskler ile petri kaplarına eklenmesi ve fungal kùltùrlerin kesit halinde petri içerisindeki gelişimlerinin izlenmesi ile gerçekleştirilmektedir (Petatán-Sagahón vd., 2011;). Kurniawan ve arkadaşlarının (2018) yaptığı çalışmada misel gelişimindeki baskının belirlenmesi için 2 gùnlük bakteriyel kùltùrlerin petri úzerinde belirli noktalara aktarımı gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızda yaptığımız fenol uygulaması ile bakteriyel hücre ekstratını eldesine gerek kalmadan antifungal etkinin belirlenmesine yùnelik sonuç eldesi mùmkùn olmuştur.

Tek agar denemelerinde patojen ve biyokontrol ajanının ortama aynı anda ekimi yapılarak gùsterdięi etkileşim değerlendirilmiştir. Bakterileri gelişiminin fungal gelişimi engelleyici etkisi gözlenmiştir (şekil 3.2, şekil 3.3). Yapýlan ölçùmlerde kontrol òrneklerine göre 7 gùn sonunda yüzde 60-80 aralığında baskılama gözlenmiştir. 3. ve 5. gùnlerde yapýlan ölçùmlerde baskılama oranı 7. gùne oranla dùřük olduğu gözlenmiştir (izelge 3.1, izelge 3.2). Kontrol òrneęinin 7. gùn sonunda petri çeperine ulaşması ile uygulama yapýlan òrneklerde fungal gelişimin duraksama baskılama yüzdesinin yükselmesine neden olmaktadır. Deęerlendirmenin genişlemesi açısından farklı besiyerlerindeki uygulamalar elde edilen verilerin gùvenilirlięini pekiştirmeye yùnelik olarak katkı sağlamıştır. Tek agar denemelerinde bakteri òrneklerinin konsantrasyonunun belirli değerlerde uygulanması çift agar denemelerinde elde edilecek verilerin işlenmesine katkı sağlamaktadır.

Denemelerde farklı uzaklıklarda yapýlan bakteri ekimleri fungal gelişimi farklı seviyelerde baskılama etkisi gùstermesinde etkili olduğu dùřünülmektedir (şekil 3.2, şekil 3.3). *B. cinerea*'nın gelişiminde ortam bileşenlerinin miktarı ve ortamdaki rekabet gelişim oranını etkileyen faktùrlerdendir. Denemelerde fungus ve bakteri ekim noktalarının farklı uzaklıklardaki durumlarında yakın ekim yapýlan òrneklerde fungal gelişimi yarıçapının uzak ekim yapýlan òrneklerle göre daha dùřùn olduğu gözlenmiştir. Ekim uzaklığının 2 cm olduğu òrneklerde baskılama yüzdesi yüzde 75-85 aralığında gözlenirken, ekim uzaklığı 3 cm olan òrneklerde baskılama yüzdesi

yüzde 60-70 aralığında belirlenmiştir. Patojen ve biyokontrol ajanının ortamda birbirine olan uzaklığı biyokontrol işleminde önemli olduğu bilinmektedir. Yakın noktalarda yapılan ekimlerde örneklerin yüksek oranda baskılama göstermesi, uzak ekim örneklerde ise baskılamanın daha düşük ancak ölçüm periyotlarına bağlı olarak stabilitesini koruması biyokontrol potansiyelini arttıran veriler olarak değerlendirilebilir.

Biyokontrol ajanının potansiyelinin araştırılmasında mikroorganizmanın MIC konsantrasyonunun değerinin belirlenmesi önemlidir. Uygulaması planlanan mikroorganizmanın etki gösterdiği minimum seviye belirlenerek ekolojik dengenin bozulması en düşük seviyeye indirgenebilir. MIC konsantrasyon değeri biyokontrol ajanının minimum inhibisyon konsantrasyonu olarak ifade eder. Patojen karşısında anlamlı baskılama gösteren minimum konsantrasyon değeri MIC değerini oluşturur. MIC konsantrasyon değerinin düşük olması biyokontrol ajanının etkinliğini değerlendirmede kullanılabilir. Düşük MIC değerine sahip biyokontrol ajanlarının ürettiği metabolitlerin, yüksek MIC değerine sahip biyokontrol ajanlarına göre daha yüksek antifungal etkiye sahip olduğu söylenebilir. Çalışma sürecinde izole edilen örneklerin MIC konsantrasyonunun belirlenmesine yönelik olarak OD./CFU/mL ölçümleri yapılmıştır. Ölçüme yönelik olarak bakteri örneğinin seyreltilerek koloni sayımı yapılmış ve 600 nm’de OD. değerinin ölçümü gerçekleştirilmiştir. Ölçümler sonucunda bakterinin gelişim eğrisi hazırlanarak farklı OD. değerlerindeki inhibisyon etkinliklerine zemin hazırlanmıştır.

Çift agar denemelerinde ortamda biyokontrol ajanının fungal gelişimden önce bulunduğu durumları gözlem altına alarak inhibisyon durumları gözlenmiştir (Şekil 3.7). Örneklerin ölçüm sonucu yüzde 50’den yüksek seviyede inhibisyon gözlenmiştir. Uygulaması yapılan en düşük konsantrasyon örneğinde fungal gelişimin 3. gün ölçümünde minimum değer olarak yüzde 50 kaydedilmiştir. 7. günde yapılan ölçümler ile 10. gün yapılan ölçümlerde fungal gelişimin gerçekleşmediği gözlenmiştir. Fungal gelişimin 7. gün sonunda durması ve 10. gün ölçümüne kadar stabil devam etmesi biyokontrol ajanının potansiyeli açısından destekleyici sonuçlardır (Çizelge 3.4). Örneklerden en düşük konsantrasyon değerine sahip denemenin 10. gün sonunda %68 oranında gözle görülür seviyede baskılama göstermesi biyokontrol ajanının MIC konsantrasyon değerinin belirlenmesine katkı sağlamaktadır. Uygulamada en düşük konsantrasyonda hazırlanan örnekte 3. gün ölçümünde ulaşılan gelişim yarıçapının

diğer örneklere göre yüksek olduğu gözlenmiştir. 7. ve 10. gün sonunda yapılan ölçümlerde ise örneklerin tümünde birbirine yakın miktarda gelişim gösterdiği ve yakın oranlarda baskılama gerçekleştirdiği gözlenmiştir (Çizelge 3.4). Elde edilen bu verilere göre biyokontrol ajanı olarak incelenen bakteri örneğinin konsantrasyon değerinin fungus ile ortam rekabetinde gelişimi açısından önemli olduğu söylenebilir. Örnekler arasında gelişim yarıçaplarının değişimine bakılarak bakterinin baskılama sürecinde devamlılık göstererek fungal gelişimi kontrol altında tutabildiği söylenebilir.

Uygulama sırasında kap içerisine besiyeri ekleme ve ekim işlemlerinin yağım aşamasında mikroorganizma gelişimlerine zarar vermemesi adına sıcaklık değerlerinin kontrolü önemli noktadır. Eklenen besiyerlerinin sıcaklık değerinin yüksek olması kap içerisinde gelişen bakteri kültürünün gelişme performansına zarar verebilecek ve elde edilen verilerin doğruluğunu sarsacak nitelikte olabilir. Uygulama sırasında besiyeri ekleme işleminin uygulama şeklide elde edilecek sonuçların görsel değerlendirilmesinde etki oluşturabilir. Uygun sıcaklıkta kap merkezinden eklenen besiyeri bakteriyel kültürün yoğunluğunun eşit seviyede dağılmasına ve besi yerinin çeper kısmında eşit yoğunluk gelişim göstermesine neden olmaktadır. Merkezden yapılan eklemelerde bakteri kültürünün çeperleri eşit yayılması inkübasyon sonunda görsel ölçümlerde daha doğru değerlendirme yapılabilmesine olanak vermektedir. Bakteri yoğunluğunun eşit dağılmadığı durumlarda yeni besiyerinde bakteriyel gelişimin yoğunluğu farklı olacağından fungal gelişimin baskılaması durumunda farklı gelişim yarıçaplarının ölçümü söz konusudur.

Mikroplaka deneylerinde elde edilen veriler ile incelenen bakterinin gelişim sürecinde optimum ortam koşullarını ve öncelikli enerji kaynağının tespiti gerçekleştirilmiştir. Buna göre bakteri örneği kimyasal deney grubundaki asidik pH ve sodyum klorür ortamlarında, serin ve farklı molekül içerikli ortamlarda en yüksek seviyede gelişim göstererek ortamda bozunmaya sebep olmuştur (Çizelge 3.5). Bu ortamların sahip olduğu kondisyonlar bakteri türünün tercih ettiği gelişim profilinin ortaya konmasında etmen olabilmektedir. Düşük pH değerine sahip ortamda bozunmanın yüksek olması ortamın asidik durumda bakteri gelişimini destekleyici etkisi olduğunu ortaya sunabilir. Tuz miktarının ölçütü olarak tuzsuz ve orta derecede tuzlu koşullarda geçişimin yüksek olduğu gözlenmiştir. Az tuzlu koşullarda ise diğer durumlara göre daha az seviyede bozunma gözlenmiştir. Buna bağlı olarak tuz yoğunluğunun bakteri gelişimi üzerinde etkisinin birincil düzeyde olmadığı söylenebilir (Şekil 3.9). Fungal

gelişim tuz miktarı ile ters orantılı etkileşir. Düşük tuz konsantrasyonundaki ortamlarda fungal gelişim artarken, %20 oranındaki yüksek tuz konsantrasyonunda fungal gelişim durur. Yapılan çalışmalarda fungal gelişimin yüzde 5 ve yüzde 10'luk tuz konsantrasyonlarında yaklaşık olarak %50 değerinde azalma gözlenmiştir. İncelenen bakteri örneğinin %8'lik tuz konsantrasyonunda yüksek seviye bozunma göstermesi fungal gelişime karşı yüksek tuz konsantrasyonuna sahip ortamlarda daha etkili baskılama potansiyeline sahip olduğu söylenebilir. Sodyum butirat, fungal gelişimi yüksek seviyede baskılayabilen bir moleküldür. Sodyum butirat içeren deney grubundabakterinin yüksek gelişim göstermesi biyokontrol potansiyeli açısından önemlidir. Bakterinin biyokontrol uygulamasında sodyum butirat ile oluşturulan kompozisyonları, fungal mikroorganizmaların baskılanması bakımından biyokontrol etkinliğini arttırabilir.

Ortam içeriğinin parçalanmasının düşük olduğu koşullarda bakteri gelişiminin düşük seviyede gerçekleştiği söylenebilir. Propiyonik asit ve asetik asit, fungal gelişimi inhibe eden moleküllerdir. Propiyonik asit sahip olduğu fungisidal ve fungistatik etkiler ile fungal gelişim ve üremeyi engelleyici özelliğe sahiptir (Yun ve Lee, 2016). Asetik asidin fungal gelişim üzerinde inhibitör etkisi olduğu belirli konsantrasyon değerlerinde gelişimi tamamen durdurduğu belirlenmiştir (Kang vd., 2003). Yapılan çalışmalarda propiyonik asit ve asetik asit uygulanan kültürlerde bazı mantar türlerinde fungal gelişimin inhibe edildiği gözlenmiştir. Bozulmanın en hızlı gerçekleştiği ortamlarda bakteri gelişimini teşvik edici moleküllerin seçilimi sağlanabilir. Mikroplaka uygulamasından elde edilen sonuçlara bakılarak ortam bileşeninin parçalanmasının yüksek olduğu ve fungal gelişim üzerinde inhibe etkisi bilinen moleküller ile oluşturulabilecek preparatlar bakterinin antifungal etkisini arttırarak biyokontrol potansiyelinin arttırıcı etki göstereceği düşünülmektedir.

Bakteriyel endoglukanaz ve selülaz aktivitesi, fungal büyüme ve gelişimi inhibe edici enzim aktivitelerindendir. Bu enzimlerin aktif çalışması fungal büyüme sırasında negatif etki göstererek gelişimi durdurarak baskılamaya sebep olmaktadır (Atıf yabancı kaynak yerleştirelim). İncelenen bakterinin CMC agar besi yerlerinde inkübe edildikten sonra kongo kırmızısı ile boyama işlemi yapılmıştır. Selülaz aktivitesi CMC agar besiyerindeki selülozu hedef alarak parçalanmasına sebebiyet vermektedir. Kongo kırmızısı boyası selüloz ile birleşerek besiyerinin kırmızı renk almasına neden olur. Uygulama sonrası yıkama işlemi ile selülaz aktivitesinin gerçekleştiği

bölgelerdeki kongo kırmızısı boyası uzaklaştırılarak şeffaf görüntü almaktadır. Bakterinin ekim yapıldığı ve gelişim gösterdiği bölgede CMC agar besi yerindeki selülozu kullanarak gelişim göstermesi ile boyama uygulamasında gelişim gösteren bölge şeffaf halde olmaktadır. Elde edilen sonuçlara göre incelenen bakteri örneğinin selülaz aktivitesine sahip gen bölgelerinin varlığına ve ürün olarak protein sentezinin sağlandığı söylenebilir. Yapılan işlem ile selülaz aktivitesinin seviyesi hakkında veriye ulaşmak mümkün değildir, yalnızca gen ve gen aktivitesinin varlığına dair değerlendirmelere ulaşılabilir.

Bakterinin tüm genomunun sekanslanması sonucu elde edilen verilerde bakteri örneğinin *Serratia fonticola* DSM 4576 suşu ile benzerlik gösterdiği gözlenmiştir (NCBI kat. no. NZ\_CP011254). *Serratia* türü, literatür genelinde bitki gelişimi destekleyen bakteriler arasında yer almaktadır (Martinez vd., 2018) Farklı *Serratia* türlerinin farklı moleküllere karşı dirençli olduğu ve metabolik işlemlerinde kullandıkları belirlenmiştir.

*Serratia* türünün sahip olduğu farklı moleküllere karşı direnç ve işleme yeteneği biyolojik kontrol uygulamalarında patojenik mikroorganizmalara karşı bu moleküllerin kullanımı ile avantaj kazanabileceği ve dolayısıyla yüksek etkili biyokontrol göstermesi sağlanabilir.

KEGG (<https://www.genome.jp/kegg/>) veri tabanı üzerinde yapılan incelemeler ile bakteri örneğinin sahip olduğu gen bölgeleri ve bu gen bölgeleri ile sahip olduğu biyolojik yolların haritası değerlendirilebilir. Sekans verisi üzerinde belirlenen potansiyel gen bölgelerinden bakteri örneğinin antifungal etkiye sebep olabilecek proteaz, kitinaz, selülaz proteinlerine sahip olabileceği belirlenmiştir (Çizelge 3.6).

#### 4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapılan çalışmalar sonucunda izole ettiğimiz ve *Serratia fonticola* EBS19 olarak isimlendirdiğimiz, NCBI'a tüm genom sekans olarak verilen bu bakterinin *Botrytis cinerea*'ya karşı mücadelede antifungal etkiye sahip olduğu ve fungal gelişimi baskılama yeteneği ile biyolojik kontrol ajanı olarak potansiyele sahip olduğu tespit edilmiştir. Bakteri örneğinin kimliklendirilmesi, sahip olduğu antifungal etkinin seviyesi belirlenmiş, ancak bu baskılamanın hangi yollarla vasıtasıyla gerçekleştirildiği aydınlatılmamıştır. Bu çalışmada fungal gelişimin gözlemlendiği besi yerlerinde bakteriyel kültür ekimi ve geliştirilmesi sonucu fungal büyümenin seviyesi ölçülmüştür. *B. cinerea* gelişiminin farklı konsantrasyonlarda bakteri miktarı ile etkileşimi incelenmiş ve tüm konsantrasyon değerlerinde yüksek seviyede stabil olarak fungal gelişimin baskılandığı gözlemlenmiştir. Yapılan tüm genom sekanslama çalışmalarında elde edilen veriler NCBI veri tabanına PRJNA788871 kayıt numarası ile (Acc. Num.) yüklenmiştir.

Kültür gelişimi seviyesinde elde edilen veriler; kontrollü koşullarda saksı denemelerinde ve sera alanlarında pratik uygulamasında yapılması ve ayrıca farklı moleküller ile kompozisyonlarının antifungal özelliğine etkisinin araştırılarak, biyokontrol potansiyeli yüksek olan bir biyopreperata dönüştürülmesinin mümkün olduğu düşünülmektedir. Ayrıca bakteri örneğinden genom düzeyinde yapılmış antifungal çalışmalar ile elde edilen veriler yeni moleküler düzeyde çalışmalarla desteklenerek hangi enzimatik aktivite ve yollar aracılığıyla fungal gelişimin baskılandığının aydınlatılmasına katkı sağlanabilecektir.

## 5. KAYNAKÇA

- An, B., Li, B. Q., Qin, G. Z. ve Tian, S. P. (2012) Exogenous calcium improves viability of biocontrol yeasts under heat stress by reducing ROS accumulation and oxidative damage of cellular protein, *Current Microbiology*, 65: 122–127.
- Baarlen, P.V., Legendre, L. ve Kan, J. A. L. V. (2007) Plant defence compounds against *Botrytis* infection, 143-161, *Botrytis: Biology, Pathology and Control*, Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski, N. Delen ed., Springer, Netherlands, 447s.
- Baysal, Ö., Lai, D., Xu, H-H., Siragusa, M., Çalışkan, M. ve Carimi, F. (2013) A Proteomic Approach Provides New Insights into the Control of Soil-Borne Plant Pathogens by *Bacillus* Species. *PLoS ONE* 8(1): e53182.
- Berg, G., Krechel, A., Ditz, M., Faupel, A., Ulrich, A. ve Hallmann, J. (2005) Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi. *FEMS Microbiol Ecol* 51:215–229.
- Bhattacharyya, D., Yu, S. M. ve Lee, Y. H. (2015) Volatile compounds from *Alcaligenes faecalis* JBCS1294 confer salt tolerance in *Arabidopsis thaliana* through the auxin and gibberellin pathways and differential modulation of gene expression in root and shoot tissues. *Plant Growth Regulation*, 75: 297-306.
- Bhattacharyya, P.N. ve Jha, D. K. (2012) Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28: 1327-1350.
- Bloemberg, G.V. ve Lugtenberg, B. J. (2001) Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Current Opinion in Plant Biology*, 4: 343-350.
- Bouizgarne, B. (2013) Bacteria for plant growth promotion and disease management, 15-47, D. K. Maheshwari ed., *Bacteria in agrobiology: disease management*, Springer, Berlin, Germany, 495.



- Brandhoff, B., Simon, A., Dornieden, A. ve Schumacher, J. (2017) Regulation of conidiation in *Botrytis cinerea* involves the light-responsive transcriptional regulators bclt3 and bcreg1, *Current Genetics*, 63: 931–949.
- Cabrefiga, J., Bonaterra, A. ve Montesinos, E. (2007) Mechanisms of antagonism of *Pseudomonas fluorescens* EPS62e against *Erwinia amylovora*, the causal agent of fire blight, *International Microbiology* 10: 123-132.
- Cao, B. H., Li, H., Tian, S. P. ve Qin, G. Z. (2012) Boron improves the biocontrol activity of *Cryptococcus laurentii* against *Penicillium expansum* in jujube fruit, *Postharvest Biology and Technology*, 68: 16–21.
- Chan, Z. L., Wang, Q., Xu, X. B., Meng, X. G., Qin, G. Z., Li, B. Q. ve Tian, S. P. (2008) Functions of defense related proteins and dehydrogenases in resistance response induced by salicylic acid in sweet cherry fruits at different maturity stages, *Proteomics*, 8: 4791–4807.
- Chan, Z. L., Tian, S. P. (2005) Interaction of antagonistic yeasts against postharvest pathogens of apple fruit and possible mode of action, *Postharvest Biology and Technology*, 36: 215–223.
- Chan, Z. L., Tian, S. P. (2006) Induction of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-metabolizing enzymes and total protein synthesis in sweet cherry fruit by *Pichia membranefaciens* and salicylic acid treatment, *Postharvest Biology and Technology*, 39: 314–320.
- Compant, S., Duffy, B., Nowak J., Clement C. ve Barka, E. A. (2005) Use of plant growth promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects, *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 4951-4959.
- De Queiroz, B. P. V. ve De Melo, I. S., (2006) Antagonism of *Serratia marcescens* towards *Phytophthora parasitica* and its effects in promoting the growth of citrus. *Brazilian Journal of Microbiol* 37:448–450
- Deng, J., Kong, S., Wang, F., Liu, Y., Jiao, J., Lu, Y., Zhang, F., Wu, J., Wang, L. ve Li X. (2020) Identification of a new *Bacillus sonorensis* strain KLBC GS-3 as a biocontrol agent for postharvest green mould in grapefruit, *Biological Control* Vol. 151:104393

- Devi U, Khatri I, Kumar N, Kumar L, Sharma D, Subramanian S, Saini AK (2013) Draft genome sequence of a plant-growth promoting rhizobacterium, *Serratia fonticola* strain AU-P3(3). *GenomeA ASM* 1(6): e00946–e00913.
- Droby, S., Wisniewski, M., Macarisin, D. ve Wilson, C. (2009) Twenty years of postharvest biocontrol research: is it time for a new paradigm? *Postharvest Biology and Technology*, 52: 137–145.
- Duffy, B., Schouten, A., ve Raaijmakers, J. M. (2003) Pathogen self-defence: mechanisms to counteract microbial antagonism, *Annual Review of Phytopathology* 41: 501-538.
- Duffy B. K., (2001) Competition, 243-244, Maloy O.C., Murray T.D., ed., *Encyclopedia of plant pathology*, Wiley, New York, 1368s.
- Effmert, U., Kalderas, J., Warnke, R. ve Piechulla, B., (2012) Volatile Mediated Interactions Between Bacteria and Fungi in the Soil, *Journal of Chemical Ecology* 38: 665-703.
- Elmer, P. ve Michailides, T., (2007) Epidemiology of *Botrytis cinerea* in Orchard and Vine Crops. Y. Elad vd. ed., *Botrytis: Biology, Pathology and Control*, 243-272
- Essghaier, B., Fardeau, M. L., Cayol, J. L., Hajlaoui, M. R., Boudabous, A., Jijakli, H. ve Sadfi-Zouaoui N. (2009) Biological control of grey mould in strawberry fruits by halophilic bacteria, *Journal of Applied Microbiology* 106: 833-846.
- Faltin, F., Lottmann, J., Grosch, R. ve Berg, G. (2004) Strategy to select and assess antagonistic bacteria for biological control of *Rhizoctonia solani* Kühn, *Canadian Journal of Microbiol* 50:811–820
- Fan, Q., Tian, S. P. (2001) Postharvest biological control of grey mold and blue mold on apple by *Cryptococcus albidus* (Saito) Skinner, *Postharvest Biology and Technology*, 21: 341–350.
- Fillinger, S., Elad, Y. (2016) Botrytis, the Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems, *Springer*, New York, 486s.

- Germeier, C., Hedke, K. ve Tiedemann, A. V., (1994) The use of pH indicators in diagnostic media for acid-producing plant-pathogens, *Zeitschrift Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* 101: 498-507.
- Ghaouth, A. E., Wilson, C. ve Wiśniewski, M. (2004) Biologically-based alternatives to synthetic fungicides for the control of postharvest diseases of fruit and vegetables, 511-535, S.A.M.H. Naqvi, ed., *Diseases of Fruits and Vegetables*, Volume II, Springer, Netherlands, 686.
- Glick B. R., (2012) Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica*, 2012.
- Gould, M., Nelson, L. M., Waterer, D., Hynes, R. K. (2008) Biocontrol of *Fusarium sambucinum*, dry rot of potato, by *Serratia plymuthica* 5-6. *Biocontrol SciTech* 18:1005–1016.
- Gupta, G., Parihar, S. S., Ahirwar, N. K. Snehi S. K. ve Singh, V. (2015) Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Current and Future Prospects for Development of Sustainable Agriculture, *Microbial and Biochemical Technology* 7:2.
- Hahn, M. (2014) The rising threat of fungicide resistance in plant pathogenic fungi: *Botrytis* as a case study, *Journal of Chemical Biology* 7: 133-141.
- Henry, G., Deleu, M., Jourdan, E., Thonart, P. ve Ongena, M. (2011) The bacterial lipopeptide surfactin targets the lipid fraction of the plant plasma membrane to trigger immune related responses, *Cell Microbiology* 13, 1824-1837.
- Hermosa, R., Viterbo, A., Chet, I. ve Monte, E. (2012) Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes, *Microbiology*, 158: 17–25.
- Huang, H. ve Erickson, R. S. (2002) Biological control of *Botrytis* stem and blossom blight of lentil. *Plant Pathology Bulletin* 11, 7-14.
- Huang, H. ve Erickson, R. S. (2005) Control of lentil seedling blight caused by *Botrytis cinerea* using microbial seed treatments, *Plant Pathology Bulletin* 14, 35-40.

- Jaiganesh, V., Eswaran, A., Balabaskar, P. ve Kannan, C. (2007) Antagonistic activity of *Serratia marcescens* against *Pyricularia oryze*, *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj* 35:48–54
- Jamalizadeh, M., Etebarian, H., Aminian, H. ve Alizadeh, A. (2011) A review of mechanisms of action of biological control organisms against post-harvest fruits spoilage, *Bulletin OEPP/EPPO* 41, 65-71.
- Janisiewicz, W. J., Tworowski, T. J. ve Sharer, C. (2000) Characterizing the mechanism of biological control of postharvest diseases on fruits with a simple method to study competition for nutrients, *Phytopathology*, 90: 1196–1200.
- Kai, M., Haustein, M., Molina, F., Petri, A., Scholz, B. ve Piechulla, B. (2009) Bacterial volatiles and their action potential, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81, 1001-1012.
- Kai, M., Effmert, U., Berg, G. ve Piechulla, B. (2007) Volatiles of bacterial antagonists inhibit mycelial growth of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*, *Archives of Microbiology* 187, 351-360.
- Kamensky, M., Ovadis, M., Chet, I. ve Chernin, L. (2003) Soil-borne strain IC14 of *Serratia plymuthica* with multiple mechanisms of antifungal activity provides biocontrol of *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum* diseases, *Soil Biol Biochem* 35:323–331.
- Kanchiswamy, C. N., Malnoy, M. ve Maffei, M. E. (2015) Chemical diversity of microbial volatiles and their potential for plant growth and productivity, *Frontiers in Plant Science* 6, 151.
- Kang, H. C., Park, Y. H., ve Go, S. J. (2003) Growth inhibition of a phytopathogenic fungus, *Colletotrichum* species by acetic acid, *Microbiological Research*, 158(4), 321–326.
- Kapat, A., Zimand, G. ve Elad, Y. (1998) Effect of two isolates of *Trichoderma harzianum* on the activity of hydrolytic enzymes produced by *Botrytis cinerea*, *Physiological and Molecular Plant Pathology* 52, 127-137.

- Kars, I., Krooshof, G. H., Wagemakers, L., Joosten, R., Benen, J. A. ve van Kan, J. A. (2005) Necrotizing activity of five *Botrytis cinerea* endopolygalacturonases produced in *Pichia pastoris*, *The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology*, 43: 213–225.
- Kars, I., McCalman, M., Wagemakers, L. ve van Kan, J. A. (2005) Functional analysis of *Botrytis cinerea* pectin methyl esterase genes by PCR-based targeted mutagenesis: Bcpme1 and Bcpme2 are dispensable for virulence of strain B05.10, *Molecular Plant Pathology*, 6: 641–652.
- Karunaratne, A.M. (2011) Biocontrol mechanisms employed by PGPR and strategies of microbial antagonists in disease control on the post-harvest environment of fruits, 134-164, D. Maheshwari, ed., *Bacteria in Agrobiolgy: Crop Ecosystem*, Springer Verlag, Berlin Heidelberg, Germany, 434s.
- Kim, Y. C., Jung, H., Kim, K. Y. ve Park, S. K. (2008) An effective biocontrol bioformulation against *Phytophthora* blight of pepper using growth mixtures of combined chitinolytic bacteria under different field conditions, *EurJournal of Plant Pathol*, 120:373–382.
- Komárek, M., Cadková, E., Chrastný, V., Bordas, F. ve Bollinger, J. C. (2010) Contamination of vineyard soils with fungicides: a review of environmental and toxicological aspects, *Environment International* 36, 138-151.
- Köhl, J., Postma, J., Nicot, P., Ruocco, M. ve Blum, B. (2011) Stepwise screening of microorganisms for commercial use in biological control of plant-pathogenic fungi and bacteria, *Biological Control* 57, 1-12.
- Kshetri, L., Naseem, F. ve Pandey, P. (2019) Role of *Serratia* sp. as Biocontrol Agent and Plant Growth Stimulator, with Prospects of Biotic Stress Management in Plant. R. Sayyed ed., *Plant Growth Promoting Rhizobacteria for Sustainable Stress Management. Microorganisms for Sustainability*, vol 13. Springer, Singapore.
- Kurniawan, O., Wilson, K., Mohamed, R. ve Avis, T. J. (2018) *Bacillus* and *Pseudomonas* spp. provide antifungal activity against gray mold and *Alternaria* rot on blueberry fruit. *Biological Control* 126. 136-141.

- Kurze, S., Bahl, H., Dahl, R. ve Berg, G. (2001) Biological control of fungal strawberry diseases by *Serratia plymuthica* HRO-C48, *Plant Dis* 85:529–534.
- Labuschagne, N., Pretorius, T. ve Idris, A. H. (2010) Plant growth promoting rhizobacteria as biocontrol agents against soil borne diseases, 211-230, D. K. Meheshwari, ed., *Plant growth and health promoting bacteria*, Springer- Verlag, Berlin Heidelberg, Germany.
- Leroux, P., Frita, R., Debiu, D., Albertini, C., Lanen, C., Bach, J., Gredt, M. ve Chapeland, F. (2002) Mechanisms of resistance to fungicides in field strains of *Botrytis cinerea*, *Pest Management Science* 58, 876-888.
- Leroux, P. (2007) Chemical Control of *Botrytis* and its Resistance to Chemical Fungicides, Elad Y., Williamson B., Tudzynski P., Delen N. ed., *Botrytis: Biology, Pathology and Control*, Springer, Dordrecht, pp. 195–222.
- Leroux, P. (2004) Chemical control of *Botrytis* and its resistance to chemical fungicides, 195-222, Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski, N. Delen, ed., *Botrytis: Biology, Pathology and Control*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands.
- Li, H., Yong, C., Zhang, Z., Li, B., Qin, G. ve Tian S. P. (2018) Pathogenic mechanisms and control strategies of *Botrytis cinerea* causing post-harvest decay in fruits and vegetables, *Food Quality and Safety*, Volume 2, Issue 3, 111–119.
- Li, P., Kwok, A. H. Y., Jiang, J., Ran, T., Xu, D., Wang, W. ve Leung, F. C. (2015) Comparative genome analyses of *Serratia marcescens* FS14 reveals its high antagonistic potential, *PlosOne* 10(4):0123061.
- Li, B. Q., Wang, W. H., Zong, Y. Y., Qin, G. Z. ve Tian, S. P. (2012) Exploring pathogenic mechanisms of *Botrytis cinerea* secretome under different ambient pH based on comparative proteomic analysis, *Journal of Proteome Research*, 11: 4249–4260.
- Liu, J. Sui, Y., Wiśniewski, M., Droby, S. ve Liu, Y. (2013) Review: utilization of antagonistic yeasts to manage postharvest fungal diseases of fruit, *International Journal of Food Microbiology*, 167,153-161.

- Liu, X. M. ve Zhang, H. (2015) The effects of bacterial volatile emissions on plant abiotic stress tolerance, *Frontiers in Plant Science* 6, 774s.
- Liu, J., Wisniewski, M., Droby, S., Vero, S., Tian, S. P. ve HersHKovitz, V. (2011) Glycine betaine improves oxidative stress tolerance and biocontrol efficacy of the antagonistic yeast *Cystofilobasidium infirmominiatum*, *International Journal of Food Microbiology*, 146: 76–83.
- Lugtenberg, B. ve Kamilova, F. (2009) Plant-growth-promoting rhizobacteria, *Annual Review of Microbiology* 63, 541-556.
- Maksimov, I. V., Abizgildina, R. R. ve Pusenkova, L. I. (2011) Plant growth promoting microorganisms as alternative to chemical protection from pathogens, *Applied Biochemistry and Microbiology* 47, 333-345.
- Manteau, S., Abouna, S., Lambert, B. ve Legendre, L. (2003) Differential regulation by ambient pH of putative virulence factor secretion by the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*, *FEMS Microbiology Ecology*, 43: 359–366.
- Martinez, O. A., Encina, C., Tomckowiack, C., Droppelmann, F., Jara, R., Maldonado, C., Munoz, O., Garcia-Fraile, P. ve Rivas, R. (2018) *Serratia* strains isolated from the rhizosphere of raulí (*Nothofagus alpina*) in volcanic soils harbour PGPR mechanisms and promote raulí plantlet growth, *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 18(3), 804-819.
- Nafisi M., Fimognari L. ve Yumiko, S. (2015) Interplays between the cell wall and phytohormones in interaction between plants and necrotrophic pathogens, *Phytochemistry* 112, 63-71.
- Nakajima M. ve Akutsu, K. (2014) Virulence factors of *Botrytis cinerea*, *Journal of General Plant Pathology* 80, 15-23.
- Navazio, L., Baldan, B., Moscatiello, R., Zuppini, A., Woo, S. L., Mariani, P. ve Lorito, M. (2007) Calcium-mediated perception and defense responses activated in plant cells by metabolite mixtures secreted by the biocontrol fungus *Trichoderma atroviride*, *BMC Plant Biology*, 7: 41.

- Neeraja C., Anil, K., Purushotham, P., Suma, K., Sarma, P., Moerschbacher B. M. ve Podile, A. R. (2010) Biotechnological approaches to develop bacterial chitinases as a bioshield against fungal diseases of plants, *Critical Reviews in Biotechnology* 30, 231-241.
- Nicot P., Mardin, M., Alabou vette, C., Köhl, J. ve Ruocco, M. (2011) Potential of biological control based on published research. P. Nicot ed., Protection against plant pathogens of selected crops. *Classical and augmentative biological control against diseases and pests: critical status analysis and review of factors influencing their success*, IOBC/WPRS, Zurich, 1-11.
- Nunes C., Usali, J., Teixido N. ve Vinas, I. (2001) Biological control of postharvest pear diseases using a bacterium, *Pantoea agglomerans* CPA-2, *International Journal of Food Microbiology* 70, 53-61.
- Nunes C., Usali, J., Teixido, N., Fons E. ve Vinas, I. (2002) Post-harvest biological control by *Pantoea agglomerans* (CPA-2) on Golden Delicious apples. *Journal of Applied Microbiology* 92, 247-255.
- Ongena M. ve Jacques, P. (2008) *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol, *Trends in Microbiology* 16, 115-125.
- Ongena, M., Jacques, P., Toure, Y., Destain, J., Jabrane A. ve Thonart, P. (2005) Involvement of fengycin-type lipopeptides in the multifaceted biocontrol potential of *Bacillus subtilis*, *Applied Microbiology and Biotechnology* 69, 29-38.
- Pan, S. ve Bhagat, S. (2011) Biological control of plant diseases, *The Journal of Plant Protection Sciences* 3, 1-14.
- Park, S., Bae, D., Lee, J., Chung, S. ve Kim, H. (1999) integration of biological and chemical methods for the control of pepper gray mold rot under commercial greenhouse conditions, *Plant Pathology Journal* 15, 162-167.
- Park, S. W., Kaimoyo, E., Kumar, D., Mosher, S. ve Klessig, D. F. (2007) Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance, *Science* (New York, N.Y.), 318: 113–116.



- Patel, H., Tscheka, C., Edwards, K., Karlsson G. ve Heerkotz, H. (2011) All-or-none membrane permeabilization by fengycin-type lipopeptides from *Bacillus subtilis* QST713, *Bio-chimica et Biophysica Acta* 1808, 2000-2008.
- Paul, B., Girard, I. Bhatnagar, T. ve Bouchet, P. (1997) Suppression of *Botrytis cinerea* causing grey mould disease of grape vine (*Vitis vinifera*) and its pectinolytic activities by a soil bacterium, *Microbiological Research* 152, 413-420.
- Pérez-García, A., Romero, D. ve De Vicente, A. (2011) Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of bacilli in agriculture, *Current Opinion in Biotechnology* 22, 187-193.
- Petatán-Sagahón, I., Anducho-Reyes, M. A., Silva-Rojas, H. V., Arana-Cuenca, A., Tellez-Jurado, A., Cárdenas-Álvarez, I. O., ve Mercado-Flores, Y. (2011) Isolation of bacteria with antifungal activity against the phytopathogenic fungi *Stenocarpella maydis* and *Stenocarpella macrospora*. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(9), 5522–5537.
- Piano, S., Neyrotti, V., Migheli, Q., Gullino, M. L. (1997) Biocontrol capability of *Metschnikowia pulcherrima* against *Botrytis* postharvest rot of apple, *Postharvest Biology and Technology*, 11: 131–140.
- Pretorius, D., Van Rooyen, J. ve Clarke, K.G. (2015) Enhanced production of antifungal lipopeptides by *Bacillus amyloliquefaciens* for biocontrol of postharvest disease, *New Biotechnology* 32, 243-252.
- Qin, G. Z., Tian, S. P. (2005) Enhancement of biocontrol activity of *Cryptococcus laurentii* by silicon and the possible mechanisms involved, *Phytopathology*, 95: 69–75.
- Qin, G. Z., Tian, S. P., Xu, Y. (2004) Biocontrol of postharvest diseases on sweet cherries by four antagonistic yeasts in different storage conditions, *Postharvest Biology and Technology*, 31: 51–58.
- Raaijmakers, J. M. ve Mazzola, M. (2012) Diversity and natural functions of antibiotics produced by beneficial and plant pathogenic bacteria, *Annual Review of Phytopathology* 50, 403-424.

- Raaijmakers, J. M., Vlami, M. ve De Souza, J. T. (2002) Antibiotic production by bacterial biocontrol agents, *Antonie van Leeuwenhoek* 81, 537-547.
- Roberts, D. P., Lohrke, S. M., Meyer, S. L. F., Buyer, J. S., Bowers, J. H., Baker, C. J., Li, W., de Souza, J. T., Lewis, J. A., Chung, S. (2005) Biocontrol agents applied individually and in combination for suppression of soilborne diseases of cucumber, *Crop Prot* 24:135–141.
- Robert-Seilanianantz, A., Grant, M., Jones, J. D. (2011) Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just jasmonate-salicylate antagonism, *Annual Review of Phytopathology*, 49: 317–343.
- Romanazzi, G. ve Feliziani, E. (2014) *Botrytis cinerea*. In: Post-harvest Decay: Control Strategies, S. Bautista-Baños ed., *Elsevier*, London, 131-146.
- Romanazzi, G., Smilanick, J. L., Feliziani, E. ve Droby, S. (2016) Integrated management of postharvest gray mold on fruit crops, *Postharvest Biology and Technology* 113.
- Ryu, C. M., Farag, M. A., Hu, C. H., Reddy, M. S., Wei, H. X., Pare, P. W. ve Kloepper, J. W. (2003) Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 4927-4932.
- Ryu, C. M., Farag, M. A., Hu, C. H., Reddy, M. S., Kloepper, J. W. ve Pare, P. W. (2004) Bacterial volatiles induce systemic resistance in *Arabidopsis*, *Plant Physiology* 134, 1017-1026.
- Schoonbeek, H. J., Jacquat-Bovet, A. C., Mascher, F. ve Métraux, J. P. (2007) Oxalate-degrading bacteria can protect *Arabidopsis thaliana* and crop plants against *Botrytis cinerea*, *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20, 1535-1544.
- Schoonbeek, H. J., Raaijmakers, J. M. ve De Waard, M. A. (2002) Fungal ABC transporters and microbial interactions in natural environments, *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 15, 1165-1172.

- Sharma, R. R., Singh, D. ve Singh, R. (2009) Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: a review. *Biological Control*, 50: 205–221.
- Shen, S. S., Kim, J. W., Park, C. S. (2002) *Serratia plymuthica* strain A21-4: a potential biocontrol agent against *Phytophthora* blight of pepper. *Korean Journal of Plant Pathol*, 18:138–141.
- Sun, Z., Yang, L., Han, M., Han, Z., Yang, L., Cheng, L., Yang, X. ve Lv, Z. (2019) Biological control ginseng grey mold and plant colonization by antagonistic bacteria isolated from rhizospheric soil *Panax ginseng* Meyer, *Biological Control*, 138: 104048.
- Spadaro, D. ve Gullino, M. L. (2004) State of art and future perspectives of biological control of postharvest fruit diseases, *International Journal of Food Microbiology*, 91, 185-194.
- Spadaro, D. ve Droby, S. (2016) Development of biocontrol products for postharvest diseases of fruit: the importance of elucidating the mechanisms of action of yeast antagonists, *Trends in Food Science and Technology* 47, 39-49.
- Tampakaki, A. P., Hatziloukas, E. ve Panopoulos, N. J. (2009) Plant pathogens, bacteria, *Encyclopedia of Microbiology*. 3rd ed. Elsevier, 655-677.
- ten Have, A., Mulder, W., Visser, J. ve van Kan, J. A. (1998) The endopolygalacturonase gene *bcp1* is required for full virulence of *Botrytis cinerea*, *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 11: 1009–1016.
- Tian, S. P. (2006) Microbial control of postharvest diseases of fruits and vegetables: current concepts and future outlook, Ray R. C., Ward O. P. ed., *Microbial Biotechnology in Horticulture*, Vol. 1. Pub. Science, Enfield, pp. 163–202.
- Tian, S. P., Fan, Q., Xu, Y., Liu, H. B. (2002) Biocontrol efficacy of antagonist yeasts to gray mold and blue mold on apples and pears in controlled atmospheres, *Plant Disease*, 86: 848–853.
- Tian, S. P., Yao, H. J., Deng, X., Xu, X. B., Qin, G. Z., Chan, Z. L. (2007) Characterization and expression of beta-1,3-glucanase genes in jujube fruit

- induced by the microbial biocontrol agent *Cryptococcus laurentii*, *Phytopathology*, 97: 260–268.
- Van Loon, L. C., Bakker, P. A. H. M. ve Pieterse, C. M. J. (1998) Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria, *Annual Review of Phytopathology* 36, 453-483.
- Walker, A. S., Micoud, A., Rémuson, F., Grosman, J., Gredt, M. ve Leroux, P. (2013) French vineyards provide information that opens ways for effective resistance management of *Botrytis cinerea* (grey mould), *Pest Management Science* 69, 667-678.
- Walters, D. ve Heil, M. (2007) Costs and trade-offs associated with induced resistance, *Physiological and Molecular Plant Pathology* 71, 3-17.
- Walters, D. R., Ratsep, J. ve Havis, N. D. (2013) Controlling crop diseases using induced resistance: challenges for the future, *Journal of Experimental Botany* 64, 1263-1280.
- Wan, M., Li, G., Zhang, J., Jiang, D. ve Huang, H. C. (2008) Effect of volatile substances of *Streptomyces platensis* F-1 on control of plant fungal diseases, *Biological Control*, 46, 552-559.
- Wang, K. T., Jin, P., Han, L., Shang, H. T., Tang, S. H., Rui, H. J., Duan, Y., Kong, F. Y., Kai, X. ve Zheng, Y. H. (2014) Methyl jasmonate induces resistance against *Penicillium citrinum* in Chinese bayberry by priming of defense responses, *Postharvest Biology and Technology*, 98: 90–97.
- Williamson, B., Tudzynski, B., Tudzynski P. ve Van Kan, J. A. L. (2007) *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease, *Molecular Plant Pathology*, 8, 561-580.
- Wilson, C. L. ve Wiśniewski, M. (1994) Biological Control of Postharvest Diseases: Theory and Practice, *CRC Press*, 182s.
- Wiśniewski, M., Biles, C., Droby, S., McLaughlin, R., Wilson, C. ve Chalutz, E. (1991) Mode of action of the postharvest biocontrol yeast, *Pichia guilliermondii*. I. Characterization of attachment to *Botrytis cinerea*, *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 39, 245-258.

- Wu L., Wu, H. J., Qiao, J., Gao, X. ve Borriss, R. (2015) Novel routes for improving biocontrol activity of *Bacillus* based bioinoculants, *Frontiers in Microbiology* 6, 1395.
- Yang, H. H., Yang, S. L., Peng, K. C., Lo, C. T. ve Liu, S. Y. (2009) Induced proteome of *Trichoderma harzianum* by *Botrytis cinerea*, *Mycological Research*, 113: 924–932.
- Yao, H. J., Tian, S. P. ve Wang, Y. S. (2004) Sodium bicarbonate enhances biocontrol efficacy of yeasts on fungal spoilage of pears, *International Journal of Food Microbiology*, 93: 297–304.
- Yazici, S., Yanar, Y. Y. ve Karaman, I. (2011) Evaluation of bacteria for biological control of early blight disease of tomato, *Afr J Biotechnol* 10(9):1573–1577.
- Yun, J. ve Lee, D. G. (2016) A novel fungal killing mechanism of propionic acid, *FEMS Yeast Research*, 16(7).

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Ad Soyad :E\*\* B\*\*\* B\*\*\*\*\*  
Uyruk :T.C.  
Doğum Tarihi :0\*/0\*/19\*\*  
Doğum Yeri :İ\*\*\*\*\* / B\*\*\*\*\*y  
Medeni Hali :Bekar  
Telefon :0 507 \*\*\* \*\* \*\*  
E-posta :e\*\*\*\*\*z@gmail.com

### Eğitim

| Alınan Derece | Aldığı Kurum/Üniversite          | Mezuniyet Yılı |
|---------------|----------------------------------|----------------|
| Lise          | Figen Sakallıoğlu Anadolu Lisesi | 2013           |
| Lisans        | Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi  | 2017           |

### İş Tecrübesi

| Yıl       | Yer                                        | Pozisyon/Görev         |
|-----------|--------------------------------------------|------------------------|
| 2019-2020 | Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi BAP birimi | Araştırmacı - Bursiyer |

### Yabancı Dil

| Dil (İngilizce) | Başlangıç | Orta | İleri |
|-----------------|-----------|------|-------|
| Yazma           |           |      | X     |
| Konuşma         |           |      | X     |
| Anlama          |           |      | X     |
| Okuma           |           |      | X     |

### **Katıldığı Eğitimler ve Bilimsel Faaliyetler**

- Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Fen Bilimleri XI. Araştırma Sempozyumu, Sözlü Sunum Katılım Belgesi, Ocak 2021
- 9th International Molecular Biology and Biotechnology Congress, Bildiri Katılım Sertifikası, Aralık 2020, Kafkas Üniversitesi
- 3rd International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences, Bildiri Katılım Sertifikası, Mart 2020, Eurasian Research, Development, Science and Technology Center
- 6th International Conference on Sustainable Agriculture and Environment, Bildiri Katılım Sertifikası, Ekim 2019, Selçuk Üniversitesi

