DOMATES BAKTERİYEL SOLGUNLUK VE KANSER HASTALIĞI ETMENİ (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis *et al.*)'NİN BİYOAJAN BAKTERİLER KULLANILARAK MÜCADELE İMKANLARININ ARAŞTIRILMASI

Parisa MOHAMMADI

Doktora Tezi
Bitki Koruma Anabilim Dalı
Fitopatoloji Bilim Dalı
Prof. Dr. Recep KOTAN
Doç. Dr. Youbert GHOSTA
2018
Her hakkı saklıdır

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

DOMATES BAKTERİYEL SOLGUNLUK VE KANSER HASTALIĞI ETMENİ (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis *et al.*)'NİN BİYOAJAN BAKTERİLER KULLANILARAK MÜCADELE İMKANLARININ ARAŞTIRILMASI

Parisa MOHAMMADI

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI
Fitopatoloji Bilim Dalı

ERZURUM
2018

Her hakkı saklıdır

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TEZ ONAY FORMU

DOMATES BAKTERİYEL SOLGUNLUK HASTALIĞI ETMENİ (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis *et al.*)'NİN BİYOAJAN BAKTERİLER KULLANILARAK MÜCADELE İMKANLARININ ARAŞTIRILMASI

Prof. Dr. Recep KOTAN danışmanlığında, Doç. Dr. Youbert GHOSTA ortak danışmanlığında Parisa MOHAMMADI tarafından hazırlanan bu çalışma 08/11/2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Bitki Koruma Anabilim Dalı – Fitopatoloji Bilim Dalı'nda Doktora Tezi olarak **oybirliği/~~oy çokluğu~~ (6./6.)** ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Recep KOTAN *İmza :*

Üye : Prof. Dr. Ertan YILDIRIM *İmza :*

Üye : Doç. Dr. Kenan KARAGÖZ *İmza :*

Üye : Doç. Dr. Arzu ALA *İmza :*

Üye : Doç. Dr. Elif TOZLU *İmza :*

Üye : Doç. Dr. Fatih DADAŞOĞLU *İmza :*

Üye : Doç. Dr. Youbert GHOSTA *İmza :*

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulunun ..18../ 12..../ 2018.... tarih ve ..50. ./ . . 19. . . . . nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mehmet KARAKAN
Enstitü Müdürü

Bu çalışma BAP projesi kapsamında desteklenmiştir.
Proje No: 2014222

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Doktora Tezi

DOMATES BAKTERİYEL SOLGUNLUK VE KANSER HASTALIĞI ETMENİ (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis *et al.*)'NİN BİYOAJAN BAKTERİLER KULLANILARAK MÜCADELE İMKANLARININ ARAŞTIRILMASI

Parisa MOHAMMADI

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Bitki Koruma Anabilim Dalı
Fitopatoloji Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Recep KOTAN
Ortak Danışman: Doç. Dr. Youbert GHOSTA

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis* domateste solgunluk ve kanser hastalığına neden olan önemli bir bakteriyel patojendir. Bu patojene karşı etkili bir mücadele yöntemi bulunmamaktadır. Yapılan bu çalışmada; daha önce yürütülen çalışmalarda yabani ve kültür bitkilerinden izole edilen toplam 1150 epifitik veya endofitik aday biyoajan bakteri izolatları *in vitro* koşullarda patojene karşı test edilmiştir. *In vitro* test sonuçlarına göre seçilen toplam 48 adet bakteri izolatının üretikleri bazı metabolitler ve enzim aktiviteleri belirlenmiştir. Bu izolatlar viyollerde denererek seçilen toplam 7 bakteri izolatının saksıda kontrollü koşullarda ve tarlada bitki gelişimi ve hastalık şiddeti üzerine etkisi test edilmiştir. Biyoajanların hastalığı engelleme oranı saksı denemelerinde %68 ile %95,7; tarla denemelerinde ise %63,8 ile %89,3 arasında değişmiştir. Her iki denemede de en etkili iki izolatın TV-85D ve TV-49A olduğu tespit edilmiştir. *In vivo* denemelerde test edilen bütün bakteri izolatlarının bitkideki antioksidan enzim düzeylerinde de önemli artışlara sebep olduğu görünmüştür. Formülasyon oluşturulması için seçilen bu iki bakteri izolatının sera ve tarla çalışmalarında da hastalığı %88 ile %94 oranında engellediği belirlenmiştir. Bu iki formülasyon bitki gelişim parametreleri ve verimde de önemli artışlara sebep olmuştur. Etkili bulunan bu iki bakteri izolatının 16s rDNA sonuçları TV-49A izolatı için *Bacillus pumilus* ve TV-85D izolatı için *Bacillus velezensis* olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak raf ömrü daha uzun bir taşıyıcı formülasyonun geliştirilmesi durumunda bu iki biyoajan bakterinin de patojenin mücadelesinde başarılı bir şekilde kullanılabileceği düşünmektedir.

2018, 111 sayfa

Anahtar Kelimeler: Antioksidant enzimler, *Bacillus pumilus*, *Bacillus velezensis*, Biyokontrol, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, 16S rDNA

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

EVALUATION OF BIOLOGICAL CONTROL OF (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis *et al.*) BACTERIAL WILT AND CANKER OF TOMATO BY ANTAGONISTIC BACTERIA

Parisa MOHAMMADI

Atatürk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Plant Proection

Supervisor: Prof. Dr. Recep KOTAN
Co Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Youbert GHOSTA

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis* is an important bacterial pathogen that causes wilt and canker disease in tomato. There is no effective control measures against this pathogen. In this study; a total of 1150 bacteria isolates epiphytic or endophytic candidate isolated from wild and cultivated plants in previous studies were tested against pathogens *in vitro* conditions. According to the *in vitro* test results, some metabolites and enzyme activities of the total 48 bacteria isolates were determined. These isolates were tested in the violes and 7 bacterial isolates selected for green house assay in controlled conditions and their effect on plant growth and disease severity in the field. The rate of disease inhibition of bioagents was 68% to 95.7% in green house trials; it ranged from 63.8% to 89.3% in the field trials. In two experiments the most effective isolates were TV-85D and TV-49A. It has been observed that all of the bacterial isolates tested *in vivo* experiments cause significant increases in antioxidant enzyme levels in the plant. These two bacterial isolates (TV-85D and TV-49A) were selected to development of formulations and prevented the disease by 88% to 94% in greenhouse and field studies. These two formulations led to significant increases in plant growth parameters and yield. These two bacterial isolates by 16s rDNA results were determined as *Bacillus pumilus* for TV-49A isolate and *Bacillus velezensis* for TV-85D isolate. Consequently, in the case of the development of a longer shelf-life carrier formulation, these two bioagent bacteria can also be used successfully in the pathogen challenge.

2018, 111 pages

Keywords: Antioxidant enzymes, *Bacillus pumilus*, *Bacillus velezensis*, Biocontrol, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, 16S rDNA

TEŞEKKÜR

Bana bu uzun yolda ışık tutan, yardımlarını esirgemeyen ve bana "Domates Bakteriyel Solgunluk ve Kanser Hastalığı Etmeni (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis *et al.*)'nin Biyoajan Bakteriler Kullanilarak Mücadele İmkanlarının Araştırılması", konulu doktora tezini veren danışmanım, Prof. Dr. Recep KOTAN'a teşekkür ediyorum. Tezim süresince bana destek veren ve değerli bir bilim insanı olan doktora tez ortak danışmanım Sayın Doç. Dr. Youbert GHOSTA'a sonsuz teşekkürler.

Daima olumlu yaklaşımı, sıcak gülümsemesiyle yanımda olan ve her konuda bana yardım eden Sayın Doç. Dr. Elif TOZLU'ya şükranlarımı sunarım. Doktora Tez İzleme Komitesi üyesi Sayın Prof. Dr. Ertan YILDIRIM'a çalışmamın tüm aşamalarında yönlendirici ve olumlu katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Atatürk Üniversitesi Bitki Koruma Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Hidayet BOSTAN'a, bilimsel ve manevi anlamda desteklerini esirgemeyen diğer bütün değerli hocalarıma, bölümümüzün yüksek lisans ve doktora öğrencilerine desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Hepsinin adını tek tek sayamasam da kalbimdeki yerleri tartışmasız olan ailemin her ferdine ayrı ayrı şükranlarımı sunuyorum. Burada manevi desteği ve sevgisiyle her zaman yanımda olduğunu hissettiğim ve her halimle baş etmek konusunda oldukça başarılı olan sevgili eşim Naser LOTFI ve oğlum Elman LOTFI'ye sonsuz teşekkürler.

Kasım 2018

Parisa MOHAMMADI

İÇİNDEKİLER

ÖZET i
ABSTRACT ii
TEŞEKKÜR iii
SİMGELER ve KISATMALAR DİZİNİ vii
ŞEKİLLER DİZİNİ viii
ÇİZELGELER DİZİNİ ix
1. GİRİŞ 1
2. KAYNAK ÖZETLERİ 11
3. MATERYAL ve YÖNTEM 24
3.1. Materyal 24
3.1.1. Çalışmada kullanılan besi ortamları 24
3.1.2. Yağ asit analizi çalışmasında kullanılan kimyasal solüsyonlar 26
3.1.3. Çalışmada kullanılan patojen bakteri 27
3.1.4. Çalışmada kullanılan potansiyel biyoajan bakteriler 27
3.1.5. Sera ve tarla çalışmalarında kullanılan bitki çeşidi 28
3.2. Yöntem 29
3.2.1. Patojen bakteri izolatının virülanslık testi 29
3.2.2. Potansiyel biyoajan bakterilerin *in vitro* koşullarında patojene karşı test edilmesi 29
3.2.3. Potansiyel biyoajan bakterilerin mikrobial identifikasyon sisteminde tanısı 30
3.2.4. Potansiyel biyoajan bakterilerin biyokimyasal testlerle bazı özelliklerinin belirlenmesi 31
3.2.4.a. Potasyum hidroksit testi (KOH) 31
3.2.4.b. Katalaz testi 31
3.2.4.c. Oksidaz testi 31
3.2.4.d. Levan (fructan) testi 32
3.2.4.e. Aminosiklopropan karboksilat deaminaz (ACCD) aktivitesi 32
3.2.4.f. Azot fiksasyonunun tespiti 32
3.2.4.g. Fosfat çözücülüğü tespiti 33
3.2.5. Potansiyel biyoajan bakterilerin üretebildiği metabolitlerin belirlenmesi 33

3.2.5.a. Hidrojen siyanid (HCN) 33
3.2.5.b. Indol asetik asit (IAA) 33
3.2.5.c. Salisilik asit (SA) 34
3.2.5.d. Siderofor 34
3.2.6. Potansiyel biyoajan bakterilerin enzim aktivitesinin ölçulmesi: 34
3.2.6.a. Kitinaz 34
3.2.6.b. Fitaz 35
3.2.6.c. Amilaz 35
3.2.6.d. Proteaz 36
3.2.6.e. Lipaz 36
3.2.6.f. Lisin dekarboksilaz 36
3.2.7. Viyol denemeleri 37
3.2.8. Serada saksı denemeleri 37
3.2.9. Tarla denemeleri 38
3.2.10. Bitki savunma metabolizma enzimlerin değerlendirilmesi 38
3.2.10.a. Polifenol oksidaz (PPO) 39
3.2.10.b. Katalaz 39
3.2.10.c. Peroksidaz (POX) 39
3.2.10.d. Süperoksit dismutaz (SOD) 40
3.2.10.e. Total fenol 40
3.2.11. Saksı ve tarla şartlarındaetkili bulunan bakteriler için formülasyon oluşturulması 41
3.2.11.a. Kültürlerin katı besi ortamında geliştirilmesi 41
3.2.11.b. Aşılama kültürleri için sıvı besiyerinin belirlenmesi 41
3.2.11.c. Bakterilerin optimum gelişme koşullarının belirlenmesi 42
3.2.11.d. Sıvı taşıyıcının oluşturulması ve sterilizasyonu 43
3.2.11.e. Aşılama kültürlerinin fermentörde sıvı taşıyıcı içerisinde üretilmesi ve paketlenmesi 44
3.2.12. Paketlenen son ürün ile domateste sera ve tarla denemelerinin kurulması 45
3.2.13. Uygulamaların yapıldığı bitkilerdeki bitki büyümeve verim parametrelerinin alınması 45
3.2.13.a. Bitki yüksekliği (bitki boyu) 45

3.2.13.b. Gövde çapı (gövde kalınlığı) 45
3.2.13.c. Çiçek sayısı 46
3.2.13.d. Yaprakta klorofil (SPAD değeri) 46
3.2.13.e. Dal sayısı 46
3.2.13.f. Meyve sayısı 46
3.2.13.g. Meyve ağırlığı 46
3.2.13.h. Yaş ve kuru bitki ağırlığı 47
3.2.13.i. Çiçeklenme süresi 47
3.2.14. Hastalık şiddeti ve uygulamaların etkinliğinin değerlendirilmesi 47
3.2.15. Saksı ve tarla çalışmalarından elde edilen sonuçların analizi 47
3.3. Potansiyel Biyoajan Bakterilerin PCR Tekniği İle Tanısı 48
4. ARAŞTIRMA BULGULARI 50
4.1. Virülanslık Test Sonucu 50
4.2. Potansiyel Biyoajan Bakterilerin *İn Vitro*'da Patojene Karşı Test Sonuçları 51
4.3. Potansiyel Biyoajan Bakterilerin Mikrobial İdentifikasyon Sisteminde Tanı Sonuçları 54
4.4. Potansiyel Biyoajan Bakterilerin Biyokimyasal Test Sonuçları 55
4.5. Potansiyel Biyoajan Bakterilerin Metabolit Test Sonuçları 59
4.6. Potansiyel Biyoajan Bakterilerin Enzim Aktivitesinin Sonuçları 62
4.7. Viyol Deneme Sonuçları 65
4.8. Saksı Deneme Sonuçları 67
4.9. Tarla Deneme Sonuçları 71
4.10. Bitki Savunma Metabolizma Enzimlerin Değerlendirilmesi 74
4.11. Saksıda Etkili Bulunan Bakteriler İçin Formülasyon Oluşturulması 76
4.12. Aşılama Kültürlerinin Fermentörde Sıvı Taşıyıcı İçerisinde Üretilmesi ve Paketlenmesi 78
4.13. Son Ürün ile Domateste Sera ve Tarla Denemelerinin Kurulması 79
4.14. *In vitro* ve *In vivo*'da Etkili Bulunan Bakterilerin Moleküler Tanı Sonuçları 84
5. TARTIŞMA ve SONUÇ 86
5.1. Sonuç 95
KAYNAKLAR 97
ÖZGEÇMİŞ 112

SİMGELER ve KISATMALAR DİZİNİ

ACCD	Aminocyclopropane carboxylic deaminase
Bİ	Benzerlik İndeksleri
ºC	Santigrat derece
Cmm	*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
Cm	Santimetre
dH2O	Distile su
Dk	Dakika
G	Gram
ISR	Induced systemic resistance
King B	King's medium B
Kob	Koloni oluşturan bakteri sayısı
KOH	Potasyum hidroksit
L	Litre
LB	Luria Bertani Broth
Mg	Miligram
MIS	Microbial Identification System
Ml	Mililitre
NA	Nutrient Agar
NB	Nutrient Broth
NBYA	Nutrient-Broth Yeast Extract Agar
PCR	Polymerase Chain Reaction
PGPR	Plant Growth Promoting Rhizobacteria
pH	Hidrojen iyonu konsantrasyonu
POX	Peroksidz
PPO	Polifenol oksidaz
ppm	Milyonda bir kısım
rpm	Santrifuj dönüş hızı
sdH2O	Steril ve distil su
sH2O	Steril su
Sa	Saat
S	Saniye
SOD	Superoksid dismutaz
sp.	Tür
spp.	Türler
TSA	Triptic Soy Agar
TSB	Triptic Soy Broth
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1. Domates bitkisinde yapılan virülanslık testi 50
Şekil 4.2. *Cmm*'e karşı test edilen potansiyel biyoajan bakterilerin test sonucu 54
Şekil 4.3. Potansiyel biyoajan bakterilerin biyokimyasal test sonuçları 56
Şekil 4.4. 1) Azot fiksasyonunu test sonucu ve 2) Fosfat çözünürlüğü test sonucu 56
Şekil 4.5. 1) Hidrojen Siyanid (HCN) testi; 2) İndol Asetik Asit (IAA) testi; 3) Siderofor üretimi 59
Şekil 4.6. 1) Proteaz testi sonucunda potansiyel biyoajan bakterilerin oluşturduğu zonlar; 2) Lisin dekarboksilaz testi sonucunda pozitif ve negatif olarak değerlendirilen potansiyel biyoajan bakteriler; 3) Amilaz testi sonucunda potansiyel biyoajan bakterilerin amilaz üretme durumu 62
Şekil 4.7. Viyol denemesineait genel bir görünüm 65
Şekil 4.8. Viyol denemelerinden bir görünüm (1:TV-49A izolatı, 2:Negatif kontrol, 3:Pozitif kontrol) 65
Şekil 4.9. Potansiyel biyoajan bakterilerin saksı denemeleri 68
Şekil 4.10. Potansiyel biyoajan bakterilerin tarla denemeleri 74
Şekil 4.11. Formüle edilen biyoajanların sera denemeleri 80
Şekil 4.12. Formüle edilen biyoajanların tarla denemeleri 81

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan potansiyel biyoajan bakteriler 28
Çizelge 3.2. PCR işleminde kullanılan reaksiyon karışımın içeriği 48
Çizelge 3.3. PCR işlemi için kullanılan program 49
Çizelge 4.1. Çalışmada kullanılan potansiyel biyoajan bakterilerin patojene karşı etkinlik test sonuçları 51
Çizelge 4.2. Çalışmada kullanılan potansiyel biyoajan bakteri izolatlarının NBYA besi yerinde ortalama zon çapları 53
Çizelge 4.3. Potansiyel biyoajan bakterilerin MIS sonuçları ve benzerlik indeksleri (**B**İ) 54
Çizelge 4.4. Biyoajan bakterilerin biyokimyasal test sonuçları 57
Çizelge 4.5. Potansiyel biyoajan bakterilerin metabolit test sonuçları 60
Çizelge 4.6. Çalışmada kullanılan potansiyel biyoajan bakterilerin enzim aktivite sonuçları 63
Çizelge 4.7. Biyoajanların viyol çalışmasında domates bakteriyel solgunluk hastalığını engelleme oranları 66
Çizelge 4.8. Potansiyel biyoajan bakterilerin saksı çalışmasında domates bakteriyel solgunluk hastalığını engelleme oranları 67
Çizelge 4.9. Yapılan sera denemelerinde potansiyel biyoajan bakterilerin bitki gelişimi üzerine etki sonuçları 69
Çizelge 4.10. Potansiyel biyoajan bakterilerin tarla denemesinde domates bakteriyel solgunluk hastalığını engelleme oranları 71
Çizelge 4.12. Uygulamaların sera koşullarında bitki enzim aktiviteleri üzerine etkisi .. 75
Çizelge 4.13. Uygulamaların tarla koşullarında bitki enzim aktiviteleri üzerine etkisi.. 76
Çizelge 4.14. Bakterilerin farklı pH, sıcaklık ve besi ortamlarında gelişme durumları . 77
Çizelge 4.15. Paketleme yapılmış ürünlerin oda sıcaklığı ve 5°C'deki raf ömürleri 78
Çizelge 4.16. Formüle edilen biyoajanların sera ve tarla çalışmasında domates bakteriyel solgunluk hastalığını engelleme oranları 79
Çizelge 4.17. Formüle edilen biyoajanların sera koşullarında bitki gelişimi üzerine etkileri 82

Çizelge 4.18. Formüle edilen biyoajanların tarla koşullarında bitki gelişimi üzerine etkileri 83
Çizelge 4.19. *In vitro* ve *in vivo*'da etkili bulunan bakterilerin moleküler tanı sonuçları ve benzerlik indeksleri 84

1. GİRİŞ

Domates (*Lycopersicon esculentum* Mill.), dünya çapında yetiştiriciliği yapılan *Solanacea* familyasının *Lycopersicon* cinsine bağlı, ılıman iklimlerde yıllık, tropikal bölgelerde ise çok yıllık bir bitkidir (Seniz 1992). Dünyanın değişik ülkelerinde farklı ekolojilerde en çok yetiştirilen ve tüketilen, adaptasyon yeteneği oldukça fazla olan bir sebze türü olup; anavatanı Orta Amerika ile Güney Amerika'nın kuzey kesimleri, ekvatorun 30° kuzey ve güneyinde kalan bölge içinde yer alan Peru ile Meksika'dır (Ercan vd 2002).

Günümüzde, sebzelerin sağlıklı bir beslenme için oldukça önemli olduğu bilinmektedir. Özellikle sera sebze yetiştiriciliğinin en önemli ürünleri arasında yer alan domates,içerdiği B1, B6, A, C vitaminleri ve yüksek miktarda likopenden dolayı beslenme açısından önemli bir yere sahiptir (Orman ve Kaplan 2004). İçerdiği likopenden dolayı sağlık açısından önemi olan domatesle ilgili olan çalışmalar sonucunda,bu sebzenin haftada iki defa tüketildiğinde kolon, prostat, göğüs, ağız kanseri riskinin azaldığı ve kalp damar hastalıklarına karşı koruyucu etki yaptığı tespit edilmiştir. Ayrıca, likopenin kolestrolü artıran bazı enzimleri engelleyerek, kanın kolestrol değerini düşürdüğü, saçları ve cildi güzelleştirdiği, beyin hücrelerinin yaşlanmasını yavaşlattığı, bağışıklık sistemini güçlendirdiğide belirlenmiştir (Demir ve Akgun 2014).

Domates; dünyada en çok üretilen, tüketilen ve ticarete konu olan tarım ürünlerinin başında gelir. İnsan beslenmesindeki vazgeçilmez ürünlerden olması ve gıda sanayinde dondurulmuş, konserve, salça, ketçap ve turşu gibi çok çeşitli kullanım alanlarına sahip olması nedeniyle Türkiye için de büyük önem arz etmektedir (Keskin ve Gül 2004; Günay 2005).

Domates üretimi, her geçen yıl artış göstermektedir. İklim değişikliklerine karşı dayanıklı olması yanında kolay yetiştiriciliğiyle de birçok üretici tarafından tercih edilen

domates, toplam ekiliş alanı, üretimi ve ticareti açısından da Türkiye'de yaş sebze grubunun en önemli ürünlerinden birisini oluşturmaktadır. Türkiye'de hemen her yerde hem açık alanda hem de örtü altında sofralık ve sanayii domatesi üretilmektedir. Özellikle Marmara, Ege ve Akdeniz Bölgeleri'nde çok geniş alanlarda yetiştiriciliği yapılmaktadır (Vural vd 2000). Sofralık domates üretimi en fazla Akdeniz Bölgesi'nde kışın plastik ve cam seralarda, yazın ise tarlada yapılmaktadır. Türkiye; dünya domates üretiminde Çin, Hindistan ve ABD'den sonra dördüncü sırada yer almakta olup; Dünya taze domates üretiminin %8'e yakını Türkiye tarafından karşılanmaktadır (Keskin 2012; FAO 2014).

2016 verilerine göre Türkiye'de 12.615.000 ton domates üretilmekte ve bunun 8.170.000 tonu sofralık,4.445.000 tonu ise salçalık üretimi içermektedir (TUİK 2016).

Türkiye'de domates, üretim, tüketim ve ekonomideki değeri bakımından sebzeler içerisinde ilk sırada yer almaktadır. Domates, yetiştirme yapılan bölgelerde çiftçilerin önemli gelir kaynaklarından birisini oluşturmaktadır (Çelik ve Özbay, 2015).

Dünya nüfusuna yetecek gıda maddeleri üretimi, kültür bitkilerinin ekim alanlarının genişletilmesi ve/veya birim alandan alınacak verimi artırıcı çeşitli uygulamalarla gerçekleştirilebilir. Bu amaca ulaşmak için sulama, gübreleme ve toprak işlemenin zamanında yapılması, diğer taraftan kaliteli tohum, yüksek verimli ve dayanıklı çeşitlerin kullanılması, ayrıca verim kaybına neden olan zararlı, yabancı otlar ve hastalıklarla bilinçli bir şekilde mücadele edilmesi gerekmektedir. Bu uygulamalar içerisinde en önemlilerinden birisi demodern bitki koruma yöntemlerinin kullanılmasıdır. Bitki hastalıkları, bitkilerin verim ve kalitesini azaltmakta, aynı zamanda ham maddesi tarım ürünlerine dayalı endüstriyel üretimi de olumsuz etkilemektedir (Döken vd 2000).

Bitkilerde canlı ve cansız faktörlerden kaynaklanan verim kayıpları söz konusudur. FAO tarafından yayınlanan istatistiklere göre tarla ve depo şartlarında dünya tarım ürünlerinin her yıl en az %20'lik bir kısmı böceklerden ve %12'lik bir kısmı ise bitki

hastalıklarından dolayı kaybedilmektedir (Agrios 2005). Bu oran az gelişmiş veya gelişmekte olan ülkelerde daha fazladır. Verim ve kalite üzerine olumsuz etki eden biyotik faktörler arasında; hastalık etmeni olarak bilinen patojenler (fungus, bakteri ve virüs), zararlılar olarak bilinen hayvansal organizmalar (böcekler, akarlar, nematodlar, salyangozlar, sümüklü böcekler, kemirgenler, memeliler ve kuşlar) ve yabancı otlar sayılabilir. Hastalık, zararlı ve yabancı otlar, kültür bitkilerinde %25-30'a varan bir ürün kaybına neden olmaktadır. Yapılan araştırmalar, bitki hastalıklarına %60-75 oranında fungus ve bakteriler, %10-15 oranında virüs ve viroidler, %10 oranında ise diğer patojenler ve çevresel faktörlerin sebep olduğunu göstermektedir (Agrios 2005).

Domateste pek çok bakteriyel, fungal ve viral hastalık faktörleri önemli ürün kayıplarına neden olmaktadır. Bunlar kısaca aşağıda sıralanmıştır:

Fungal hastalıklar; domates mildiyösü hastalığı [*Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary], yaprak küfü hastalığı [*Cladosporium fulvum* (Cooke 1883)], domateste kurşuni küf hastalığı [*Botrytis cinerea* Pers. (1974)], külleme hastalığı [*Leveillula taurica* (Lev.) Arm.)], erken yanıklık hastalığı [*Alternaria solani* Ell. & Mart.], kök boğazı yanıklığı hastalığı [*Phytophthora capsici* L.] ve sebze fidelerinde kök çürüklüğü-çökerten hastalığı (*Rhizoctonia*, *Phythium*, *Alternaria*, *Fusarium*ve *Sclerotinia* türleri)'dır. Viral hastalıkları; domates mozayik virüs (*Tomato mosaic Tobamovirus*), hıyar mozayik virüs (*Cucumber mosaic Cucumovirus*) domates solgunluk lekeli virüs (*Tomato spotted wilt Tospovirus*)'dır. Bakteriyel hastalıklar ise;bakteriyel benek (*Pseudomonas syringae* pv. t*omato*), stolbur (*Phytoplasma* türleri), domates öz (gövde) nekrozu hastalığı (*Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas mediterranea*, *Pseudomonas cichorii*, *Pseudomonas viridiflava*, *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*, *E. carotovora* subsp. *carotovora* ve *Erwinia chrysanthemi*), domates bakteriyel solgunluk (*Ralstonia solanacearum*), domateste kara leke hastalığı (*Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*) ve domateste bakteriyel kanser ve solgunluk hastalığı (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*)'dır (Scortichini 1992; Saygılı *et al.* 2008).

C. michiganensis subsp. *michiganensis* (Smith) Davis *et al.* (1984)domates bakteriyel solgunluk ve kanser hastalığın etmenidir. *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*); Prokaryota alemi, *Firmicuts* bölümü, *Firmibacteria* takımı, *Microbacteriaceae* familyası, *Clavibacter* cinsi içerinde yer almaktadır (EPPO 2016). *Cmm* dünyanın birçok ülkesinde bulunur (Strider 1967; Chang *et al.* 1992; Gleason *et al.* 1993) ve domatesin en yıkıcı ve önemli patojenlerinden biridir, dünya çapında ciddi ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Gleason *et al.* 1993; Gartemann *et al.* 2003). Türkiye'de ilk kez Bremer *et al.* (1952) tarafından Ankara ilinde saptanmıştır. Domatesin birincil patojeni olmasına rağmen, aynızamanda *Solanaceae* familyasından biber (*Capsicum annuum*) ve patlıcan (*Solanum melongena*) gibi türlerde de hastalığa neden olabilir. Tohum ve toprak kaynaklı bir patojendir ve genellikle bitkiden bitkiye aşılama ve budama gibi kültürel uygulamalarla yayılır.

Enfeksiyona maruz kalan genç fideler hızla solar ve çökerler. Enfekteli gövdelerin iletim demetleri kahverengi bir renk alır. *Cmm* ksilemden parankima ve floem hücrelerine yayıldığı için bitki petiollerinde ve gövdede açık kahverengi sarı çizgiler şeklinde belirti oluşur sonra çizgiler gittikçe koyulaşarak bazen çatlaklar açılır. Eğer *Cmm* açılan yaralardan veya doğal açıklıklardan girdiyse, ilk olarak yaprak lekeleri ile kendini gösteren lokalize olmuş simptomlar ve nekrozlar görülür. Nekroz olan kısım gittikçe genişler, yaprağın ve zamanla bütün gövdenin büzülmesine neden olur. Meyvelerde kuş gözü lekesi olarak bilinen ve taze olarak tüketilen meyvenin pazar değerini düşüren küçük beyaz hale ile çevrili kahverengimsi lezyonlar etmenin lokalize olmuş tipik simptomlarıdır (Çetinkaya ve Yıldız 2007).

Cmm mücadelesi en zor olan patojenlerden biridir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda *Cmm*'e karşı biyolojik mücadelenin alternatif bir yöntem olabileceği belirtilmektedir ve *Cmm*'in önlenmesine yönelik çalışmalarda bakteriyel antagonistlerle biyolojik mücadele çalışmaları dikkati çekmektedir (Umesha 2001; Boudyach *et al.* 2001).

Kültür bitkilerinden optimum düzeyde verim ve kaliteli ürün alabilmenin yolu, bu bitkilerdeki hastalıkların kontrol altına alınmasıdır. Bunun içinde; sorun oluşturan

hastalık etmenlerinin belirlenmesi ve buna bağlı olarak da uygun mücadele yöntemlerinin saptanması gerekmektedir.

Bitkilerdeki hastalık ve zararlılar ile mücadele çoğunlukla geleneksel tarımsal mücadele yöntemleri kullanılmaktadır. Zirai mücadelede kullanılan bu yöntemler; karantina tedbirleri, kültürel tedbirler, fiziksel mücadele, mekaniksel mücadele ve kimyasal mücadeledir. Ancak çoğu zaman bu yöntemlerin pek çoğu, yetersiz kalmaktadır. Bu durum dikkate alınarak, tarımsal üretimde sentetik gübreler ile bitki beslenmesi ve kimyasal pestisitler ile bitki koruma uygulamalarını yasaklayan yeni tarım politikaları (sürdürülebilir veya organik tarım) geliştirilmiştir. Organik tarım sisteminde hastalık ve zararlıların engellemesinde biyolojik mücadele oldukça fazla ilgi görmeye başlamıştır (Çakmakçı ve Erdoğan 2005).

Bitki beslemede insan ve çevre sağlığı için olumsuz endişeleri azaltmak ve bitki hastalıklarını kontrol etmek için etkili yöntemlere gerek vardır (Kotan 2002; Çakmakçı ve Erdoğan 2005). Hatta gelişmiş ülkelerin pek çoğunda önümüzdeki 10 yıllık süreçte tarımda kademeli olarak kimyasal pestisit ve gübre tüketiminin %10 düzeyinde azaltılması; bitki besleme ve hastalık-zararlı kontrolünde kullanılan biyolojik ürünlerin %20 düzeyinde artırılması öngörülmüştür (O'Brien *et al.* 2009).

Bitkilerdeki hastalık, zararlı ve yabancı otların faaliyetlerine engel olmak için, farklı organizmaların veya bunların oluşturduğu toksik metabolitlerin kullanılması şeklinde tanımlanan biyolojik mücadelede, kimyasal mücadeledeki olumsuzluklar bulunmamasına rağmen bu yöntemin de uygulanabilirliğini kısıtlayan çeşitli faktörler bulunmaktadır. Bu faktörlerin başında biyolojik mücadelede kullanılabilecek etmenlerin belirlenmesi, bunların kitle halinde düşük maliyete üretilebilmesi ve daha da önemlisi doğada hedeflenen etmeni etkin bir şekilde kontrol edebilmesi gelmektedir. Kimyasal ilaçların kullanım oranını azaltmak için biyolojik mücadele konusundaki gelişmelere ve araştırmalara önem verilmesi gerekmektedir.

Bitki bakteri hastalıklarının mücadelesinde kültürel önlemler olarak dayanıklı çeşit kullanımı sınırlı olup; kullanılan kimyasalların insan ve hayvan sağlığı ile çevre üzerindeki olumsuz etkilerinin her geçen gün daha iyi anlaşılmış olup; bu durum tarımsal mücadele stratejileri içerisinde biyolojik mücadelenin önemini daha da artmıştır (Kotan *et al.* 2009). Aşırı ve bilinçsiz kullanım sonucu artan kimyasal pestisit ve gübrelerin tüketiminin yol açtığı sorunların başında, canlılarda doğum anormallikleri, kanser, toksik maddelere bağlı çevre kirliliği, sinir sistemi zararları, ilaca karşı oluşan direnç ve faydalı faunanın yok edilmesi sayılabilir (Tiryaki vd 2010).

Tarımda bitkisel üretim açısından elde edilen ürünlerde kantite yanında kalite bakımındanda artışlar sağlamak amacıyla günümüzde farklı girdiler kullanılmaya başlanılmıştır. Ancak bu girdilerin insan ve çevre sağlığı açısından önemli sorunlar yarattığı bir gerçektir. Sitokininler, giberalinler ve oksinler gibi hormon üretimiyle bitki büyümesini teşvik eden rizobakterilerin (PGPR), bitki kalitesinde ve gelişimindeki etkileri doğrudan ve/veya dolaylı olmak üzere iki grupta açıklanmaktadır. Doğrudan mekanizmalar, biyolojik azot fiksasyonu ve sitokininler,oksinler, gibberalinler gibi bitkisel hormonların üretilmesi, aminosiklopropan karboksilat deaminaz (ACCD) enzim aktivitesi yoluyla etilen sentezinin engellenmesi, bitki-bakteri ilişkisinde uyum, çevresel stresi azaltma, siderofor üretimi yoluyla demir alımının artırılması ve diğer bazı elementlerin oranında artış sağlama, inorganik fosforun çözünürlüğünün artırılması ve organik fosfor bileşiklerinin mineralizasyonu, kök geçirgenliğini artırma ve vitamin sentezi etkilerini içermektedir. PGPR'ların dolaylı şekil de antibiyotik üretimi ile hastalıkları azaltan biyokontrol ajanları olarak rol almaları yanında değişik organik bileşiklerle kirlenmiş olan topraklarda engelleyici ksenobiyotikleri parçalayarak bitkileri koruya bilmektedirler (Elsheikh and Elzidany 1997; Esitken *et al.* 2003a,b; Çakmakçı 2006).

Biyogübre veya biyokontrol ajanlarının tarımda kullanılması 1990'lı yıllardan sonra yaygınlaşmıştır. Son yıllarda biyolojik gübrelemenin kapsamı genişlemiş olup serbest yaşayan, bitkisel gelişimi teşvik eden, biyolojik savaş ajanı veya biyogübre olarak kullanılan PGPR'ların önemi artmıştır. Söz konusu bakteriler *Pseudomonas*,

Agrobacterium, *Serratia*, *Xanthomonas*, *Bacillus*, *Azospirillum*, *Enterobacter*, *Burkholderia*, *Erwinia*, *Rhizobium*, *Azotobacter*, *Alcanigenes*, *Arthrobacter*, *Acetobacter*, *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Artrobacter*, *Flavobacterium*, *Klebsiellla*, *Rhodobacter*, *Clostridium*, *Rhodospirrilum*, *Aerobacter* ve *Micrococcus* cinslerindeki bakterileri içermektedir (Rodriguez and Fraga 1999; Bloemberg and Lugtenberg 2001; Esitken *et al.* 2003).

PGPR'lar genellikle kök sisteminde kolonize olarak bitki gelişimini düzenlemekte ve zararlı rizosfer mikroorganizmalarını baskı altında tutmaktadırlar. Kök gelişimi, tohum çimlenmesi ve bitkinin sudan yararlanmasına da çok önemli katkılar sağlamaktadırlar. Bu bakteriler büyüme hormonlarını üreterek ve faydalı mikrorganizmalar lehine rizosferde mikrobiyal dengeyi değiştirerek doğrudan veya mineral madde oranını düzenleyerek dolaylı olarak bitki gelişimini etkileyebilmektedir. Bakteri, fungal ve nematod hastalıkları geniş ölçüde baskılamakta, ayrıca viral hastalıklara karşıda koruma sağlamaktadırlar (Siddiqui 2006).

Biyolojik ilaçlar, kimyasal pestisit risklerini azaltabilen doğal pestisit grubu olup; mikroorganizma (bakteri, virüs, fungus ve protozoa), endopatojenik nematodlar, yararlı böcekler, yabancı ot patojenleri, bitkisel ve hayvansal kaynaklı maddeler ileçeşitli mineraller vb. birçok doğal maddeden oluşan ürünlerdir (Sesan and Oprea 1999). Biyolojik mücadele olarak da tarif edilen bu yöntemde amaç; doğal ya da genetik modifiye organizmalar ve bunların ürettikleri metabolitler kullanılarak patojen veya zararlıların ortadan kaldırılması veya popülasyonlarının baskı altına alınmasıdır. Biyolojik mücadelenin mekanizmaları; antibiyosis, rekabet, çapraz korunma, uyarılmış dayanıklılık, hipovirulens ve hiperparazitizmadır (Kotan *et al.* 2009).

Antibiyosis, herhangi bir organizmanın antibiyotik veya benzeri metabolitler salgılayarak başka bir organizmayı engellemesi ya da yıkıma uğratması olayıdır. *Gliocladium*, *Bacillus*, *Trichoderma* ve bazı fluoresan *Pseudomonas*'lar antibiyotik ve benzeri metabolitler salgılayarak patojenleri engelledikleri, ancak özellikle bitkisel ürünlerin doğrudan tüketilen organları üzerinde antibiyotik üretimine dayalı bir

biyolojik savaşın, ilaçlı savaşın taşıdığı tüm sakıncaları taşıyabileceği, bu nedenle bu mekanizma ile çalışan biyolojik mücadele sistemlerinin dışlanmaya başlandığı belirtilmektedir (Kotan ve Şahin 2002; Kotan *et al.* 2009).

Diğer bir mekanizma olan yer ve besin elementleri açısından rekabet, biyolojik savaş bağlamında en sorunsuz mekanizmalardan biri olarak ön plana çıkmaktadır. Rekabet, yeterli kaynağın bulunmadığı ortamlarda iki veya daha fazla organizma arasındaki ortamdan yararlanma üstünlüğü olarak tanımlanmaktadır. Mikroorganizmalar arasındaki rekabet; azot, demir, karbon, karbonhidrat, mikro besin elementleri, oksijen, yer ve ışık için söz konusu olabilmektedir. Biyokontrol ilişkide bu besin elementlerinden karbon ve demir büyük önem arzeder.İster besin için, ister yer için olsun antagonist-patojen yarışmasında biyolojik mücadelenin başarısını belirleyen öncelikli faktör antagonistin hızlı çoğalması ve konukçuda hızlı kolonize olmasıdır. Bu bağlamda fluoresan *Pseudomonas*'lar antagonistlerin eşsiz bir grubunu oluştururlar. Bunların yarışmacı özellikleri bitki hastalıklarıyla biyolojik savaşta yepyeni açılımlar yaratmıştır. Gerçekte de Campbell, 20 yıl öncesinden bile bitki hastalıklarıyla biyolojik mücadelenin geleceğini fluoresan *Pseudomonas*'ların belirleyeceğini öngörmüştür (Kotan ve Şahin 2002; Kotan *et al.* 2009).

Çapraz korunma ise, bir bitkide herhangi virulent bir patojenin bu patojenle akraba olan zayıf virulent bir strainle önlenmesine yönelik çalışmaları içermektedir. Bu mekanizma ile sağlanan biyolojik savaşın en önemli ve başarılı örneği, turunçgillerde tristeza hastalığına karşı etmenin hipovirulent ırklarıyla yapılan çapraz bulaştırmalarda ağaçların hastalıktan korunabilmesidir (Saygili*et al.* 2008).

Bitki hastalıklarıyla biyolojik mücadelede son yılların en önemli araştırma konusu konumuna gelen uyarılmış dayanıklılık da; uyarılmış sistemik dayanıklılık (ISR) bitkideki dayanıklılık mekanizmasının patojen olmayan rizobakter izolatlarının köklerde kolonize olması ile tetiklenmesi, sistemik kazanılmış dayanıklılık (SAR) ise dayanıklılık mekanizmasının nekrotik patojenler tarafından tetiklenmesidir (Saygili*et al.* 2008).

Biyoajanların, patojeni uygulamadan önce uygulanması ISR'a yol açar (Pozo *et al.* 1996; Pozo *et al.* 1998; Pozo *et al.* 1999; Hammer-Schmidt 1999; Pozo *et al.* 2002; Mohammadi and Kazemi 2002; Thangavelu *et al.* 2003; Falahian *et al.* 2007).

Bitkiler, çeşitli koruyucu mekanizmalarını aktifleştirme ile patojen çoğaltılmasını ve yayılmasını engelleyerek, patojen saldırısına veya elisitör uygulamasına cevap verirler (Malolepsza and Rózalaska 2005). Savunma mekanizmaları; reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi (De Gara 2003), hücre duvarı yapısında değişiklikler, sekonder metabolitler birikimi (Benner 1993; Agrios 2005), savunma peptidlerin ve proteinlerin aktivasyonu ve/veya sentezi (Fontes 2005) dahil olmak üzere birkaç gruba ayrılır.

Polifenol oksidazlar (PPO) ve peroksidazlar (POX) en önemli savunma gen ürünleri arasında yer almaktadır. PPO'lar nüklear kodlanmış, plastide lokalize bağımlı bakır metalloenzimlerdir ve oksijene bağlı o-dihydroxyphenols oksidasyonunu daha toksik o-kinonlara katalize ederler (Mayer and Harel 1991). Yapılan bir çalışmada domates yapraklarına lokalize olan *Pseudomonas syringae* inoküle edilince PPO aktivitesinin arttığı ve *P.syringae*'nin enfeksiyonunun sistemik bir dirençliliğe yol açtığı bildirilmiştir (Stout *et al.* 1999). Tyagi *et al.* (1998; 2000) buğdayların *Alternaria triticina* ile enfekte olduğunda PPO ve POX'ni yüksek aktivitelerini rapor etmişlerdir.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda *Cmm*'e karşı biyolojik mücadelenin alternatif bir yöntem olabileceği belirtilmektedir ve *Cmm*'in önlenmesine yönelik çalışmalarda bakteriyel antagonistlerle biyolojik mücadele çalışmaları oldukça dikkat çekmektedir (Umesha 2001; Boudyach *et al.* 2001; Akat ve Özaktan 2011; Aksoy *et al*. 2017; Singh *et al*. 2017; Takishita *et al*. 2018).

Domateste görülen bakteriyel hastalıklar içerisinde, domates bakteriyel solgunluk ve kanser hastalığı (*Cmm*) son yıllarda Türkiyede de yer yer ciddi verim kayıplarına sebep olmaktadır.

Yapılan bu çalışma ile; daha önce yürütülen çeşitli araştırmalarda kültür ve yabani bitkilerin toprak üstü aksamı veya kök rizosferinden izole ve Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümünde Mikroorganizma Kültür Kolleksiyonunda muhafaza edilen bakteri izolatı kullanılarak bu izolatları *in vitro* ve *in vivo* test sonuçlarına göre seçilen bakterilerden biyoformülasyonlar oluşturularak domateste *Cmm*'in neden olduğu solgunluk ve kanser hastalığının biyolojik mücadelede imkanlarının araştırılması, amaçlanmaktadır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Domates bakteriyel solgunluk ve kanser hastalığı ilk defa 1909 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nin Michigan eyaletinde domates üretim alanlarında görüldüğü ve hızlı bir şekilde ABD'de bulunan diğer eyaletlere yayıldığı belirtilmiştir (Bryan 1930). Yapılan araştırmalarla Kuzey Amerika'da 1930, 1960 ve 1980 yıllarında, Avrupa ülkelerinde 1922-1965 yıllarında ve Afrika'da da 1942 yılında şiddetli epidemilerin meydana geldiği ortaya konulmuştur (Stride 1969; Gleason *et al.* 1993). Avrupa ve Akdeniz Bitki Sağlığını Koruma Örgütü (EPPO) tarafından domates bakteriyel solgunluğu hastalığının dünyada domates üretiminin yapıldığı hemen hemen her yerde görüldüğü bildirilmiştir (EPPO 2016). Uzun mesafeli yayılışı enfekteli tohum ve fideler ile olduğu için hastalıksız bölgelere yayılmasını önlemek amacıyla EPPO ve diğer birçok ülke tarafından karantinaya tabi tutulmuştur (EPPO 2016; Eichenlaub *et al.* 2006). Türkiye'de ise bakteriyel solgunluk ve kanser hastalığının varlığı Tokgönül (1998)'ün bildirdiğine göre ilk olarak İç Anadolu Bölgesi'nde, daha sonra Güney Doğu Anadolu, Marmara ve Ege Bölgesi'nde tespit edilmiştir. Daha sonra yapılan çalışmalarda Doğu Akdeniz (Çınar 1980), Batı Akdeniz (Basim vd 2004) ve Doğu Anadolu (Şahin vd 2002) bölgelerinde domates üretim alanlarında solgunluk hastalığı tespit edilmiştir.

Patojenin yapay inokülasyon ile biber ve diğer patlıcangillere bulaşabildiği, ancak *Cmm*'nin domates dışındaki konukçularda ciddi sistemik enfeksiyonlara neden olmadığı, bununla birlikte, diğer patlıcangilleride hastalandırabileceğinden bahsedilmiştir (Thyr *et al.* 1975; Ivey and Miller 2000). Stamova ve Sotirova (1987) *Cmm*'nin kök kısmına yapay aşılama ile buğday, arpa, çavdar, yulaf, ayçiçeği, karpuz ve salatalık gibi bitkilerde de enfeksiyon oluşturabildiğini rapor etmişlerdir.

Yapılan çalışmalarda; dünya çapında ılıman bölgelerde ve seralarda önemli hastalıklardan biri olarak kabul edilen *Cmm*'in neden olduğu solgunluk hastalığının ilk simptomlarının; yapraklarda marjinal nekroz ve lekeler halinde, saplarda ve pedinküllerde ise kahverengi veya gümüş çizgiler veya noktalar halinde olduğu belirtilmiştir (Bryan 1930; Gleason *et al.* 1993). Solgunluğun domates bitkisinin

yalnızca tek yönlü sürgün ve yaprakçıklarında görülebilmesine rağmen hastalığın sistemik bir hastalık olduğu ve bakterilerin ksilem ve floem iletim demetlerinde iki farklı yönde yayıldığı vurgulanmıştır. Enfeksiyon ilerledikçe bakterinin meyve ve tohuma ulaştığı ve solgunluğun kısa bir süre sonra kurumaya dönüştüğü belirtilmiştir. Enfeksiyon başlangıcında sürgünün boyuna kesilip incelenmesi sonucunda iletim demetlerinin ince bir çizgi şeklinde sarı renk aldığı görülmüş, ana sapta vasküler renklenmenin enfeksiyonun geç aşamalarında göze çarptığı tespit edilmiştir. Etmenin ileri devrelerde gövde ve sürgünlerde yara ve çatlaklara neden olduğu, meyvelerde ise ortası açık kahverengi, çevresi beyaz haleli ve kuş gözü olarak tanımlanan lekeler oluşturduğu, bu lekelerin hem olgunlaşmamış hem de olgunlaşmış meyvelerde görüldüğü belirtilmiştir (Bryan 1930; Gleason *et al.* 1993).

Domates bakteriyel solgunluk ve kanser hastalığının bitkinin solması, ölümü ve meyve lezyonları, meyve bağlama ve büyüklüğünde azalma sonucu verim kayıplarına neden olduğunu belirten Strider (1969), şiddetli epidemilerde verim kaybının %80'lere varabileceğini bildirmiştir.

Hastalık etmeni, Erwin F. Smith tarafından ilk olarak *Bacterium michiganense* daha sonra *Aplanobacter michiganense* olarak isimlendirmiştir (Gleason *et al.* 1993). Zaman içerisinde *Pseudomonas michiganensis, Phytomonas michiganensis* ve *Mycobacterium michiganensis* olarak; terminolojik isimlendirme kabul edildikten sonra ise yaklaşık 50 yıl *Corynebacterium michiganense* şeklinde adlandırılmıştır. 1980'lerde patojenin hücre duvarı yapısı ile ilgili yeni bilgilere dayanılarak *Clavibacter* sınıfı içerisinde yeniden sınıflandırma yapılmış ve etmen *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* olarak isimlendirilmiştir (Gleason *et al.* 1993). *Clavibacter*, 5S rRNA dizi analizine göre *Microbacteriaceae* familyası içerisinde yer almaktadır (Park *et al.* 1993; Agrios 2005). *Clavibacter* cinsinde *Clavibacter michiganensis* tek tür olup konukçu alanına göre *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* (domateste) (Strider 1969; Davis *et al.* 1984); *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* (patateste) (Manzer and Genereux 1981); *C. michiganensis*subsp. *nebraskensis* (mısırda) (Schuster 1975); *C. michiganensis* subsp. *tessellarius* (buğdayda) (Carlson *et al.*1982) ve *C. michiganensis* subsp. *insidiosus*

(yoncada) (McCulloch 1925) olmak üzere beş alttüre ayrılmıştır (Jahr *et al.* 1999; Burger and Eichenlaub 2003). *C. michiganensis* alttürleri içerisinde *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* ve *C. michiganensis* subsp. *insidiosus*'un pek çok ülkede de karantinaya tabi olduğu belirtilmiştir (Jahr *et al.* 1999; Eichenlaub *et al.* 2006).

Gram pozitif, çubuk şeklinde, hareketsiz ve aerobik büyüme kabiliyetine sahip bir bakteri olan *Cmm*'nin, Nutrient Agar (NA) besi yerinde tipik parlak sarı etrafı düz koloni, Yeast Extract-Dextrose-Calcium Carbonate (YDC) besi yerinde koyu sarı, etrafı düz koloni, Serum-Containing-Medium (SCM) besi yerinde koyu gri etrafı açık renk haleli kolonive King B besi yerinde ise sarı koloni şeklinde gelişim gösterdiği kaydedilmiştir (ÇetinkayaveYıldız 2007;Shaker 2014).

Carlton *et al.* (1998) diğer bitki patojeni bakterilerde olduğu gibi, *Cmm*'nin de yaralar, doğal açıklıklar, stoma ve hidatodlar yoluyla bitkiye giriş yaptığını, hidatodların hücre arası boşluklarında hızlı bir şekilde çoğalmaya başladığını, daha sonra yaprakta kenar damarlara girerek orada yayıldığını ve marjinal nekroz meydana getirdiğinibelirtmişlerdir. Yapılan çalışmalarda aşılama ve budama gibi tarımsal uygulamaların hastalığın yayılmasını kolaylaştırarak patojenin damar dokusuna doğrudan girmesine ve bitkinin hızlı solmasına neden olduğu vurgulanmış, meyvenin aynı zamanda sistemik olarak damar sistemi ile enfekte edildiği bildirilmiştir (Strider 1969; Gleason *et al.* 1993). Uematsu *et al.* (1977) tohum enfeksiyonunun meyve çanak yarası ve iletim demetleri yoluyla olabileceğini tespit etmişler, Tsiantos (1987) ise *Cmm* ile enfekte olan tohumun, epidemi için önemli bir kaynak olduğunu belirtmiştir. Vejetasyon periyodu sonunda bakterinin bitki artıklarında kışladığı ve topraktaki bitki artıklarında iki yıldan fazla yaşayabildiği tespit edilmiştir (Fatmi and Schaad, 2002). Patojenin yapay aşılama ile biber ve diğer patlıcangillere bulaşabileceği ancak domates dışındaki konukçularda ciddi sistemik enfeksiyonlara neden olmadığı yapılan çalışmalarda belirtilmiştir (Thyr *et al.* 1975; Ivey and Miller 2000).

Yapılan çalışmalarda *Cmm*'nin endofit olduğunun bilindiği, yaralardan veya doğal deliklerden giriş yaptığı ve sonra ksileme doğru hareket ettiği belirtilmiştir (Carlton *et*

al. 1998; Gartemann *et al.* 2003). Budama, hasat, nakliye ve dikim sırasında açılan yaraların, *Cmm*'in doğrudan damar dokusuna yayılmasını teşvik ettiği tespit edilmiştir (Chang *et al.* 1991). *Cmm*'in neden olduğu solgunluk mekanizması için çeşitli hipotezler ileri sürülmüş, yapılan çalışmalarda hücre dışı polisakkaritlerin (EPS) önemli bir virülans faktörü olarak kabul edildiği, yüksek molekül ağırlıklı EPS'nin ksilemde biriktiği ve su taşımasına engel olduğu belirtilmiştir (Rai and Strobel 1968). Ayrıca, saflaştırılmış EPS'nin *in vitro* çalışmalarda domates fideleri üzerinde fitotoksik olduğuda kanıtlanmıştır (Van den Bulk *et al.* 1989). Bermpohl *et al.* (1996), *Cmm* suşlarının EPS'in fruktoz, galaktoz, glukozdan (mol oranı 2:1:1) oluşmasının patojenite için önemli olduğunu, bunu az üretenlerin kolonizasyonda başarısız olduklarını ve EPS'in kimyasal yapısının konukçunun erken tanımasında etkili olabileceğini tespit etmişlerdir. Son yıllarda yapılan *Cmm*'in moleküler çalışmalarında, patojenisitenin mekanizması daha iyi aydınlatılmış, *Cmm*'nin genomunun (NCPPB382) boyut olarak 3,298 Kb olduğu ve%72,6 yüksek bir G + C içerdiği bildirilmiştir (Gartemann *et al.* 2008). Araştırmacılar tarafından iki büyük plazmit olan pCM1 (27.5 Kb) ve pCM2 (70 Kb)'nin hastalık oluşturma için gerekli olan genleri taşıdığı ve bu plazmidlerden herhangi biri olmadan solgunluk oluşmasının gecikebileceği ve domates bitkilerinde *Cmm*'nin kolonize olmasına rağmen belirti göstermediği tespit edilmiştir (Meletzus *et al*, 1993). Dreier *et al.* (1997) *Cmm*'e özgü olan ve virülanslığı kodlayan ilk genin*pat1* olduğunu ve bunun pCM2 plazmid üzerinde olduğunu bildirmişlerdir.Yapılan çalışmalarda;İ*Pat-1* ORF tarafından kodlanan proteinin bir 29.7kDa serin proteaz olduğu ve pek çok gen *pat-1* ile homologlarının, domates-*Cmm* etkileşiminde rol oynadığı, bunların da pCM1 ve kromozomda bulunduğu ortaya konulmuştur (Burger *et al.* 2005; Stork *et al.* 2008). Jahr *et al.* (2000) bir diğer gen olan *celA* geninin, pCM1 üzerinde bulunduğunu ve patojenite için gerekli olduğunu, *CelA*'nın 78Kda ağırlığındaki bir proteini kodladığını ve bu proteinin selülaz ailesinden endo-β-glukanaza benzediğini vurgulayarak, CelA'nın ksilem demeti duvarlarını tıkamak yoluyla patojeniteye katkıda bulunduğunu ve bakterilerin yakın dokulara yayılmasını sağladığını tespit etmişlerdir. Yapılan çalışmalarda *Cmm* tarafından üretilen pektinmetilesteraz, poligalakturonaz ve ksilanaz gibi hücre dışı enzimlerin olduğu, bunların hücre duvarı bozulmasında rol oynadığı belirtilmiştir (Strider 1969; Beimen *et al.* 1992).

Seralarda fide üretimi yapılan koşulların bakteriyel enfeksiyon için uygun ortam sağladığı, değişik sıcaklıkların (15-28°C) hastalığın gelişmesinde etkisinin olmadığı, ancak yüksek nemin (%87-97) 2-3 haftalık domates fidelerinde belirtileri arttırdığı da ortaya konulmuştur (Basu 1966).

Hem taze pazar tüketimi hem de işleme domates üretimi için fidelerin, genellikle dikimden önce 4-6 hafta boyunca seralarda üretildiği, *Cmm* ile enfekteli tohumlardan simptomsuz fidelerin oluşabileceği veya epifitik olarak patojeni taşıyabileceği de yapılan çalışmalarda ortaya konulmuştur (Tsiantos 1987; Gitaitis *et al.* 1991; Shirakawa *et al.* 1991). Tsiantos (1987) yaptığı çalışmada yapay-enfekte tohumlardan yetiştirilen fidelerin 10^4-10^8 kob/fide ile kontamine olduğunu, Shirakawa *et al.* (1991) ise doğal olarak enfekte olan tohumlardan yetiştirilen fidelerin sürgünlerinde 10^3-10^4 kob/g patojenin olabileceğini tespit etmişlerdir.

Thyr *et al.* (1973) domates tohumlarının, %0.6'lık HCl ile 30-45 dakika muamelesinden sonra 66°C'de 3 saat süreyle kurutulmasının sistemik bulaşık domates tohumlarında bulunan *Cmm*'yi elemine ettiğini tespit etmişlerdir.

Fidelerin sık dikilmesi durumunda herhangi bir epifitik patojenin kolayca sulama ve temas yoluyla yayılabileceği, ancak bu konunun *Cmm* epidemiyolojisinde önemli olmasına rağmen *Cmm*'in tohumdan fideye iletim mekanizmasının iyi anlaşılmadığı da yapılan bir çalışmada belirtilmiştir (Xu *et al.*2010).

Antoniou *et al.* (1995) tarafından yapılan bir çalışmada 5-6 haftalık solarizasyon uygulamasının plastik seralarda domates bakteriyel solgunluk hastalığını önemli ölçüde azalttığı rapor edilmiştir.

Solarizasyon uygulamasının plastik tünelde 5 ve 30 cm, cam serada 15 cm derinliklerde patojene zayıf etkide bulunduğu saptanmış, doğal koşullarda yapılan çalışmalarda ise toprak solarizasyonun tek başına bir yıl uygulamasının etkili olmadığı, aynı yerde ikinci

yıl uygulandığı zaman ise etkisinin %55 oranında arttığı bildirilmiştir (Tokgönül *et al.*1997).

Tarımsal kayıplara neden olan *Cmm*'in toprakta hayatta kalabilmesi için bitki materyalinin olması gerektiği ve *Cmm* enfeksiyonlarını azaltmak için enfekteli bitkilerin imha edilmesinin ayrıca sertifikalı tohum kullanımının önemli olduğu belirtilmiştir (Chang *et al.* 1991; Mansfeld-Giese 1997).

Yapılan bir çalışmada, *Cmm*'yi tohumlardan uzaklaştırmak için 20°C'de 96 saatlik fermentasyonun gerekli olduğu ve 0.6 M HCl'e 1 saat daldırma uygulamasının ya da %0.05 hidroksidifenil ile 15 dakika muamelenin fidelerde solgunluk hastalığı yoğunluğunu, 15 dakika %0.6 NaOH uygulamasından çok daha fazla oranda azalttığı vurgulanmış, yapay olarak bulaştırılmış bir tohum lotunun 0.6 M HCl içinde bir saat ıslatılmasının fidelerde solgunluk hastalığı simptomlarını %0.1 ile %38 oranında azalttığı saptanmıştır (Dhanvantari 1989).

Özaktan (1991) yaptığı bir çalışmada; tarla koşullarında sıcak su (54-56°C'de 20 dk) uygulamasının %94, antagonist uygulamasının %75 ve kuru sıcaklık uygulamasının %40 oranında etki gösterdiğini tespit etmiştir. Araştırmacı civa klorür (30 µg/ml) ve kuru sıcaklık uygulamalarının tohum çimlenmesine toksik olduğunu ve bakterilerin kısa sürede streptomisine (300 µg/ml) direnç kazanma ihtimalini göz önüne alarak sadece sıcak su uygulamasını önermiştir.

Bitkilerde zararlı olan birçok fungus ve böceklere karşı mücadelede etkili olan insektisit ve fungusit geliştirilmiştir. Ancak, bitki patojeni bakteriler için geliştirilmiş bakterisit bulunmamaktadır. Bitki patojeni bakterilere karşı tıp ve veterinerlikte kullanılan bazı antibiyotikler etkili bulunmakta, ancak antibiyotiklerin pahalı oluşu, dayanıklılık kazandırması ve insan-hayvan-çevre sağlığı yönünden sorunlar yaratacağı düşüncesi ile Türkiyede tarla ve sera koşullarında kullanılması yasaklanmıştır (Kotan 2002).

Bakteriyel hastalık etmenlerine karşı kullanılan antibiyotiklerin ve bakırlı bakterisitlerin, domates bakteriyel kanserine karşı başarılı olmadığı, bu hastalık etmenine karşı dayanıklı domates çeşitlerinin bulunmadığı ve sonuç olarak temiz tohum kullanmanın ve gen aktarılmış bitkilerin hastalığın giriş ve yayılmasını en aza indirmek için en uygun yöntemler olduğu Jahr *et al.* (1999) tarafından yapılan çalışmada ortaya konulmuştur. *Cmm*'in tohum üzerindeki bir yüzeyde aynı tohum kabuğu altındaki gibi kontaminasyon yapabildiği belirtilen çalışmalarda (Bryan 1930; EPPO 2005) tohuma etmenin bulaşma oranının %1 ila 5 arasında değiştiği (Bryan 1930), ancak, tohumdan fideye bulaşmanın %0.01 olması halinde bile uygun koşullarda hastalığın epidemi yapabileceği bildirilmiştir (Chang *et al.* 1991).

Çınar (1978), yapay besi yerlerinde püskürtme şeklinde kullanılan ilaçların ve bazı antibiyotiklerin *Cmm*'yi engelleme yeteneklerini araştırmış, etmeni engellemede Streptomisin sülfat (100-200 ppm) ve Tetrasiklin HCl (100-200 ppm)'nin oldukça etkili olduğunu bildirmiştir.

Bakır asetat, asetik asit, pentakloronitrobenzen, 5-ethoxy-3 (triklorometil),-1,2,4-thidiazol ve Triton x-100 içeren kimyasal solüsyona domates tohumlarını, daldırarak tohumun çimlenmesine zarar vermeden patojenin eredikasyonu araştırılan bir çalışmada; 25°C'de tutulan kimyasal solüsyona 30 dk süreyle daldırılan domates tohumlarından etmenin eredike olduğu ve uygulamanın tohumun çimlenmesinde herhangi olumsuz bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir (Kritzman 1993).

Hausbeck *et al.* (2000) bazı bakterisitlerin *Cmm*'in populasyonunun büyüklüğüne ve hızına olan etkilerini araştırmışlar; yaptıkları çalışmada bakır hidroksit, bakır hidroksit/mankozeb, streptomisin ve streptomisin/bakır hidroksit uygulamalarının $5x10^5$'den küçük *Cmm* populasyonunu sınırladığını bildirmişlerdir. Aynı araştırıcılar, tarlaya şaşırtılan fidelerde patojen populasyonunun 10^8 hücre/gram bitki dokusu miktarına eşit veya daha fazla olduğu için bitkinin canlılığının ve tarladaki ürün miktarının önemli ölçüde etkilendiğini, ayrıca bu uygulamaların hiç birinin inoküleli

kontrol bitkileri ile karşılaştırıldığı zaman meyve lekelerinin şiddetini önemli oranda azaltmaya neden olmadığını saptamışlardır (Hausbeck *et al.* 2000).

De León *et al.* (2008) domatesler üzerinde *in vitro* ve *in vivo* koşullar altında yaptıkları bir çalışmada; *Cmm*'e karşı yedi antibakteriyel maddenin (bronopol, copper sulphate, kasugamycin, oxolinic acid, oxytetracycline, streptomycin ve 8-hidroksi-kinolin), üç ticari formülasyonun (bakır ve civa ihtiva eden bir oligoelement karışım olan Antibak RZ; Orthopol, potasyum sabunu ve bir dirençlilik indüktörü olan Param) ve bunların kombinasyonlarının bakterisidal etkisini test etmişlerdir. Çalışmanın sonucunda, streptomisinin daha az etkili, bakır sülfat ihtiva eden tedavilerin ise büyük ölçüde etkili olduğu ve bakteri püskürtülmüş bitkiler üzerinde hastalık simptomlarının azaldığı tespit edilmiştir. Yarı dozda 8-hidroksi-kinolin ile birlikte bakır sülfat ile muamele gören yaprakların belirti gösteren yüzdesi (%2.4 ve %11.9) kontrol grubuna göre (%75.1 ve %59.6) önemli ölçüde daha düşük olmuş ve sadece bakır sülfat ile aşılanmaya göre daha iyi sonuç vermiştir. Seralarda bu hastalığın dış belirtilerinin kontrol edilmesinde 8-hidroksi-kinolin ile bakır sülfatın karışımı etkili bulunmuş ve bakır miktarının azaltılmasının çevre için faydalı olduğu sonucuna varılmıştır (De León *et al.* 2008).

Yogev *et al.* (2009) yaptıkları çalışmada, sığır veya tavuk gübresi kombinasyonları ile kompostların, domates veya biber kalıntılarına göre bu hastalığı %79 ve %100 arasında azalttığını, *Cmm*'in popülasyonunun kompost içinde 15-20 günde azaldığını ancak, torfta bu populasyonun 35 ile 40 gün boyunca yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Benzer şekilde, kompost ile büyüyen domateslerde, bitki dokularında patojen tarafından (%0-20 kolonizasyon) kolonizasyonun azaldığı, torf (%53-90 kolonizasyon) veya perlitte (%30-90 kolonizasyon) ise kolonizasyonun komposta kıyasla daha fazla olduğunu belirlemişlerdir. Aynı araştırıcılar, bitki kalıntılarından oluşan kompostların *Cmm* populasyonunu bastırabildiği için entegre yönetim programlarında faydalanılabileceğini bildirmişlerdir.

Utkhedeve Koch (2004)'un *in vitro* şartlarda lizozim enzimini *Cmm*'e karşı denedikleri bir çalışmada, 10 g/l dozunun patojeni etkilediğini, ayrıca 10 g/l ve 100 g/l lizozim ile

inoküle edilen domates bitkilerinin kontrol bitkileri ile karşılaştırıldığında belirgin olarak daha uzun olduğunu tespit etmişlerdir.

Solgunluk hastalığına karşı kullanılan üç bakır-esaslı bileşiğin(bakır hidroksit, bakır oksiklorür ve bakır sulfat), iki antibiyotiğin (streptomycin ve kasugamycin) ve bitki aktivatorunün (ASM) önemli derecede patojenin populasyonunu ve gelişimini etkilediği, ancak bakır hidroksit, streptomycin ve ASM'nin daha fazla etki gösterdiği yapılan bir başka çalışmada ortaya konmuştur (Milijašević *et al.* 2009).

Kimyasal gübreler yüksek oranda verimin sağlanması için, tarımsal faaliyetlerde fazla miktarda uygulanmaktadır. Bu tür uygulamaların oluşturduğu olumsuz etkiler, göz önünde bulundurularak detaylı çalışmalar yapılmaktadır. Mineral gübre uygulamalarının toprak profilini bozduğu, yeraltı sularında kirliliğe yol açmakta bilinmektedir. Ayrıca belirli şartlarda da kimyasal bileşiklerin ozon tabakasındaki değişime ve sera etkisine katkı yaptığı da düşünülmektedir. Bunlar sonucunda, çevreye dost ve toprakta ekolojik dengeyi bozmayan tarımsal uygulamalar gerekmektedir.

Bu nedenle tarımsal üretimde verimliliğin arttırılması, toprakların fiziksel ve kimyasal yapısının iyileştirilmesi, insan sağlığının korunması ve çevre kirliliğinin önlenmesine katkıda bulunacak biyolojik ürünlerin (biyopestisit ve mikrobiyal gübre) kullanımının gerekli olduğun artık bilinmektedir. Toprak ve su kaynaklarına daha az zarar veren, tarımsal kimyasallara daha az bağımlı olan çevre dostu stratejilerin kullanılmasına ve sürdürülebilir tarım uygulamalarının yaygınlaştırılmasına duyulan ihtiyaç küresel boyutlardadır. Bunun yanısıra sürdürülebilir tarım uygulamalarının anahtar elementlerinden birisi de, bitki korumada alternatif mücadele yöntemlerinin kullanımıdır (Szekeres 2006).

Bu bağlamada son yıllarda yapılan çalışmalarda *Cmm*'e karşı biyolojik mücadelenin önemli olabileceği belirtilmektedir ve *Cmm*'in önlenmesine yönelik çalışmalarda bakteriyel antagonistlerle biyolojik mücadele çalışmaları dikkati çekmektedir (Umesha 2001; Boudyach *et al.* 2001; Akat ve Özaktan 2011; Aksoy *et al.* 2017)).

Domates fidelerinde *in vitro* ve *in vivo* koşullar altında *Cmm*'ekarşı *Pseudomonas putida* (CKPp9)'nın etkisi test edilmiştir. Çalışmanın sonucunda *P. putida* uygulanan domates fidelerinde kontrole karşı önemli farklılıklar gözlenmiştir ($P < 0.01$). CKPp9 ile fenolik bileşiklerin indüksiyonunu hastalık direnci ile ilişkilendirmek için, domates fidelerinde fenolik bileşiklerin kalitatif ve kantitatif modifikasyonları farklı uygulamalarda gözlemlenmiştir. CKPp9, CmmGo2 ile yapılan uygulamalar kontrolle kıyaslandığında yapılan HPLC analizlerine göre farklı oranlarda klorojenic asit, kafeik asit, katekin ve rutinin varlığını göstermiştir. CKPp9 + CmmGo2 ile işleme tabi tutulan bitkilerde katekinin miktarı belirgin şekilde, CKPp9 ile muamele edilen bitkilere göre ve diğer uygulamalarla kıyasla neredeyse 10 kat daha yüksek bir katekin birikimi gözlemlenmiştir. Domates fidelerinde *Cmm* enfeksiyonuna karşı fenolik bileşiklerin *P. putida* aracılı indüksiyonu biyokimyasal bir bariyer olarak öngörülmektedir (Aksoy *et al.* 2017).

Domates patojeni *Cmm*'e (ATCC 7429) karşı antibakteriyel aktivite nin araştırıldığı başka bir çalışmada rizosferden izole edilen *Bacillus subtilis* DJM-51 kullanılmıştır. Bakterilerin izolasyonu için rizosfer topraklarından numuneler alınmış ve DJM-51 izolatı Nutrient-Broth Yeast ExtractAgar (NBYA) üzerinde *Cmm* (ATCC 7429)'e karşı, test edilmiş inkübasyon süresi sonucunda koloniler çevresinde inhibisyon zonu gözlemlenmiştir. Patojene karşı kullanılan izolatın güçlü antagonistik etkisinin olduğu tespit edilmiştir. 16S rRNA geni ile yapılan sekanslama sonucunda izolat *B. subtilis* DJM-51 olarak tanılanmıştır. *B. subtilis* DJM-51'den elde edilen antibiyotikler *Cmm*'nin gelişmesini engellediği tespit edilmiştir. Bu sonuçlar sera koşullarında potansiyel olarak domatesin patojenden korunması hakkında önemli olduğu bildirilmiştir (Jung *et al.* 2014).

Daferera *et al.* (2003) *Cmm*'e karşı keklik otu, kekik, gazel otu, mercan köşk, lavanta, biberiye, adaçayı ve yarpuz bitkilerinin uçucu yağlarının etkilerini araştırmışlar, besi yeri üzerinde patojenin gelişimini farklı oranlarda (85- 300 µl/ml) engellediğini saptamıştır.

Yapılan başka bir çalışmada *Satureja spicigera, Thymus fallax* ve *Achillea biebersteinii* bitkilerinin uçucu yağları tohum dezenfeksiyonu üzerine etkisi test edilmiş ve bu bitkilerin *Cmm*'e karşı etkili oldukları saptanmıştır (Kotan *et al.* 2010).

ÇetinkayaYıldız ve Aysan (2007) hastalıkla kimyasal mücadeleye alternatif olarak bitki büyümesini teşvik eden rizobakterilerin (PGPR) kullanılma potansiyellerini araştırmışlar, farklı illerden temin edilen 39 farklı toprak örneğinden 499 adet aday PGPR bakteri izolatı elde etmişlerdir. Bu izolatlar arasında en fazla fosforu çözme, azotu bağlama özelliklerine sahip 30 izolat adayı PGPR olarak seçilip, en etkili olan 8 izolatın *Cmm*'nin neden olduğu hastalığı baskılayabilme potansiyellerini *in vivo* saksı çalışmaları ile belirlemişlerdir. Saksı çalışmaları sonucunda 3 izolat ve kombinasyonları ile tohum denemeleri, 2 izolat ve kombinasyonları ile tarla çalışmaları yürütmüşler ve çalışmalarda bitki aktivatörü olan ISR 2000 adlı ticari preparatı PGPR uygulamalarıyla karşılaştırılmak amacı ile kontrol olarak kullanmışlardır. Elde edilen sonuçlara göre; tarla koşullarında PGPR izolatları ile muamele görmüş domates bitkilerinde *Cmm*'nin neden olduğu hastalık şiddetinin ortalama %43 oranında azaldığını ve hastalık etmeninin bulunmadığı koşullarda PGPR izolatlarının bitki büyümesini (bitki boyu, gövde çapı, dal sayısı, bitki yaş ağırlığı ve kuru ağırlığı, kök boyu ve verim) değişen oranlarda artırdığını belirlemişlerdir.

Yapılan başka bir çalışmada *Cmm*'e karşı Ege Bölgesi'nde sağlıklı bitkilerin köklerinden elde edilen toplam 49 adet epifitik ve endofitik antagonist aday bakteri izolatı kullanılmış, testlenen bakteriyel antagonistlerin %40'ı *in vitro* testlerde 2-37 mm arasında değişen inhibisyon zonları oluşturarak *Cmm*'i engellemiştir. *In vitro* test sonuçlarına göre, en etkili antagonistlerin fluoresan Pseudomonaslar olduğu saptanmıştır. 11 bakteri izolatı (S6/2EP, 19a, 2/9, S6/3EP, 11/1, S5/4, 30, 35EN, P.f. Bo, *Serratia*, 51) *in vivo* saksı denemelerinde kullanılmak üzere seçilmiştir. Deneme iki farklı dönemde tekrarlanmış ve ilk deneme sonuçlarına göre, 11 bakteriyel antagonistin dördü domates tohumlarına uygulandığında, pozitif kontrole göre bakteriyel solgunluğu %54-86 oranında engellemiştir. Bu izolatlar, tohum bakterizasyonu uygulamasını takiben şaşırtma sırasında köklere uygulandığında hastalık çıkışını %80-97 oranında

engelleyerek tek başına tohum uygulamasından daha başarılı bulunmuştur. İkinci denemede ise; tek başına tohum bakterizasyonu uygulaması ile hastalık %50-60 oranında engellenirken, şaşırtmadan önce fideye yapılan tohum bakterizasyonu + kök daldırma biçimindeki uygulamada *Cmm'*e karşı %59-74 oranında engelleme saptanmıştır (Akat ve Özaktan 2011).

178 bakteri izolatının *Cmm*'e karşı denendiği başka bir araştırmada; araştırıcılar izolatların hepsinin besiyerinde (NBYA) 2±30 mm arasında değişen inhibisyon bölgeleri ile patojeni inhibe ettiğini, en etkili izolatların gram-negatif ve bunların da çoğunun florasan *Pseudomonas* bakterileri olduğunu kaydetmişlerdir (Boudyach *et al.* 2001). Aynı çalışmada, 24 izolat (ampisilin ve nalidiksik asit dirençli mutantlar) domates köklerini kolonize etme kabiliyetleri için seçilmiş, üçte birinden daha azının (7/24) tüm fidelerin köklerini kolonize ettiği, sadece altı suşun ise fidelerin %50 ana ve yan köklerini kolonize ettiği tespit edilmiştir. Kökte iyi kolonize olan suşların florasan *Pseudomonas* bakterileri olduğu, *Cmm*'in kontrolü amacıyla saksı deneyleri için seçilen onsekiz suşun kontrol ile karşılaştırıldığında, sadece tohum uygulamasında üç suşun enfeksiyonu azalttığı, bakterilerin kök ve tohuma uygulanması durumunda ise tamamen enfeksiyonun azaldığı ve bu kombine uygulamanın daha fazla etkili olduğu bildirilmiştir (Boudyach *et al.* 2001).

Lanteigne *et al.* (2012) yaptıkları bir çalışmada; *Pseudomonas* izolatları *Cmm*'e karşı denemişler, *Pseudomonas*'ın hem hastalığın ilerlemesini hem de rizosferde *Cmm*'nin populasyonunun azalmasını sağladığını, bu etkinin *Pseudomonas*'ın ürettiği hidrojensiyanid (HCN) ve 2,4-diasetilfloroglusinol (DAPG)'dan kaynaklandığını bildirmişlerdir.

Lokal dokularda asibenzolar-S-metil (ASM) uygulamalarının, peroksidaz (POX) ve glutatyon peroksidaz (GPX) oranında önemli bir artışa neden olduğu belirtilen bir çalışmada, bitkilerin önceden ASM ile inoküle edilmesi halinde hastalığın şiddetinin ve aynı zamanda bakterilerin büyümesinin azaldığı, bunun nedeninin ise oksidatif ve

antioksidatif koruma sistemlerinin aktivitesinde artış olabileceği belirtilmiştir (Soylu *et al.* 2003).

Domates bitkilerinde DL-β-Amino bütirik asit (BABA) ile uyarılan direncin *Cmm*'e karşı etkileri araştırılmış. BABA ile aşılanmış bitkilerde 1 gün inokülasyondan sonra kontrol olarak su ile inoküle edilmiş bitkilere kıyasla fenilalanin amonyum-liyaz aktivitesinin, peroksidaz aktivitesinin ve H_2O_2 konsantrasyonunun daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Araştırıcılar, BABA ile inoküle edilen bitkilerde bu enzimlerin ve H_2O_2 konsantrasyonunun artışını *Cmm*'e karşı direnç oluşumunu bağlamışlardır (Baysal *et al.* 2005).

Yapılan bir çalışmada araştırıcılar, cherry çeşidi domates tohumlarının PGPR ile muamele edildiklerinde bakteriyel solgunluk hastalığına karşı daha dayanıklı olduğu saptamıştır. Çalışmanın sonucunda araştırıcılar domateslerde bakteriyel solgunluk hastalığının kontrolünde PGPR'ların kullanılabileceğini bildirmişlerdir (Romero *et al.* 2003).

Takishita *et al*. (2018) yaptıkları bir çalışmada *Pseudomonas* sp. 23S izolatını *Cmm*'e karşı kullanmışlar ve *Pseudomonas*'ın bitkide ISR dirençliğini uyandırarak hastalığın azalmasına sebep olduğunu tespit etmişler. Aynı zamanda bu izolatın siderofor ve IAA üreterek bitki gelişiminde de önemli olduğunu bildirmişlerdir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Çalışmada kullanılan besi ortamları

NA (Nutrient Agar): 23 g NA (Difco) 1 L dH_2O içinde çözülerek pH 7,0'a ayarlandıktan sonra 121°C'de 15 dakika (dk) steril edilmiştir ve 45°C'ye kadar soğutulduktan sonra steril petrilere dökülerek katılaşmaya bırakılmıştır (Lelliot and Stead 1987).

NB (Nutrient Broth): Hassas terazide 8 g NB besiyeri tartılarak (Difco) 1 L dH_2O içerisine ilave edilmiş ve hazırlanan besi yeri otoklavda 121°C'de 15 dk steril edildikten sonra soğumaya bırakılmıştır (Lelliot and Stead 1987). Bu besiyeri genel besi yeri olup bakterilerin geliştirilmesi amacıyla kullanılmıştır.

TSA (Tryptic Soy Agar): Hassas terazide 40 g TSA (Difco) tartılarak 1 L dH_2O içinde çözülmüş, daha sonra karışım 121°C'de 15 dk süreyle otoklav edilmiştir. Steril edilen besi yeri oda sıcaklığında soğumaya bırakılmıştır (Klement *et al.* 1990). Bu besiyeri genel besiyeri olup bakterilerin geliştirilmesi amacıyla kullanılmıştır.

TSB (Tryptic Soy Broth): Hassas terazide 30 g TSB besi yeri tartılarak (Difco) 1 L dH_2O içerisine ilave edilmiş, hazırlanan besi yeri otoklavda 121°C'de 15 dk steril edildikten sonra soğumaya bırakılmıştır (Klement*et al.*1990). Bu besiyeri genel besiyeri olup bakterilerin geliştirilmesi amacıyla kullanılmıştır.

King B (King's Medium B): 20 g Proteos Pepton, 10 ml Gliserin, 1.5 g K_2HPO_4, 1.5 g $MgSO_4.7H_2O$, 15 g Agar, 1000 ml dH_2O içinde çözdürülerek karışım 121°C'de 15 dk süreyle otoklav edilmiştir (King *et al.* 1954).

NBYA (Nutrient-Broth Yeast Extract Agar): 8 g Nutrient broth, 2 g Yeast extract, 2 g K_2HPO_4, 0.5 g KH_2PO_4, 5 g Glucose Solution, 0.25 g $MgSO_4.7\ H_2O$, 15 g Agar ve 940 ml dH_2O ile karıştırılmış daha sonra karışım 121°C'de 15 dk süreyle otoklav edilmiştir (Vidaver 1967).

NSA (Nutrient Sucrose Agar): 5 gpeptone, 3 g Beef extract, 5 g Sucrose and 15 g agar ve 1L dH_2O ile karıştırılmış daha sonra karışım 121°C'de 15 dk süreyle otoklav edilmiştir (Dezordi*et al.* 2009).

MSM (Minimal Salt Medium):1.8 gK_2HPO_4,4 g NH4Cl, 0.1g NaCl, 0.2 g $MgSO_4.7H_2O$, 0.01 g $FeSO_4.7H2O$,15 g Agar ve 1L dH_2O ile karıştırılmış daha sonra karışım 121°C'de 15 dk süreyle otoklav edilmiştir (Zajic and Supplisson, 1972).

SMA (Skim Milk Agar):28 g skim milk pudra, 5 g casein enzymic hydrolysate, 2.5 g yeast extract, 1 g dextrose, 0.5 g NaCl, 15 g agarve 1L dH_2O ile karıştırılmış daha sonra karışım 121°C'de 15 dk süreyle otoklav edilmiştir (Patil *et al*. 2015).

NBRIP-BPB (National Botanic research Institute's Phosphate):10 g glucose, 5g tricalcium phosphate, 5g $MgCl_2.6\ H_2O$, 0.25g $MgSO_4.7H_2O$, 0.2g KCl, 0.1g $(NH_4)_2SO_4$, 0.025 g BPB ve 1L dH_2O ile karıştırılmış daha sonra karışım 121°C'de 15 dk süreyle otoklav edilmiştir (Nautiyal 1999).

CAS(Chrome Azurol S):60.5mg/50ml dH_2OChrome Azurol S,72.9mg/40ml dH_2OHexadecyltrimethyl ammonium bromide,42.23 gKings Medium B base, 900ml dH_2O pH 6.8±0.2.Chrome Azurol S solüsyonu, Hexadecyltrimethyl ammonium bromide solüsyonu ilekarıştırılmışve sonra 10 mM HCl'de hazırlana10 ml 1mM FeCl3.6H2Osolüsyonunaeklenmiştir. Sonuncu solüsyon 900 ml Kings Medium B baseile karıştırılmış daha sonra karışım 121°C'de 15 dk süreyle otoklav edilmiştir (Schwyn and Neilands 1987) .

LDB (Lysine Decarboxylase Broth): 5 g Hayvan dokusunun peptik sindirim, 3 g Yeast extract,1 g Dextrose,0.02 g Bromocresol purple ve 1L dH_2O ile karıştırılmış daha sonra karışım 121°C'de 15 dk süreyle otoklav edilmiştir (Falkow 1958).

3.1.2. Yağ asit analizi çalışmasında kullanılan kimyasal solüsyonlar

Çözelti 1

Sırası ile 150 ml metil alkol ve 150 ml H_2O bir litrelik renkli çözelti şişesine ilave edildikten sonra 45 g sodyum hidroksit eklenip iyice karıştırılmıştır.

Çözelti 2

Sırası ile 6N'lik 325 ml hidroklorik asit ve 225 ml metil alkol bir litrelik renkli çözelti şişesindeiyice karıştırılmıştır.

Çözelti 3

Renkli çözelti şişesi içerisinde 200 ml Metil-tert-butil eter üzerine 200 ml hekzan ilave edilerek hazırlanmıştır.

Çözelti 4

Sırası ile 10.8 g sodyum hidroksit ve 900 ml dH_2O1 litrelik renkli çözelti şişesi içinde çözülünceye kadar karıştırılmıştır.

3.1.3. Çalışmada kullanılan patojen bakteri

Bu çalışmada Şahin *et al.* (2002) tarafından yapılan çalışmalarda Doğu Anadolu Bölgesi'nden izole edilmiş ve virülanslığı oldukça yüksek olduğu belirlenen RK-1248 izolatı kullanılmıştır.

3.1.4. Çalışmada kullanılan potansiyel biyoajan bakteriler

Aday izolatlarAtatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü Kültür Kolleksiyonu'nda muhafaza edilen 7 bine yakın bakteri arasından seçilmiştir. Bu izolatların bir çoğu daha önce yürütülen çalışmalarda fosfat çözme, azot fiksasyonu, hormon ve amino asit üretimi bakımından test edilmiştir (Kotan 1998; Kotan 2002; Kotan vd 2002; Karagöz 2009; Kotan *et al.* 2009; Erman vd 2010; Turan *et al.* 2014). Bu izolatlar klasik sistemler ve moleküler sistemlerden MIS sistemi kullanılarak tanılanmıştırve birçok bakteriyel ve fungal bitki patojenine ve zararlılara karşı, biyoajan ve biyogübre olarak kullanılabilirlikleri daha önce yapılan çalışmalarda tespit edilmiştir (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan potansiyel biyoajan bakteriler

Sıra	Bakteri cinsleri	TS	Sıra	Bakteri cinsleri	TS	Sıra	Bakteri cinsleri	TS
1	*Bacillus* sp.	301	**27**	*Micobacterium* sp.	7	**53**	*Streptoverticillium* sp.	2
2	*Pseudomonas* sp.	126	**28**	*Photorhabdus* sp.	7	**54**	*Acetobacter* sp.	1
3	*Stenetrophomonas* sp.	71	**29**	*Achromobacter* sp.	8	**55**	*Acidovorax* sp.	1
4	*Panteoa* sp.	4	**30**	*Myroides* sp.	7	**56**	*Aerococcus* sp.	1
5	*Arthrobacter* sp.	34	**31**	*Aeromonas* sp.	11	**57**	*Bordetella* sp.	1
6	*Enterobacter* sp.	34	**32**	*Kurthia* sp.	7	**58**	*Cellulosimicrobium* sp.	1
7	*Micrococcus* sp.	34	**33**	*Bergeyella* sp.	4	**59**	*Colwellia* sp.	1
8	*Serratia* sp.	30	**34**	*Brevundimonas* sp.	5	**60**	*Delftia* sp.	1
9	*Paenibacillus* sp.	39	**35**	*Chromobacteriumsp.*	4	**61**	*Dermabacter* sp.	1
10	*Alcaligenes* sp.	25	**36**	*Flavobacterium* sp.	4	**62**	*Dunganella* sp.	1
11	*Salmonella* sp.	27	**37**	*Actinomadura* sp.	3	**63**	*Edwardsiella* sp.	1
12	*Brevibacillus* sp.	27	**38**	*Cellulomonas* sp.	3	**64**	*Escherichia* sp.	1
13	*Chryseobacterium* sp.	28	**39**	Citrobacter sp.	3	**65**	*Geobacillus* sp.	1
14	*Kocuria* sp.	23	**40**	*Hafnia* sp.	3	**66**	*Hydrogenophaga* sp.	1
15	*Burkholderia* sp.	19	**41**	*Janthinobacterium* sp.	3	**67**	*Kytococcus* sp.	1
16	*Acinetobacter* sp.	24	**42**	*Neisseria* sp.	3	**68**	*Methylobacterium* sp.	1
17	*Erwinia* sp.	18	**43**	*Photobacterium* sp.	3	**69**	*Pediococcus* sp.	1
18	*Leclercia* sp.	13	**44**	*Weeksella* sp.	3	**70**	*Providencia* sp.	1
19	*Vibrio* sp.	13	**45**	*Curtobacterium* sp.	2	**71**	*Pseudoxanthomonas* sp.	1
20	*Yersinia* sp.	15	**46**	*Deinococcus* sp.	2	**72**	*Rahnella* sp.	1
21	*Agrobacterium* sp.	10	**47**	*Kluyvera* sp.	2	**73**	*Rhodococcus* sp.	1
22	Kelpsiella sp.	10	**48**	*Lysobacter* sp.	2	**74**	*Rothia* sp.	1
23	*Staphilococcus* sp.	15	**49**	*Proteus* sp.	2	**75**	*Shigella* sp.	1
24	*Pseudoalteromonas* sp.	10	**50**	*Psychrobacter* sp.	2	**76**	*Sphingomonas* sp.	1
25	*Sphingobacterium* sp.	11	**51**	*Ralstonia* sp.	2	**77**	*Variovorax* sp.	1
26	*Brevibacterium* sp.	8	**52**	*Shewanella* sp.	2	**78**	*Zobellia* sp.	1
TS: Test edilen ve etkili bulunan toplam bakteri izolat sayıları								**1150**

3.1.5. Sera ve tarla çalışmalarında kullanılan bitki çeşidi

Serave tarla denemelerinde test bitkisi olarak Early Urban ticari isimli domates çeşidi kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Patojen bakteri izolatının virülanslık testi

Cmm RK-1248 izolatının virulanslığı bu tez kapsamında yeniden test edilmiştir. Patojen bakteri izolatları, 3-5 yapraklı dönemde bulunan domates fidelerine gövdeden steril kürdan yardımıyla 3 tekrarlı olarak inoküle edilmiş ve kontrol olarak steril su kullanılmıştır. İnoküle edilen bitkiler 25°C sıcaklık ve yüksek nem sağlamak amacıyla 24 saat süreyle ıslak polietilen torba içerisinde tutulmuştur. İnokülasyondan bir gün sonra fideler nem çemberinden alınmış ve günlük olarak simptom gelişimi açısından incelenmiştir. İnokülasyondan 14 gün sonra enfekteli fidelerde oluşan solgunluk simptomları ve iletim demetlerinde oluşan kahverengiliklere göre, hastalık var/yok olarak değerlendirilmiş ve izolatların patojen olup olmadığı belirlenmiştir. Simptom veren bitkilerden re-izolasyonlar yapılarak elde edilen izolat ile çalışma yapılmıştır.

3.2.2. Potansiyel biyoajan bakterilerin *in vitro* koşullarında patojene karşı test edilmesi

Patojen NBYA besi ortamı içeren petrilere ekilmiş ve potansiyel biyoajan bakteri kültürleri NB aktarılarak 27°C'de inkübasyona bırakılarak 24 saatlik taze kültürleri elde edilmiştir. Potansiyel biyoajanlardan hazırlanan solüsyonu petrinin (çap 9 cm) tam ortasına yerleştirilen disk üzerine 10 µl (10^8 kob/ml) emdirilerek 27°C'de 24 sa süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Gelişen taze patojen kültürlerinden süspansiyon hazırlanarak (10^8 kob/ml) NBYA besi yüzeyine sprey yapılmış ve Petriler parafilm ile sarılarak 27°C'de 72 sa süreyle inkübasyona bırakılmıştır (Jung *et al.* 2014). Bu sürenin sonunda oluşan inhibisyon zonları ile hiperparazitik etkiler ölçülerek kaydedilmiştir. Bu işlem her biyoajan bakteri için 3 kez tekrar edilmiş ve bu değerlendirmede 3 değerin ortalaması alınmıştır.

3.2.3. Potansiyel biyoajan bakterilerin mikrobial identifikasyon sisteminde tanısı

Saf kültür olarak -80°C'de muhafaza edilen bakteri izolatlarından yağ asit metil ester ekstraksiyonu (FAME), izolasyonu, saflaştırılması ve analizi yapılmıştır. Bilgisayar kontrollü gaz kromatografi sistemi olan Mikrobiyal Identifikasyon Sistemi (MIDI, Sherlock Microbial Identification System version 4.5 inc., Newark, DE) kullanılarak kültüre alınan izolatların tür ve/veya alt tür seviyesinde tanıları yapılmıştır. Mikroorganizmaların yağ asitlerini saf olarak izole edebilmek için 4 farklı çözelti kullanılmıştır. Hazırlanan 4 çözelti ile aerobik bakterilerden yağ asit metil esterlerinin saflaştırılması aşağıdaki metod takip edilerek yapılmıştır:

1. TSA üzerinde geliştirilen bakterilerin inkübasyon periyodunu takiben, 4 fazlı çizim yapılmış petrilerin 3 ve 4 numaralı fazlarından canlı bakteri hücreleri steril bir özeyle toplanarak steril teflon kapaklı cam test tüplerine (5 ml) aktarılmıştır.

2. Her bir test tüpüne 1 ml hücre parçalayıcı çözelti ilave edilmiş ve 5-10 s çalkalandıktan sonra test tüpler 5 dk süreyle 100°C'lik su banyosunda bekletilmiştir. Ardından tekrar 5-10 s çalkalanan test tüpler 25 dk süreyle 100°C'lik su banyosunda inkübasyona bırakılmıştır.

3. Test tüplerine 2 ml metilleştirme çözeltisinden eklendikten sonra 5-10 s'lik bir çalkalamadan sonra 80°C'de 10 dk süreyle su banyosunda bekletilmiş ve hemen takiben 2 dk süreyle buz veya soğuk su içerisinde soğutulmuştur.

4. Soğutulmuş tüplere 1.25 ml saflaştırma çözeltisinden eklenerek 10 dk süreyle hematoloji çalkalayıcısında çalkalanmıştır. Tüplerin alt kısmında asidik (inorganik), üst kısmında da organik sıvı faz olmak üzere 2 ayrı faz oluştuğu gözlendikten sonra yağ asit metil esterleri asidik fazdan ayrışarak organik faz bölgesinde toplandığından pastör pipeti kullanarak tüplerin alt kısmındaki asidik faz atılmış ve organik faz muhafaza edilmiştir.

5. En son aşamada her tüpe 3 ml bazik yıkama çözeltisinden ilave edilmiş ve tüpler 5 dk süreyle hematoloji çalkalayıcısında karıştırıldıktan sonra 10 dk süreyle oda sıcaklığında bekletilmiştir. Bu aşamada da tüp içerisinde iki ayrı faz oluştuğu gözlendiğinde üst fazda toplanan ve yağ asit metil esterleri içeren faz pastör pipeti ile alınarak 2 ml gaz

kromatografisi tüplerine transfer edilmiş, sonra ağızları sıkıca kapatılarak MIS cihazı üzerindeki örnek depolama tepsisine yerleştirilmiştir.

3.2.4. Potansiyel biyoajan bakterilerin biyokimyasal testlerle bazı özelliklerinin belirlenmesi

3.2.4.a. Potasyum hidroksit testi (KOH)

Taze hazırlanan %3'lük KOH solüsyonundan lam üzerine bir damla damlatıldıktan sonra, bakterilerin 48 saatlik kültüründen platin özeyle alınarak solüsyona dairesel hareketlerle karıştırılmıştır. 15-20 saniye sonra öze yukarı kaldırıldığında viskoz, yapışkanımsı bir yapının oluşup oluşmamasına bakılmış oluşmaması durumunda sonuç gram pozitif olarak değerlendirilmiştir (Sands 1990).

3.2.4.b. Katalaz testi

Katalaz enzimin varlığı belirlemek için 24-48 sa'lik bakteri kültüründen bir kürdanla alınmış ve üzerine 1 damla %30 H_2O_2 ilave edildikten sonra kabarcık oluşumu durumunda katalaz pozitif, oluşmaması durumunda ise katalaz negatif olarak değerlendirilmiştir (Klement *et al.*1990).

3.2.4.c. Oksidaz testi

Test için %1 tetra methyl-p-phenylendiamine dihidroklorid içeren diskler kullanılmıştır. Bu diskler 1 damla sdH_2O ile doyurulduktan sonra üzerleri 24-48 sa'lik bakteri ile kaplanmıştır. Gözlemlenen mavimsi-mor renk, değişiminin oluşması pozitif, oluşmaması ise negatif olarak kabul edilmiştir (Klement *et al.* 1990).

3.2.4.d. Levan (fructan) testi

Bu test için NSA besi yeri kullanılmıştır. Kültürler çizgi ekim şeklinde ekilerek 27°C'de 5 gün inkübe edilmiştir. Test sonucunda izolatların sukrozu kullanılma sonucunda oluşan konveks, mukoid koloniler levan pozitif, konveks ve mukoid yapıda olmayan koloniler ise levan negatif olarak değerlendirilmiştir (Lelliot and Stead 1987; Klement *et al.* 1990).

3.2.4.e. Aminosiklopropan karboksilat deaminaz (ACCD) aktivitesi

Öneri formunda kesin olarak yapılması öngörülmemekle birlikte testlerde ümit var olduğu belirlenen izolatlarda ACCD aktivitesinin belirlenmesi için -80°C'de muhafaza edilen izolatlar NA üzerine ekilmiş, ekim yapılan petriler 27°C 'de 24-48 sa inkübe edilmiştir. Bakterilerin ACCD aktivitesini belirlemek amacıyla 5 ml TSB içerisine bakteriler özeyle inoküle edilmiştir. Bu karışım 60 rpm'de 48 sa, 28°C'de inkübe edilmiş, 48 sa sonra 2ml solüsyondan alınarak ependorf tüplerine aktarılmıştır daha sonra 6000 rpm'de 5 dk santrifuj yapılmış, santrifujdan sonra Tris-HCl (0.1 M) yıkanmış ve kolonilerin üzerine 1ml Tris-HCl eklenmiştir (Shahzad, *et al.*, 2010). 96 kuyucuklu pleytin her bir kuyucuğuna 120 µl MSM eklenmiştir. İlk 4 sütuna, 15 µl 0.1 M $MgSO_4$, ve ikinci 4 sütuna, 15 µl0.1 M $(NH_4)_2SO_4$ eklenmiştir. 3 mM ACCD sterilize edilmiş ve -20°C bekletilmiştir. Geri kalan 4 sutuna 15 µl 3Mm ACCD eklenmiştir. Her bir çukurcuğa aşılanması için 15 µl bakteri kültürü eklenmiştir. Kontrol olarak, 15 µl0.1 M $MgSO_4$ kullanılmıştır. Optik yoğunluk (OD) Biolog® tanımlama sistemi kullanılarak 600 nm'de 48 sa sonra ölçülmüştür. ACCD ve $(NH_4)_2SO_4$ kuyucukların OD değeri, ACCD büyüme için kullanan bakterilerin yeteneğini belirlemek için, $MgSO_4$ çukurcuğu ile karşılaştırılmıştır (Jacobson *et al.*1994).

3.2.4.f. Azot fiksasyonunun tespiti

Bakteriler stok kültürlerden NA besiyerine çizgi ekimle inoküle edilmiştir. 2-7 günlük bir inkübasyon sonrasında bakteri kolonileri azotsuz besi ortamına (N-Free Medium)

çizilerek 7-10 gün süreyle 27°C'ye ayarlı inkübatörde gelişmeye bırakılmıştır. Besiyerinde görülen bakteri gelişimi azot fiksasyonu pozitif olarak değerlendirilmiştir (Mulder 1950).

3.2.4.g. Fosfat çözücülüğü tespiti

Bakteriler stok kültürlerden NA besiyerine inoküle edilmiştir. 2-7 günlük bir inkübasyon sonrasında gelişen bakteri kolonileri NBRIP-BPB besiyeri içeren tüplere aktarılmış 27°C'de 7 gün çalkalayıcıda 80 devir/dakika çalkalanarak inkübe edilmiştir. Besi yerinde görülen renk açılması fosfat çözümü pozitif olarak değerlendirilmiştir.

3.2.5. Potansiyel biyoajan bakterilerin üretebildiği metabolitlerin belirlenmesi

3.2.5.a. Hidrojen siyanid (HCN)

HCN üretimi, Millar and Higgins (1970) prosedürü modifiye edilerek kullanılmıştır (Nandhini *et al.*2012). Suşlar TSA üzerine ekilmiş ve sonra filtre kağıdı pikrik asit çözeltisi (2.5g pikrik asit; 12.5g Na_2CO_3, 1000 ml distile su) ile ıslatılarak petri kabının kapağına yerleştirilmiştir. Petriler parafilm ile kapatılmış ve 48 sa 28°C filtre kağıdında renk değişikliği meydana gelene kadar inkübe edilmiştir. Sarıdan açık kahverengi, kahverengi veya kırmızımsı kahverengiye, zayıf, ileri ve güçlü HCN üretiminin bir göstergesi olarak kaydedilmiştir.

3.2.5.b. Indol asetik asit (IAA)

Bakteriler, TSB ve triptofan (bir ön-madde, 50 µg / ml) besiyerine aktarıldıktan sonra 72 sa beklenmiştir. Kültür süpernatanları, 10 dk 2000 rpm'de santrifüj edildikten sonra toplanmış ve 1 ml hücresiz kültür filtratı 2 ml Salkowsky çözeltisi (2 mL 0,5 M $FeCl_3$, 98 ml%35 perklorik asit) ile karıştırılmış ve 28°C'de 30 dk inkübe edilmiştir.

Değerlendirme, 530 nm'de kolorimetrik olarak, IAA standart oluşturulmuş eğri ile karşılaştırılarak yapılmıştır (Bent *et al.* 2001).

3.2.5.c. Salisilik asit (SA)

Bakteriler tarafından üretilen SA, Meyer ve Abdallah (1978) yöntemine göre belirlenmiştir. İzolatlar, standart süksinat ortamında 48 sa 28°C'de bekletilmiştir. Hücreler, 5 dk boyunca 8000 rpm'de santrifüj ile toplanmış ve 1 ml0.1 M fosfat tampon içinde tekrar süspanse edilmiştir. 4 mL hücresiz kültür filtre ürünü, 1N HCI ile pH 2.0 asidifiye edilmiş ve SA, $CHCl_3$ içinde ekstre edilmiştir. Sonra 4 ml su ve 5 µl 2M $FeCl_2$ eklenmiştir. Sulu fazda geliştirilmiş mor demir SA kompleksi absorbansı, 527 nm'de okunmuş,standart eğrisi süksinat ortamı içinde çözülmüş SA ile elde edilerek üretilen SA kalitesi hesaplanmıştır (Meyer *et al.*1992).

3.2.5.d. Siderofor

Floresan oluşumu siderofor üretimin bir göstergesidir. Kök bölgesine kolonize olan bu bakteriler demirin bitki tarafından kullanımını kolaylaştırırlar. Siderofor üretimi Alexander ve Zuberer (1991) metoduna göre ölçülmüştür. 10 µl bakteri süspansiyonu, krom azurol S (CAS) besi yerine aktarılmıştır ve petriler, 24 sa boyunca 28°C'de inkübe edilmiştir. Renk değişmesi mavi'den turuncuya siderofor üretiminin göstergesi olarak değerlendirilmiştir.

3.2.6. Potansiyel biyoajan bakterilerin enzim aktivitesinin ölçulmesi:

3.2.6.a. Kitinaz

Kitinaz enziminin aktivitesi ölçülmesi için bakteriler stok kültürlerden NB besiyerine ekilmiştir,3 günlük bir inkübasyon sonrasında gelişen bakteri kolonileri her aralıkta elde edilen çökeleklere ve çöktürme sonrası elde edilen süpernatantlara aktivite tayini

yapılmıştır. Bu sayede kitinaz enziminin aktif olduğu aralıklar tespit edilmiştir (Senol *et al.*2014). Bunun için; 200 µl enzim çözeltisi ile 500 µl substrat vorteks ile karıştırıldıktan sonra 30 dk 37°C'ye ayarlanmış benmaride (su banyosu) reaksiyona girmiştir. Su banyosundan çıkarılan tüplere 750 µl renklendirme çözeltisi eklendikten sonra 10 dk 80°C'ye ayarlı su banyosunda bekletilerek reaksiyonun durdurulması sağlanmıştır.Su banyosundan çıkarılan örneklerin üzerine 1300 µl distile saf su koyulmuştur.Örnekler kör kullanılarak (200 µl saf su + 500 µl substrat +750 µl renklendirme çözeltisi + 1300 µl saf su) 540 nm'de spektrofotometrede ölçülmüştür.

3.2.6.b. Fitaz

Bakteriler stok kültürlerinden NB besiyerine ekilmiş, 3 günlük bir inkübasyon sonrasında gelişen bakteri kolonileri, her aralıkta elde edilen çökeleklere ve çöktürme sonrası elde edilen süpernatantlara aktivite tayini yapılmıştır:

1. 100 µl enzim çözeltisi ile 500 µl substrat vorteks ile karıştırıldıktan sonra 30 dk 50°C'ye ayarlanmış benmaride (su banyosu) reaksiyona girmiştir.
2. Su banyosundan çıkarılan tüplere 500 µl Trikoloroasetik Asit (TCA) eklenmiş ve 15 dakika oda sıcaklığında beklenmiştir.
3. 500 µl renklendirme çözeltisi eklendikten sonra 10 dk 3200 rpm hızda santrifuj yapılmıştır.
4. Örnekler kör kullanılarak (100 µl saf su + 500 µl substrat +500 µl TCA+500 µl renklendirme çözeltisi) 700 nm'de spektrofotometrede ölçülmüştür.

3.2.6.c. Amilaz

Amilaz aktivitesi, Sung *et al.* (1993) metodununmodifiye edilmiş halikullanılarak yapılmıştır. 4-5 gün boyunca 30°C'de inkübasyondan sonra, çözünür nişasta (%1) kullanılarak tespit edilmiş olan amilaz üretimi, nişastası olan kültüre iodin katılması ile taranmıştır. Sıvı nişasta ortamı kontrol olarak kullanılmıştır. Renk kaybolması nişastayı

parçalayan bakteri izolatlarının amilaz üretme varlığını doğrulamıştır, eğer mor renk değişmez ise bakterilerin amilaz üretmediği kaydedilmiştir.

3.2.6.d. Proteaz

Proteaz enziminin belirlenmesi Atlas (1995) metoduna göre yapılmıştır. Bakteriler SMA besiyerinde disk üzerine aktarılmış ve 27°C'de 24 sa inkübe edilmiştir. Proteaz üretimini belirlemek için bakteri kolonilerinin etrafında renksiz, zonoluşumu değerlendirilmiştir.

3.2.6.e. Lipaz

Lipaz enziminin belirlenmesi için aşağıdaki ortam kullanılmıştır (Omidvari 2008):

Pepton 10 g, kalsiumklorid 0.1 g, sodium klorid 5 g, Agar 15 g, distile su 1 L, 10 ml steril Tween 20. Besi ortamına ekilen bakteriler 27°C'de 48 sa inkübe edilmiştir. Bakteri kolonileri etrafında zon oluşumu lipaz enziminin aktivitesinin göstergesi olarak değerlendirilmiştir.

3.2.6.f. Lisin dekarboksilaz

LDB besiyeri ve kontrol olarak hazırlanan, lisin içermeyen aynı besiyerine bir öze dolusu kültür aşılanarak optimum sıcaklıkta 35ºC 48 sa inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda kontrol amaçlı hazırlanan besiyerinin sarı, LDB besiyerinin viyole rengi olması lisin dekarboksilasyonu pozitif, her iki besiyerinin de sarı olması ise lisin dekarboksilasyonu negatif olarak değerlendirilmiştir (Bilgehan 2009).

3.2.7. Viyol denemeleri

Çalışmanın viyol denemeleri 2015 yılının Mayıs-Haziran ayları arasında Urmia Üniversitesi Bitki Koruma Bölümü serasında gerçekleştrilmiştir. Domates fidelerinde *Cmm* inokulumunun aday bakteri izolatları tarafından engelleme yeteneğinin belirlenmesi için viyol denemeleri yapılmıştır. King B besi yerinde 25±1°C'de 24-48 sa geliştirilmiş olan aday bakteri izolatlarının yoğunluğu steril su ile spektrofotometrede 640 nm dalga boyunda 0.12 absorbans değerine ayarlanmıştır. Hazırlanan süspansiyonu içerisine iki yapraklı döneminde fidelerin kökleri 20 dk daldırılmıştır. Uygulamadan bir hafta sonra *Cmm*'in 24-48 sa kültürlerinden yaklaşık 10^8 kob/ml konsantrasyonunda hazırlanan süspansiyon ile fideler inoküle edilmiştir. Patojen ile bulaşık fideler sadece patojen, kontrol bitkilerde ise sadece suyla muamele görmüştür. Gerçek yapraklar çıkıncaya kadar viyoller nem çemberi içerisinde tutulmuş ve patojen uygulanan bitkilerde hastalık simptomları gözleninceye kadar bitkiler günlük olarak incelenmiştir. Elde edilen verilere ANOVA, SAS program ile varyans analizi uygulanmış ve ortalamalar arasındaki farklılıklar Duncan testine göre $p \leq 0,01$ önem seviyesinde karşılaştırılmıştır.

3.2.8. Serada saksı denemeleri

Çalışmanın saksı denemeleri 2016 yılının Mart-Mayıs ayları arasında Urmia Üniversitesi Bitki Koruma Bölümü serasında gerçekleştrilmiştir. King B besi yerinde 25±1°C'de 24-48 sa geliştirilmiş olan aday bakteri izolatlarının yoğunluğu steril su ile spektrofotometrede 640 nm dalga boyunda 0.12 absorbans değerine ayarlanmıştır. Domates fideleri (üç yaprakli donemde) viyollerden yavaşça çıkartılıp ve plastik saksılara (bir fide/saksı) transfer edilmiştir. Hemen fide transferi öncesinde, kökler biyoajan süspansiyonuna 20 dk boyunca (10^8 kob/ml) daldırılmıştır. Uygulamadan bir hafta sonra *Cmm*'in 24-48 saatlik kültürlerinden yaklaşık 10^8 kob/ml konsantrasyonunda hazırlanan süspansiyon ile fideler inoküle edilmiştir. Patojen ile bulaşık fideler sadece patojen, kontrol bitkilerde ise sadece suyla muamele görmüştür.Aydınlatma sürei 12 sa; sıcaklık: 10°C gece ve 28°C gündüz, nem %80 ve her 2 günde birsulanmıştır. Tüm

uygulamalar on kez ve deneme uç kez tekrar edilmiştir. Serada, çevre etkilerini en aza indirmek içinsaksılartamamen tesadüfi olarak değerlendirilmiştir. Bitkiler her 2 günde bir sulanmış ve hastalık 12 hafta boyunca gözlemlenmiştir.

3.2.9. Tarla denemeleri

Çalışmanın tarla denemeleri 2016 yılının Mayıs-Eylül ayları arasında Urmia Üniversitesi Bitki Koruma Bölümü Araştırma ve Uygulama Parselinde gerçekleştrilmiştir. Saksı denemelerinde test edilen izolatlar tarla koşullarında denenmiştir. Çalışma Tesadüf Blokları Deneme Desenine göre 3 tekrarlı ve her tekrarda 10 bitki olacak şekilde planlanmıştır. Fidelerin gelişim düzeylerinin homojen olmasına dikkat edilmiştir. Viyoller içerisinde deneme alanına getirilen fidelerin kökleri 20 dk boyunca (10^8 kob/ml) aday biyoajanların süspansiyonlarına daldırılmıştır. Uygulamadan bir hafta sonra fidelerin gövdesine 10^8 kob/ml yoğunluğundaki patojen süspansiyonundan 100µl inokule edilmiştir. Steril suya daldırılan fidelere patojen inokulasyonu yapılarak pozitif kontrol olarak değerlendirilmiştir. Negatif kontrol olarak ise sadece steril suya daldırılan bitkiler kullanılmıştır. İnokülasyondan sonra bitkiler günlük olarak incelenmiştir ve pozitif kontrol bitkilerde hastalık simptomları gözlenince değerlendirme yapılmıştır. Elde edilen verilere ANOVA, SAS program ile varyans analizi uygulanmış ve ortalamalar arasındaki farklılıklar Duncan testine göre $p \leq 0,01$ önem seviyesinde karşılaştırılmıştır. Patojenle enfektelibitkiler hastalık simptomları oluşuncaya kadar günlük olarak incelenmiştir. Hastalığın gözlenmesi 12 hafta süre ile yapılmıştır ve herhangi bir fide solgunluk belirtisi görüldüğünde, yüzde hastalık olarak tayin edilmiştir (Amkraz *et al.*2010).

3.2.10. Bitki savunma metabolizma enzimlerin değerlendirilmesi

Yaklaşık 200 mg ağırlığında yaprak örnekleri, 10 ml fosfat tampon maddesi pH 6.8 (0.1 M) kullanılarak homojenleştirilmiş ve 5'er ml olacak şekilde iki eşit kısma bölünmüştür. 5 ml'lik kısımlardan birisi, soğutmalı santrifüjde 17.000 G'de, 15 dk 2°C'de

santrifüjlenmiş ve berrak supernatant enzim kaynağı olarak alınmıştır. Diğer 5ml'lik kısım ise; biyokimyasal analiz için saklanmıştır.

3.2.10.a. Polifenol oksidaz (PPO)

5 ml deney karışımı için: 125 µmol pH 6.8 olan fosfat tamponu, 50 µmol pirogalol ve 1 ml enzim extraktı 20 kez seyreltilmiştir. Karışıma 0.5 ml %5'lik H_2SO_4 ilave edilmiş ve reaksiyon durdurulduktan sonra 5 dk 25°C'de inkubasyona bırakılmıştır. Oluşan purpurogallin miktarı 515 nm'deki absorbans alınarak belirlenmiştir (Karr and Mishra 1976).

3.2.10.b. Katalaz

5 ml deney karışımı için: 300 µmol pH 6.8 fosfat tamponu,100 µmol H_2O_2 ve1 ml iki kez seyreltilmiş enzim ekstraktı eklenerek hazırlanmıştır. karışım bir dakika 25°C'de inkubasyona bırakıldıktan sonra, reaksiyon 10 ml %2'lik (h/h) H_2SO_4 ile durdurulmuştur. H_2O_2üzerine soluk mor renk alana kadar 0,01 N $KMnO_4$ ilave edilmiş ve en az 15 saniye boyunca karıştırılmıştır. Kontrolle karşılaştırmalı olarak çalışan testlerin enzim aktivitesi, "sıfır" zamanda durdurulmuştur. Katalaz aktivitesinin birimi enzim miktarı olarak, bir dakikada 1µmol H_20_2 tahlil koşulları altında bölmekle 240 nm'deki absorbans alınarak belirlenmiş ve min/g olarak değerlendirilmiştir (Karr and Mishra 1976; Cakmak and Horst 1991).

3.2.10.c. Peroksidaz (POX)

5ml deney karışımı için: 125 µmol pH 6.8 fosfat tamponu, 50 µmol pirogalol, 50 µmol H_2O_2 ve 1 ml enzim extraktı eklenerek 20 kez seyreltilmiştir. Karışıma 0.5 ml %5'lik H_2SO_4 ilave edilmiş ve reaksiyon durdurulduktan sonra 5 dk 25°C'de inkubasyona bırakılmıştır. Oluşan purpurogallin miktarı 475 nm'deki absorbans alınarak belirlenmiştir (Karr and Mishra 1976).

3.2.10.d. Süperoksit dismutaz (SOD)

SOD aktivitesi, Giannopolitis ve Riese (1977) tarafından önerilen yöntem kullanılarak belirlenmiştir. Homojenat hazırlanmasında 0,2 g ağırlığında yaprak örnekleri öğütüldükten sonra 0,1 mM'lık EDTA içeren, pH'sı 7,8 olan 3 ml HEPES-KOH tamponunda homojenize edilmiştir. Soğutmalı santrifüjde 15.000 G'de 15 dk boyunca santrifüj edilip supernatant çökelekten ayrılmıştır. Elde edilen süpernatant 15 dk boyunca ışıkta tutulmuş sonra 560 nm dalga boyunda verdiği optik dansitite (OD) olçulmuştur. Reaksiyon karışımı 0,1 mM'lık EDTA içeren, pH'sı 7,8 olan 50 mM HEPES-KOH tamponu, 50 mM Sodyum karbonat pH'sı 10,2, 12 mM L-methionine,75 µm Nytrovylotetrazolyom, 1 µm riboflavin ve 300 µl enzim ekstraktından ibaretdir.

3.2.10.e. Total fenol

Numunenin gramı başına miligram olarak ifade edilen toplam fenolik içeriği Slinkard ve Singleton (1977) metoduna göre belirlenmiştir. Uygulama başına 1 g bitki materyalinin (kökler, sap ve yaprak) ekstraktı, 50 ml %95'lik etanol içerisinde ekstrakte edilmiştir. Numuneler, 48 sa boyunca 0°C'de muhafaza edilmiştir. Filtreleme işleminden sonra, supernatant, toplam fenolik testi için kullanılmıştır. Üst faz, (1 ml), 1 ml %95 etanol ve 5 ml distile su ile karıştırılmıştır. Folin-Ciocalteu çözeltisi (%50, 0.5 ml) her bir örneğe ilave edilmiştir. Bu karışıma 5 dk sonra, 1 ml %5 Na_2Co_3 eklenemiş ve vortekslenerek reaksiyon karışımı karanlıkta 60 dk boyunca beklemeye bırakılmıştır. Ultraviyole spektrofotometre ile 725 nm'de absorbansları ölçülmüştür. Katekol farklı konsantrasyonlarda hazırlanan katekol ile standart eğriden yararlanarak fenolik madde üzerine tespit edilmiş ve taze yaprak ağırlığı (mg/g FW) başına miligram katekol olarak ifade edilmiştir.

3.2.11. Saksı ve tarla şartlarındaetkili bulunan bakteriler için formülasyon oluşturulması

3.2.11.a. Kültürlerin katı besi ortamında geliştirilmesi

Biyoformülasyonda kullanılan saf bakteriler NAbesi ortamı içeren petrilere ekilerek 27°C'de 24 sa inkübasyona bırakılmıştır. Gelişen taze kültürlerin her birisinden ayrı ayrı öze ile alınarak 250 ml'lik NB içeren besi ortamına aktarılmış ve üzerine bakterilerin izolat numaraları yazılmıştır. Yatay çalkalayıcılı inkübatörde ayrı ayrı 24 sa geliştirilen bu kültürlerin biyolog türbidimetre ile absorbansları ölçülmüştür.

3.2.11.b. Aşılama kültürleri için sıvı besiyerinin belirlenmesi

Biyoformülasyonda kullanılan bakteriler sıvı taşıyıcıya aktarılmadan önce aşılama kültürü olarak laboratuar koşullarında fermantörlerde üretilerek sıvı taşıyıcıya 1/100 oranında ilave edilmiştir. Bu aşamada bakterilerin üretiminde kullanılan en uygun ticari besiyerinin belirlenmesi için 2 farklı besiyeri (Triptic Soy Broth ve Nutrient Broth) denenmiştir. Gelişen kültürlerin 1 ml'sindeki koloni oluşturan bakteri sayıları hesaplanmıştır. Bunun için; Plate Count Agar (PCA)'dan petri kaplarında besiyeri hazırlanmıştır. Petriler kapak aşağı gelecek şekilde 26°C'de 1 gün inkübasyona bırakılarak kurutulmuştur. Yeteri kadar 15 ml'lik cam tüplere 9'ar ml saf su konularak otoklav edilmiştir. Her bir bakteri için 15 adet tüp deney tüplüğüne konularak 1'den 15'a kadar numaralandırılmıştır. Sayım yapılan bakteri kültüründen otomotik pipetle alınan 1 ml örnek 1 nolu tüpe aktarılmıştır. Bu tüp iyice karıştırılmış ve tekrar pipetle alınan 1 ml örnek 2 nolu tüpe aktarılmıştır. Bu işlem 15 nolu tüpe kadar devam edilmiş ve son tüpte alınan 1 ml örnek dışarı atılmıştır. Herbir dilüsyondan ayrı ayrı 100 µl örnek alınmış PCA içeren petrilere aktarılmış, steril cam baget yardımı ile besiyeri üzerine iyice yayılmıştır. Her bir bakteriye ait dilüsyonlar 3'er petriye ekilmiştir. Kültürler 27°C'de 48 sa inkübasyona bırakılmış ve tek tek kolonilerin sayılabildiği en uygun dilüsyondan sayım yapılmıştır. Burada sayım yapılan petrilerde ortalama olarak en az 30-40 en çok 200-250 koloni olmasına dikkat edilmiştir. Bulunan koloni sayısı 3

petrinin ortalamasından elde edilmiştir. Sayımın yapıldığı dilüsyon katsayısı ile çarpılarak toplam sayı bulunmuştur. Bütün bakteriler için her iki besiyeri için ölçülen absorbans değerleri ve koloni oluşturan bakteri sayıları kayıt edilmiş, hangi besiyerinde daha hızlı üredikleri tespit edilmiştir. Sıvı taşıyıcıya aktarılmadan önce hazırlanan aşılama kültürü elde edilmesinde her bakteri için en iyi geliştikleri ticari besi yeri kullanılmıştır.

3.2.11.c. Bakterilerin optimum gelişme koşullarının belirlenmesi

Biyoformülasyonda kullanılan bakteri izolatlarının en iyi geliştikleri sıvı besi ortamları tespit edildikten sonra bu besiyerlerinde optimum pH ve sıcaklık değeri belirlenmiş ve fermentörde aşılama kültürleri geliştirilirken bu değerler kullanılmıştır. Bu amaçla biyoformülasyonlarda kullanılan saf bakteriler dondurucudan çıkarılarak NA besi ortamı içeren petrilere ekilmiş ve 27°C'de 24 sa inkübasyona bırakılmıştır. Gelişen taze kültürlerin her birisinden ayrı ayrı öze ile alınarak 250 ml'lik NB içeren besi ortamına aktarılmış ve üzerine bakterilerin izolat numaraları yazılmıştır. Yatay çalkalayıcılı inkübatörde ayrı ayrı 24 sa geliştirilen bu kültürlerin biyolog türbidimetre ile absorbansları ölçülmüş ve absorbansları steril su ile eşitlenmiştir. En iyi geliştikleri sıvı besiyerlerinde literatür bilgileri de kullanılarak belirlenen 6 farklı pH (6.4, 6.6, 6.8, 7.0, 7.2 ve 7.4) ve 5 farklı sıcaklık (24, 26, 28, 30 ve 32°C) değerleri ile çalışılarak optimum koşullar belirlenmiştir. Absorbansları eşitlenen kültürlerden 1'er ml alınarak beş farklı pH değerindeki besi yerlerine aktarılan standart inkübasyon sıcaklığı olarak belirlenen 27°C'de 48 sa inkübasyona bırakılmıştır. Gelişen kültürlerin 1 ml'sindeki koloni oluşturan bakteri sayıları hesaplanmıştır. Bunun için; PCA'dan petri kaplarında besiyeri hazırlanmıştır. Petriler kapak aşağı gelecek şekilde 26°C'de 1 gün inkübasyona bırakılarak kurutulmuştur. Yeteri kadar 15 ml'lik cam tüplere 9'ar ml saf su konularak otoklav edilmiştir. Her bir bakteri için 15 adet tüp deney tüplüğüne konularak 1'den 15'a kadar numaralandırılmıştır. Sayım yapılan bakteri kültüründen otomotik pipetle alınan 1 ml örnek 1 nolu tüpe aktarılmıştır. Bu tüp iyice karıştırılmış ve tekrar pipetle alınan 1 ml örnek 2 nolu tüpe aktarılmıştır. Bu işleme 15 nolu tüpe kadar devam edilmiş ve son tüpte alınan 1 ml örnek dışarı atılmıştır. Herbir dilüsyondan ayrı ayrı 100 µl

örnek alınarak PCA içeren petrilere aktarılmış, steril cam baget yardımı ile besiyeri üzerine iyice yayılmıştır. Her bir bakteriye ait her bir dilüsyondan 3 petriye ekim yapılmıştır. Kültürler 27°C'de 48 sa inkübasyona bırakılmıştır. Tek tek kolonilerin sayılabildiği en uygun dilüsyondan sayım yapılmıştır. Burada sayım yapılan petrilerde ortalama olarak en az 30-40 en çok 200-250 koloni olmasına dikkat edilmiştir. Bulunan koloni sayısı 3 petrinin ortalamasından elde edilmiştir. Sayımın yapıldığı dilüsyon katsayısı ile çarpılarak toplam sayı bulunmuştur. Tüm bakteriler için 5 farklı pH değerlerinde koloni oluşturan bakteri sayıları kayıt edilmiş, hangi pH değerinde daha hızlı üredikleri tespit edilmiş optimum pH değerleri herbir izolat için ayrı ayrı belirlenmiştir. Optimum sıcaklık değerleri ise yukarıda izah edildiği gibi taze kültürleri geliştirilen ve absorbansları eşitlenen bakteri kültürleri her bir izolat için optimum pH sınırlarında hazırlanan besi ortamlarına 1'er ml aktarılarak 5 farklı sıcaklıkta 48 sa inkübasyona bırakılmıştır. Gelişen kültürlerin 1 ml'sindeki koloni oluşturan bakteri sayıları hesaplanmıştır. Bütün bakteriler için 5 farklı sıcaklık değerlerinde koloni oluşturan bakteri sayıları kayıt edilerek, hangi sıcaklık değerinde daha hızlı üredikleri tespit edilmiştir. Sıvı taşıyıcıya aktarılmadan önce hazırlanan bakterilerin aşılama kültürleri fermantörde geliştirilirken burada bulunan optimum pH ve sıcaklık değerleri kullanılmıştır.

3.2.11.d. Sıvı taşıyıcının oluşturulması ve sterilizasyonu

Prof. Dr. Recep Kotan danışmanlığında yürütülen çalışmalarda Gıda Tarım ve Hayvanclık Bakanlığın'dan ruhsatlandırılan karışım mikrobiyal gübreler için bazı organik maddeler, su ve koruyucu maddelerden oluşan bir sıvı taşıyıcı geliştirilmiş durumdadır ve daha önce yapılan analizlerde, pek çok bakteri için çok uygun organik bir sıvı taşıyıcı olduğu belirlenmiştir. Bu sıvı taşıyıcı formülasyonun içeriği; su, çeşitli organik maddeler (deniz yosunu, peynir altı suyu ve bitkisel özütler) ve içeriğindeki bakteri izolatını koruyucuve homojenizasyonunu sağlayıcı çeşitli maddelerden (carboxymethylcellülose, kalsiyum karbonat, glyserin, magnezyum sülfat) oluşmaktadır. Bu taşıyıcıda kullanılan maddelerin oranları ürün içeriğinin gizliliği açısından verilmemiştir. Sıvı taşıyıcıda kullanılan maddelerin oranları üzerinde bazı değişiklikler

yapılarak bakteriler inoküle edilmiş ve 1 hafta sonra yapılan sayımlarda en yoğun bakteri gelişiminin sayımla belirlendiği formülasyon bu çalışmada kullanılmıştır.

3.2.11.e. Aşılama kültürlerinin fermentörde sıvı taşıyıcı içerisinde üretilmesi ve paketlenmesi

Fermentör ürünü sıvı taşıyıcıya aktarılmadan önce otoklavda steril edilen sıvı taşıyıcıdan örnek alınarak laboratuvarda katı besi ortamı NA'a ekim yapılarak izolatların sterillik durumu kontrol edilmiştir. Biyoformülasyonlarda kullanılan bakteri izolatları daha önce her birisi için belirlenen optimum koşullarda ayrı ayrı fermantörlerde 72 sa süre ile üretilmiştir. Üretilen bakteriler 1/100 oranında sıvı taşıyıcıya tam steril koşullarda transfer edilmiş ve yine optimum koşullarda belli bir süre inkübasyona bırakılmıştır. Bu sürede sürekli sıcaklık ve pH kontrolü yapılmış, gerekli olan steril oksijen, blower ile verilmiştir.

İnkübasyon süresince ürün 60 rpm'de yatay çalkalayıcılı inkübatörde karıştırılmıştır. Her 12 saatte bir alttan steril koşullarda 1'er litre numune alınarak periyodik olarak mililitredeki canlı bakteri sayımları yapılmıştır. Bakteri konsantrasyonunun $1x10^8$ kob/ml'yi geçtiği süre, inkübasyon süresi olarak belirlenmiş ve bu sürenin sonunda mikrobiyal ürün tamamen steril koşullarda 1 litrelik steril plastik kaplara paketleme yapılarak sıcaklığı 4°C olan buzdolabında ve oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir. Depolanan ürünlerden bir tanesi sayım için kullanılmıştır. Her 30 günde bir steril koşullarda ürün iyice çalkalandıktan sonra kapağı dikkatlice açılmış 10 ml örnek alınmış, steril erlene aktarılmıştır. Buradan tekrar iyice çalkalanarak alınan 1 ml örnek bakteri sayımı için hazırlanan tüpe aktarılmış seri dilüsyonlar hazırlanmış ve her dilüsyondan 3 farklı petriye ekim yapılmıştır. Kültürler 27°C'de 48 sa inkübasyona bırakılmış ve tek tek kolonilerin sayılabildiği en uygun dilüsyondan sayımlar yapılmıştır.

3.2.12. Paketlenen son ürün ile domateste sera ve tarla denemelerinin kurulması

Çalışmanın serave tarla denemeleri 2017 yılının Mart-Mayıs (sera) ve Mayıs-Eylül (tarla) ayları arasında Urmia Üniversitesi Bitki Koruma Bölümü serasındave Araştırma ve Uygulama Parselinde gerçekleştrilmiştir.1 litre sıvı mikrobiyal üründen, 100 litre kuyu suyuna ilave edilmiş, yapıştırıcı olarak 1 kg toz şeker ilave edilmiş temiz bir tankta iyice karıştırılmış kapalı bir ortamda bir gece bekletilmiştir. Hazırlanan biyoformülasyona fideler daldırılarak dikim yapılmıştır. İki kontrol uygulaması olmuştur, birincisinde domates fideleri sıvı taşıyıcıya daldırılarakuygulamaları yapılmıştır (negatif kontrol). İkincisinde ise sadece patojen bulaştırılarak uygulama yapılmıştır (pozitif kontrol). Tarla ve sera denemeleri Tesadüf Blokları Deneme desenine göre 3 tekrarlı ve her tekrarda 10 bitki olacak şekilde yapılmıştır. Fidelerin gelişim düzeylerinin homojen olmasına dikkat edilmiştir. Uygulamadan bir hafta sonra fidelerin gövdesine 10^8 kob/mlyoğunluğundaki patojen süspansiyonundan 100µl inoküle edilmiştir. İnokülasyondan sonra bitkiler günlük olarak incelenerek değerlendirme yapılmıştır.

3.2.13. Uygulamaların yapıldığı bitkilerdeki bitki büyümeve verim parametrelerinin alınması

3.2.13.a. Bitki yüksekliği (bitki boyu)

Kök boğazından itibaren en üstteki dalın ucuna kadar olan yükseklik ölçülerek bitki yüksekliği (cm) belirlenmiştir.

3.2.13.b. Gövde çapı (gövde kalınlığı)

Fidelerin kök boğazından 5cm yukarısındaki kalınlık kumpas ile ölçülerek gövde çapı (cm), belirlenmiştir. Gövde çapı ölçümünde bitkide kök boğazının yakınından dallanma olması durumunda, dallanmanın başladığı noktadan çap ölçümü yapılmıştır.

3.2.13.c. Çiçek sayısı

Uygulamalarda her bir fideye ait çiçekler sayılarak toplam çiçek sayısı (adet) tespit edilmiştir.

3.2.13.d. Yaprakta klorofil (SPAD değeri)

Taşınabilir klorofil metre (marka SPAD-502, Konica Minolta Sensing. Inc., Japon) yardımıyla bitkinin çiçek tomurcuğu oluşturduğu dönemde sağlam yapraklardan ölçüm alınmıştır. Bu amaçla klorofil metre ile bitkilerin sağlam yapraklarından klorofil içeriği indeks (CCI Chlorophyll Content Index) ölçümleri (1 cm çaplı) 0 ile 200 arasında yapılabilmektedir.

3.2.13.e. Dal sayısı

Uygulamalarda her bir fideye ait dal sayılarak toplam dal sayısı (adet) tespit edilmiştir.

3.2.13.f. Meyve sayısı

Uygulamalarda 3 defa sayım yapılmış (başlangıç, orta ve denemenin sonunda) her bir fideye ait meyveler sayılarak toplam meyve sayısı tespit edilmiştir.

3.2.13.g. Meyve ağırlığı

Meyveler oluşum mevsiminde tartılarak meyve ağırlığı (g) belirlenmiştir.

3.2.13.h. Yaş ve kuru bitki ağırlığı

Denemenin yetişme mevsiminin sonunda fideler eşit yüksekliklerden budanarak tartılmış ve yaş ağırlıkları (g) belirlenmiştir. Fidelerin kuru ağırlığını (g) belirlemek için ise kağıt torbalar içinde etüvde 65-70°C'yi aşmayan sıcaklıkta kurutulmuş.

3.2.13.i. Çiçeklenme süresi

Uygulamaların yapıldığı günden fideler çiçeklenene kadar geçen süre çiçeklenme süresi olarak değerlendirilmiştir.

3.2.14. Hastalık şiddeti ve uygulamaların etkinliğinin değerlendirilmesi

Uygulamaların hastalık gelişimi üzerine etkinliği ve hastalık şiddeti onar gün aralıklarla 0-5 skalasına göre değerlendirilmiştir (Soylu*et al.*2003).

Skalaya göre; 0: Bitkilerde hiçbir solgunluk belirtisi yok; 1: Bitkilerde yaprakların %1-10'da solgunluk mevcut; 2: Bitkilerde yaprakların %11-25'de solgunluk mevcut; 3: Bitkilerde yaprakların %26-49'da solgunluk ve kloroz mevcut; 4: Bitkilerde yaprakların %50-74'desolgunluk mevcut; 5: Bitkiler tamamen ölmüş olarak değerlendirilmştir

$$\text{Uygulamaların etkinliği (\%)} = \times 100 \quad \frac{\text{Kontrol -Uygulama}}{\text{Kontrol}}$$

3.2.15. Saksı ve tarla çalışmalarından elde edilen sonuçların analizi

Saksı ve tarla çalışmalarından elde edilen sonuçlar SPSS (Statistical Package for Social Sciences, Version 9.0) istatistik programında analiz edilerek, aritmetik ortalamaları ve standart sapmaları hesaplanmıştır. Uygulamalar arasındaki farklılığın önem derecesini belirlemek için Duncan ($p \leq 0,01$) testi yapılmıştır.

3.3. Potansiyel Biyoajan Bakterilerin PCR Tekniği İle Tanısı

TV-49A ve TV-85D kodlu izolatların DNA'sı DNeasy Tissue Kit (QIAGEN) ile izole edildikten sonra 16s rDNA bölgesi ile çoğaltılmıştır. Çalışma, reaksiyon tüpü adı verilen 0.5ml'lik ince duvarlı eppendorf tüplerde toplam hacmi 25µl olan reaksiyon karışımının kullanılmasıyla gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon karışımının içeriği Çizelge 3.2'de verilmiştir (Jung *et al.* 2014).

Çizelge 3.2. PCR işleminde kullanılan reaksiyon karışımın içeriği

Reaksiyon karışımının içeriği	**Miktarı (µL)**
PCR buffer 10X	2,5
50 mM $MgCl_2$	1,5
100 mM dNTP	0,5
Primer (10 µM)	1,25
Taq DNA polimeraz (5 U/µL)	0,125
10 mg/ml BSA	0,625
dH_2O	17,25
~20 ng template DNA	-
Toplam	**25**

Kullanılan Primerlerin dizilişleri şöyledir:

24F : 5'-AGAGTTTGATCTTGGCTCAG-3'

1525R :5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'

Thermalcycler cihazında (BioRad MJ Mini Marka) kullanılan program Çizelge 3.3'de verilmiştir.

Çizelge 3.3. PCR işlemi için kullanılan program

Program adımları	Sıcaklık (°C)	Süre (dk ve s)
İlk denatürasyon	94	4 dk
Denatürasyon	94	1 dk
Bağlanma	55	1 dk
Uzama	72	55 s
(2,3,4)x30 Döngü	-	-
Son uzama	72	7dk
Beklemede	4	Süresiz

PCR ürünleri %1 agaroz jelde, 1X TAE tamponu içinde DNA markırı ile 80 V'da 50 dk boyunca yürütülerek değerlendirilditen sonra PureLinkTM Quik PCR purification kit ile saflaştırılarak Macrogen (Güney Kore) şirketinin aracığıyla her iki DNA dizi analizi yaptırıldı. Elde edilen sekans verileri BioEdit program ile birleştirildikten sonra BLASTN 2.2.26+ programı kullanılarak, GenBank'ta olan türlerle karşılaştırılarak, sekans verilerinin girişi gerçekleştrildi.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Virülanslık Test Sonucu

RK-1248 kodlu izolatı virülanslıktestlerinde inokülasyondan sonraki 8-10 gün içinde domates fidelerinde inokülasyon bölgesinde kahverengilikler, yapraklarda ve dallarda solgunluk (Şekil 4.1) oluşturmuştur. Negatif kontrol olarak saf su ile inoküle edilen fidelerde herhangi bir hastalık simptomu gözlenmemiştir. Tipik hastalık simptomu gösteren bitkilerden yapılan re-izolasyonlar sonucu izolat tekrar elde edilmiştir.



Şekil 4.1. Domates bitkisinde yapılan virülanslık testi
1) *Cmm* RK-1248; 2) Kontrol sdH2O

4.2. Potansiyel Biyoajan Bakterilerin *İn Vitro*'da Patojene Karşı Test Sonuçları

Bu çalışmada toplam 1150 antagonist adayı *Cmm*'e karşı *in vitro* biyolojik mücadele potansiyeli açısından test edilmiştir (Çizelge 4.1, Çizelge 4.2 ve Şekil 4.2). Çalışmada kullanılan potansiyel biyoajan bakteri cinslerinin toplam izolat sayıları, bakteriyostatik ve bakteriyosidal etkilerinin zon ölçüm değerleri (mm) ve etkili bulunan toplam izolat sayıları Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Çalışmada kullanılan potansiyel biyoajan bakterilerin patojene karşı etkinlik test sonuçları

Sıra	Bakteri cinsleri	TS	ES	BST	BSD	Sıra	Bakteri cinsleri	TS	ES	BST	BSD
1	*Bacillus* sp.	301	27	0-16	19-33	**40**	*Hafnia* sp.	3	0	0	0
2	*Pseudomonas* sp.	126	3	0-15	21-38	**41**	*Janthinobacterium* sp.	3	1	10	26
3	*Stenetrophomonas* sp.	71	0	0	0	**42**	*Neisseria* sp.	3	0	0	0
4	*Panteoa* sp.	54	2	0-10	24-26	**43**	*Photobacterium* sp.	3	0	0	0
5	*Arthrobacter* sp.	34	0	0	0	**44**	*Weeksella* sp.	3	0	0	0
6	*Enterobacter* sp.	34	0	0	0	**45**	*Curtobacterium* sp.	2	0	0	0
7	*Micrococcus* sp.	34	0	0	0	**46**	*Deinococcus* sp.	2	0	0	0
8	*Serratia* sp.	30	0	0	0	**47**	*Kluyvera* sp.	2	0	0	0
9	*Paenibacillus* sp.	39	1	10	24	**48**	*Lysobacter* sp.	2	0	0	0
10	*Alcaligenes* sp.	25	0	0	0	**49**	*Proteus* sp.	2	0	0	0
11	*Salmonella* sp.	27	0	0	0	**50**	*Psychrobacter* sp.	2	0	0	0
12	*Brevibacillus* sp.	27	1	12	22	**51**	*Ralstonia* sp.	2	0	0	0
13	*Chryseobacterium* sp.	28	1	8	23	**52**	*Shewanella* sp.	2	0	0	0
14	*Kocuria* sp.	23	2	0-11	27-29	**53**	*Streptoverticillium* sp.	2	0	0	0
15	*Burkholderia* sp.	19	1	14	28	**54**	*Acetobacter* sp.	1	0	0	0
16	*Acinetobacter* sp.	24	0	0	0	**55**	*Acidovorax* sp.	1	0	0	0
17	*Erwinia* sp.	18	0	0	0	**56**	*Aerococcus* sp.	1	0	0	0
18	*Leclercia* sp.	13	0	0	0	**57**	*Bordetella* sp.	1	0	0	0
19	*Vibrio* sp.	13	0	0	0	**58**	*Cellulosimicrobium* sp.	1	0	0	0
20	*Yersinia* sp.	15	1	15	28	**59**	*Colwellia* sp.	1	0	0	0
21	*Agrobacterium* sp.	10	0	0	0	**60**	*Delftia* sp.	1	0	0	0
22	*Kelpsiella* sp.	10	0	0	0	**61**	*Dermabacter* sp.	1	0	0	0
23	*Staphilococcus* sp.	15	0	0	0	**62**	*Dunganella* sp.	1	0	0	0
24	*Pseudoalteromonas* sp.	10	0	0	0	**63**	*Edwardsiella* sp.	1	0	0	0
25	*Sphingobacterium* sp.	11	0	0	0	**64**	*Escherichia* sp.	1	0	0	0
26	*Brevibacterium* sp.	8	2	0-23	26-29	**65**	*Geobacillus* sp.	1	0	0	0
27	*Micobacterium* sp.	7	1	12	27	**66**	*Hydrogenophaga* sp.	1	0	0	0
28	*Photorhabdus* sp.	7	0	0	0	**67**	*Kytococcus* sp.	1	0	0	0

Çizelge 4.1. (devam)

Sıra	Bakteri cinsleri	TS	ES	BST	BSD	Sıra	Bakteri cinsleri	TS	ES	BST	BSD
29	*Achromobacter* sp.	8	0	0	0	**68**	*Methylobacterium* sp.	1	0	0	0
30	*Myroides* sp.	7	0	0	0	**69**	*Pediococcus* sp.	1	0	0	0
31	*Aeromonas* sp.	11	2	0-15	20-28	**70**	*Providencia* sp.	1	0	0	0
32	*Kurthia* sp.	7	0	0	0	**71**	*Pseudoxanthomonas* sp.	1	0	0	0
33	*Bergeyella* sp.	4	0	0	0	**72**	*Rahnella* sp.	1	0	0	0
34	*Brevundimonas* sp.	5	0	0	0	**73**	*Rhodococcus* sp.	1	0	0	0
35	*Chromobacterium*sp.	4	0	0	0	**74**	*Rothia* sp.	1	0	0	0
36	*Flavobacterium* sp.	4	0	0	0	**75**	*Shigella* sp.	1	0	0	0
37	*Actinomadura* sp.	3	0	0	0	**76**	*Sphingomonas* sp.	1	0	0	0
38	*Cellulomonas* sp.	3	0	0	0	**77**	*Variovorax* sp.	1	0	0	0
39	*Citrobacter*sp.	3	0	0	0	**78**	*Zobellia* sp.	1	0	0	0
Test edilen ve etkili bulunan toplam bakteri izolat sayıları								**1150**		**48**	

TS: cinslerinin toplam izolat sayıları, BST: bakteriyostatik, BSD: bakteriyosidal, ES: etkili bulunan toplam izolat sayıları ve etkilerinin zon ölçüm değerleri (mm)

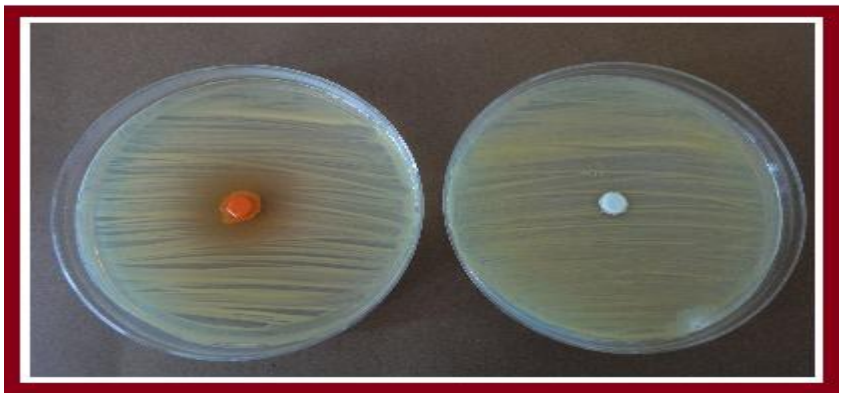
In vitro test sonuçlarına göre; 48 izolat bakteriyostatik ve bakteriyosidal olarak *Cmm*'in koloniyal gelişimini başarıyla engellemiştir. Bakteriyostatik ölçüm değerleri 0-16 mm ve bakteriyosidal ölçüm değerleri 0-38 mm arasında saptanmıştır. Etkili bulunan toplam izolat sayıları en çok *Bacillus* türlerine ait olduğu saptanmistir.

Çizelge 4.2. Çalışmada kullanılan potansiyel biyoajan bakteri izolatlarının NBYA besi yerinde ortalama zon çapları

Sıra	Uygulamalar	Ort. Zon Çapı (mm)*	Sıra	Uygulamalar	Ort. Zon Çapı (mm)*
1	PM-25	29,0±0.21b-f	**25**	RK-1253	23,0±0.11e-m
2	PM-17	29,3±0.19b-e	**26**	RK-32	24,0±0.12e-m
3	PM-16	29,3±0.21b-e	**27**	RK-307	26,6±0.17c-l
4	PM-34	28,0±0.17 b-h	**28**	RK-324	22,0±0.12f g-m
5	PM-20	26,0±0.17e-m	**29**	TV-99E	27,3±0.15b-j
6	PM-19	29,0±0.25 b-f	**30**	TV-47B	23,0±0.14e-m
7	PM-24	27,6±0.19b-i	**31**	DKG	24,6±0.11e-m
8	TV-131D	26,6±0.15c-l	**32**	TV-85D	33,6±0.32ab
9	TV-6G	27,0±0.18b-k	**33**	RK-306	23,3±0.11e-m
10	TV-10F	26,3±0.14d-m	**34**	RK-387	22,0±0.10f-m
11	TV-45E	24,0±0.15e-m	**35**	RK-413	21,6±0.12g-m
12	TV-96D	24,6±0.13e-m	**36**	RK-435	25,6±0.11e-m
13	TV-36D	28,6±0.20b-f	**37**	RK-447	21,3±0.09h-m
14	PM-18	38,3±0.32a	**38**	TV-8C	19,6±0.08m
15	RK-308	28,3±0.19b-g	**39**	TV-14C	27,6±0.16b-i
16	PM-23	29,3±0.22b-e	**40**	TV-15B	33,3±0.35a-c
17	PM-15	29,6±0.19b-e	**41**	TV-13C	28,6±0.16b-f
18	TV-3C	26,6±0.14c-l	**42**	TV-130B	20,6±0.19j-m
19	TV-124C	23,0±0.12e-m	**43**	TV-91D	23,6±0.21e-m
20	TV-1D	24,6±0.15e-m	**44**	TV-92C	20,3±0.17k-m
21	TV-17C	20,0±0.12lm	**45**	TV-49A	33,3±0.31a-c
22	RK-394	23,3±0.14e-m	**46**	TV-67C	21,0±i-m
23	RK-339	24,3±0.12e-m	**47**	TV-87D	22,6±e-m
24	RK-340	33,0±0.26a-d	**48**	RK-347	26,6±c-l

*Sütun içerisinde aynı harfler ile gösterilen uygulamalar arasında fark önemli değildir (Duncan çoklu karşılaştırma testi, $p \leq 0.01$).

En yüksek engelleme zonunu PM-18 kodlu izolat 38,3 mm oluştururken, en düşüğünü ise TV-8C kodlu izolat (19,6 mm) oluşturmuştur. Bu test sonuçlarına göre; engelleme zonu oluşturma potansiyellerine bakılarak 48 izolat viyoltestinde kullanılmak üzere seçilmiştir.



Şekil 4.2. *Cmm*'e karşı test edilen potansiyel biyoajan bakterilerin test sonucu

4.3. Potansiyel Biyoajan Bakterilerin Mikrobial İdentifikasyon Sisteminde Tanı Sonuçları

In vitro çalışmalarda etkili bulunan potansiyel biyoajan bakterilerin yağ asit metil ester analizleri yapılarak tanılanmıştır. İzolatların MIS sonuçları ve onlara ait benzerlik indeksleri Çizelge 4.3'de verilmiştir.

Çizelge 4.3. Potansiyel biyoajan bakterilerin MIS sonuçları ve benzerlik indeksleri (**Bİ**)

İzolat Adı	MIS sonuç	Bİ	İzolat Adı	MIS sonuç	Bİ
TV-1D	*Bacillus megaterium*	0,387	RK-308	*Burkholderia pyrrocinia*	0,491
TV-87D	*Bacillus laevolacticus*	0,404	TV-92C	*Aeromonas salmonicida*	0,145
TV-10F	*Bacillus laevolacticus*	0,117	PM-16	*Bacillus subtilis*	0,697
PM-15	*Bacillus subtilis*	0,675	RK-1253	*Bacillus atrophaeus*	0,469
DKG	*Peanibacillus alvei*	0,439	PM-23	*Bacillus megaterium*	0,508
RK-447	*Bacillus subtilis*	0,901	TV-15B	*Bacillus atrophaeus*	0,468
TV-49A	*Bacillus megaterium*	0,577	RK-307	Tanılanamadı	-
TV-3C	*Bacillus pumilus*	0,464	TV-8C	*Bacillus pumilus*	0,464
RK-347	*Janithobacterium lividum*	0,576	TV-17C	*Bacillus subtilis*	0,677
TV-85D	*Bacillus cereus*	0,114	TV-96D	*Bacillus cereus*	0,563
PM-20	*Brevibacterium epidermis*	0,598	RK-435	*Bacillus megaterium*	0,703
RK-339	*Bacillus subtilis*	0,767	RK-32	*Pantoea agglomerans*	0,835
TV-6G	*Microbacterium flavescens*	0,169	TV-36D	*Aeromonas salmonicida*	0,215
PM-34	*Yersinia aldovae*	0,476	TV-124C	*Chryseobacterium balustinum*	0,101

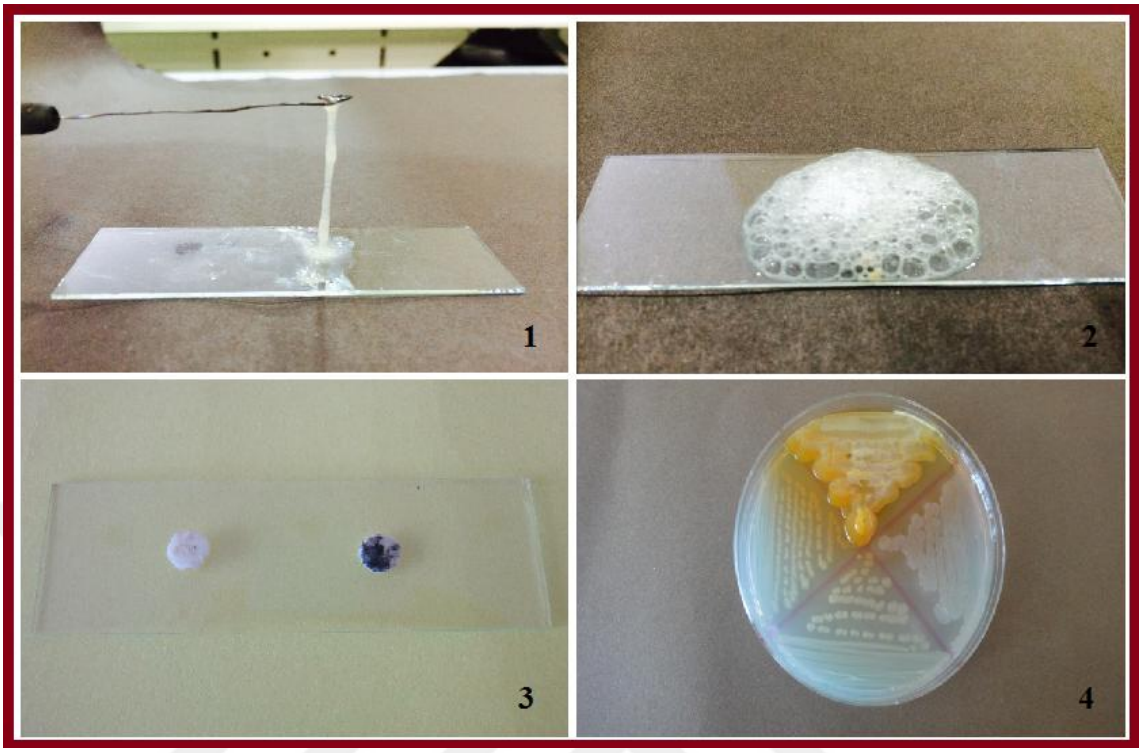
Çizelge 4.3. (devam)

İzolat Adı	MIS sonuç	Bİ	İzolat Adı	MIS sonuç	Bİ
TV-47B	*Bacillus atrophaeus*	0,287	RK-324	*Brevibacillus brevis*	0,215
TV-67C	*Bacillus pumilus*	0,630	PM-17	*Brevibacterium epidermis*	0,729
TV-91D	*Bacillus megaterium*	0,093	RK-387	*Pseudomonas putida*	0,299
RK-340	*Bacillus lentimorbus*	0,595	RK-394	Tanılanamadı	-
PM-25	*Bacillus cereus*	0,155	PM-19	*Kocuria rosea*	0,157
RK-306	Tanılanamadı	-	RK-413	*Pseudomonas putida*	0,797
TV-45E	*Bacillus atrophaeus*	0,518	TV-99E	*Bacillus megaterium*	0,524
TV-131D	*Pantoea agglomerans*	0,042	PM-24	*Bacillus cereus*	0,429
TV-14C	*Kocuria rosea*	0,695	PM-18	*Pseudomonas chlororaphis*	0,205
TV-13C	*Bacillus megaterium*	0,595	TV-130B	*Bacillus subtilis*	0,683

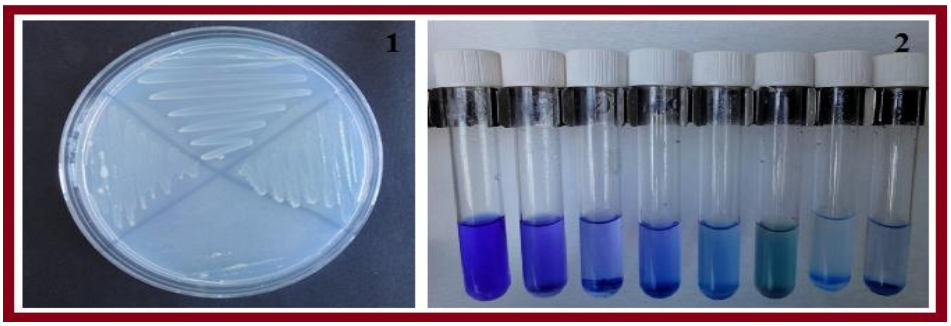
MIS sonuçlarına göre; 27 izolat *Bacillus*, 3 izolat *Pseudomonas*, 3 izolat *Brevibacterium*, 2 izolat *Pantoea*, 2 izolat *Kocuria*, 2 izolat *Aeromonas*, 1 izolat *Paenibacillus*, 1 izolat *Janithobacterium*, 1 izolat *Microbacterium*, 1 izolat *Yersinia*, 1 izolat *Burkholderia* ve 2 izolat *Chryseobacterium* cinsine ait tanılanmıştır. Yağ asit analizlerine göre yapılan tanıda izolatlarımız 0,042-0,901 benzerlik oranıyla (Bİ) tanıları yapılmıştır.

4.4. Potansiyel Biyoajan Bakterilerin Biyokimyasal Test Sonuçları

Biyoajan bakterilerin biyokimyasal test (KOH, katalaz, oksidaz, Levan, ACC, azot fiksasyonu ve fosfor çözücü tespit testi) sonuçları Çizelge 4.4'de; bu testlere ait görseller ise Şekil4.3 ve Şekil 4.4'de verilmiştir.



Şekil 4.3. Potansiyel biyoajan bakterilerin biyokimyasal test sonuçları
1) Potasyum hidroksit testi; 2) Katalaz testi; 3) Oksidaz testi; 4) Levan testi



Şekil 4.4. 1) Azot fiksasyonunu test sonucu ve 2) Fosfat çözünürlüğü test sonucu

Çizelge 4.4. Biyoajan bakterilerin biyokimyasal test sonuçları

Bakteri türü	İzolat No	Biyokimyasal Testler						
		KOH	Katalaz	Oksidaz	Levan	ACC[1]	Azot	Fos[2]
Bacillus megaterium	TV-1D	-	+	-	-	L	+	1
Bacillus laevolacticus	TV-87D	-	+	-	-	L	+	1
Bacillus laevolacticus	TV-10F	-	+	-	-	L	+	1
Bacillus subtilis	PM-15	-	+	-	-	L	+	1
Paenibacillus alvei	DKG	-	+	-	-	L	+	1
Bacillus subtilis	RK-447	-	+	+	-	L	+	2
Bacillus megaterium	TV-49A	-	+	-	-	H	+	4
Bacillus pumilus	TV-3C	-	+	-	-	L	+	3
Janithobacterium lividum	RK-347	+	+	-	-	L	+	1
Bacillus cereus	TV-85D	-	+	-	-	H	+	4
Brevibacterium epidermis	PM-20	-	+	-	-	L	+	3
Bacillus subtilis	RK-339	-	+	-	-	L	+	1
Micobacterium flavescens	TV-6G	-	+	-	-	L	+	1
Yersinia aldovae	PM-34	+	+	-	-	L	-	0
Bacillus atrophaeus	TV-47B	-	+	-	-	L	+	1
Bacillus pumilus	TV-67C	-	+	-	-	L	+	1
Bacillus megaterium	TV-91D	-	+	-	-	L	+	4
Bacillus lentimorbus	RK-340	-	+	-	-	M	+	1
Bacillus cereus	PM-25	-	+	-	-	L	+	2
Tanılanamadı	RK-306	-	+	-	-	L	+	1
Bacillus atrophaeus	TV-45E	-	+	-	-	L	+	1
Pantoea agglomerans	TV-131D	+	+	+	-	L	+	4
Kocuria rosea	TV-14C	-	+	-	-	M	+	3
Bacillus megaterium	TV-13C	-	+	-	-	M	+	2
Burkholderia pyrrocinia	RK-308	+	+	-	-	L	+	3
Aeromonas salmonicida	TV-92C	+	+	-	-	L	+	0
Bacillus subtilis	PM-16	-	+	-	-	L	+	2
Bacillus atrophaeus	RK-1253	-	+	+	-	L	+	1
Bacillus megaterium	PM-23	-	+	-	-	L	+	2
Bacillus atrophaeus	TV-15B	-	+	-	-	H	+	2
Tanılanamadı	RK-307	-	+	-	-	L	+	2
Bacillus pumilus	TV-8C	-	+	-	-	L	+	1
Bacillus subtilis	TV-17C	-	+	-	-	L	+	1
Bacillus cereus	TV-96D	-	+	-	-	L	+	2
Bacillus megaterium	RK-435	-	+	-	-	M	+	6
Pantoea agglomerans	RK-32	+	+	-	-	M	+	2
Aeromonas salmonicida	TV-36D	+	+	-	-	M	+	0
Chryseobacterium balustinum	TV-124C	+	+	-	-	M	+	4
Brevibacillus brevis	RK-324	-	+	+	-	M	+	0
Brevibacterium epidermis	PM-17	-	+	-	-	M	+	1
Pseudomonas putida	RK-387	+	+	-	-	M	+	1

Çizelge 4.4. (devam)

Bakteri türü	İzolat No	Biyokimyasal Testler						
		KOH	Katalaz	Oksidaz	Levan	ACC[1]	Azot	Fos[2]
Tanılanamadı	RK-394	-	+	-	-	M	+	1
Kocuria rosea	PM-19	-	+	-	-	M	+	2
Pseudomonas putida	RK-413	+	+	-	-	M	+	4
Bacillus megaterium	TV-99E	-	+	-	-	H	+	4
Bacillus cereus	PM-24	-	+	-	-	H	+	2
Pseudomonas chlororaphis	PM-18	+	+	-	+	H	+	5
Bacillus subtilis	TV-130B	-	+	-	-	H	+	2

ACC[1]: (OD>0.15) Grub-H; (OD 0.15-0.10) Grub-M, ve (OD <0.10) Grub-L, Fos (Fosfat)[2]: **0**: Negatif , **1**: Zayıf pozitif, **2**: Pozitif , **3**: Kuvvetli pozitif;**+**: Pozitif, -: Negatif

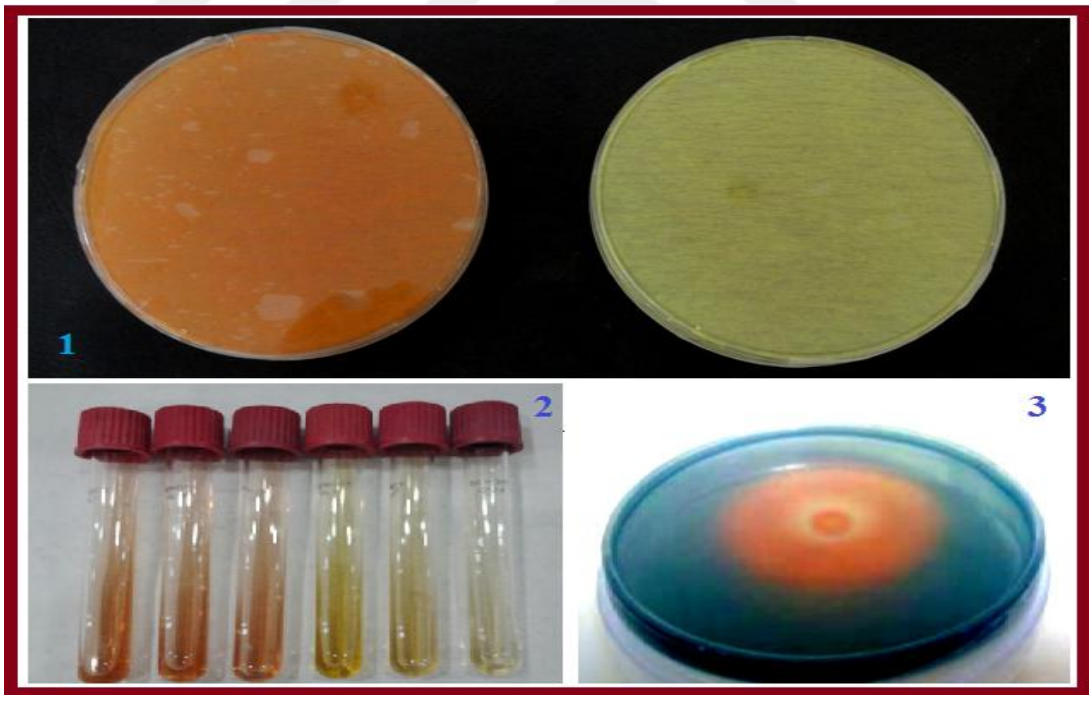
KOH testi sonucunda özeye yapışarak sümüksü bir yapı oluşturmayan izolatlar gram pozitif olarak, özeye yapışarak sümüksü bir yapı oluşturan izolatlar ise gram negatif olarak değerlendirilmiştir. *Bacillus, Paenibacillus, micobacterium, Kokuria, Brevibacillus* ve *Brevibacterium* türleri test sonucunda sümüksü bir yapı oluşturduğundan gram negatif olarak kabul edilmiştir. *Janithobacterium, Yersinia, Pantoea, Burkholderia, Aeromonas, Chryseobacterium* ve *Pseudomonas*türleri ise test sonucunda sümüksü bir yapı oluşturmadıklarından gram pozitif olarak kabul edilmiştir. Katalaz enzimin varlık veya yokluğunu kabarcık oluşumu katalaz pozitif, oluşmaması ise katalaz negatif olarak değerlendirilmiştir. Bu çalışmada izolatların hepsi %3'lük H_2O_2 döküldüğünde birkaç saniye içersinde gaz kabarcıkları gösterdikleri icin pozitif olarak kabul edilmiştir. Oxidaz testi sonucunda mavimsi-mor renk, değişiminin oluşması pozitif, oluşmaması ise negatif olarak kabul edilmiştir. 44 izolat hiçbir renk değişimi meydana getirmediğinden oksidaz negatif olarak değerlendirilmiştir, RK-447, TV-131D, RK-1253 ve PM-18 izolatları oksidaz pozitif olarak değerlendirilmiştir. Levan testinde izolatların sukrozu kullanması sonucu oluşan konveks, mukoid koloniler levan pozitif, konveks ve mukoid yapıda olmayan koloniler ise levan negatif olarak değerlendirilmiştir. Bu test sonucunda sadece PM-18 izolatı pozitif çıkmıştır.

Biyoajan bakterilerin ACCD'i bir azot kaynağı olarak bakteri kullanması sonucunda gelişen izolatlar hücre yoğunluğuna (OD_{600}) dayanarak 3 grubaayrılmıştır. TV-99E, TV-

130B, TV-15B, TV-85D, TV-49A, PM-24 ve PM-18 en fazla gelişme göstererek (OD>0.15) Grup-H olarak kategorize edilmişlerdir, 13 izolat orta derecede gelişim (OD 0.15-0.10) göstererek Grup-M'de yer almışlar ve en az büyüme gösteren 28 izolat ise(OD <0.10) Grup-L'de yer almıştır. Elde edilen sonuçlara göre 48 izolattan 47 tanesi pozitif sonuç vermiş olup sadece PM-34 izolatının negatif sonuç verdiği tespit edilmiştir. Fosfat çözünürlüğü test sonuçlara göre 48 izolattan 34 tanesi pozitif 4 taneside negatif olarak belirlenmiştir.

4.5. Potansiyel Biyoajan Bakterilerin Metabolit Test Sonuçları

Potansiyel biyoajan bakterilerin metabolit aktivitelerine (HCN Şekil 4.5 (1), IAA Şekil 4.5 (2), Siderofor Şekil 4.5 (3) ve salisilik asit) ait sonuçlar Çizelge 4.5'de verilmiştir.



Şekil 4.5. 1) Hidrojen Siyanid (HCN) testi; 2) İndol Asetik Asit (IAA) testi; 3) Siderofor üretimi

Çizelge 4.5. Potansiyel biyoajan bakterilerin metabolit test sonuçları

Bakteri türü	**İzolat No**	**Metabolit testler**			
		HCN	**IAA (µg/ml)**	**Sid***	**Sal****
Bacillus megaterium	TV-1D	-	0,175	+	0,059
Bacillus laevolacticus	TV-87D	-	0,257	+	0,047
Bacillus laevolacticus	TV-10F	-	0,417	+	0,041
Bacillus subtilis	PM-15	-	0,210	+	0,055
Paenibacillus alvei	DKG	-	0,297	-	0,101
Bacillus subtilis	RK-447	-	0,169	-	0,038
Bacillus megaterium	TV-49A	-	0,833	+	0,177
Bacillus pumilus	TV-3C	-	0,134	-	0,061
Janithobacterium lividum	RK-347	-	0,297	-	0,033
Bacillus cereus	TV-85D	-	0,959	+	0,181
Brevibacterium epidermis	PM-20	-	0,296	-	0,062
Bacillus subtilis	RK-339	-	0,353	-	0,044
Micobacterium flavescens	TV-6G	-	0,318	-	0,065
Yersinia aldovae	PM-34	-	0,121	-	0,051
Bacillus atrophaeus	TV-47B	-	0,239	-	0,031
Bacillus pumilus	TV-67C	-	0,279	-	0,028
Bacillus megaterium	TV-91D	-	0,118	-	0,067
Bacillus lentimorbus	RK-340	-	0,302	-	0,154
Bacillus cereus	PM-25	-	0,092	-	0,064
Tanılanamadı	RK-306	-	0,168	-	0,075
Bacillus atrophaeus	TV-45E	-	0,374	-	0,101
Pantoea agglomerans	TV-131D	-	0,093	-	0,063
Kocuria rosea	TV-14C	-	0,520	-	0,161
Bacillus megaterium	TV-13C	-	0,527	-	0,159
Burkholderia pyrrocinia	RK-308	-	0,172	-	0,052
Aeromonas salmonicida	TV-92C	-	0,138	-	0,046
Bacillus subtilis	PM-16	-	0,275	-	0,088
Bacillus atrophaeus	RK-1253	-	0,321	-	0,079
Bacillus megaterium	PM-23	-	0,100	-	0,103
Bacillus atrophaeus	TV-15B	-	0,622	-	0,170
Tanılanamadı	RK-307	-	0,124	-	0,039

Çizelge 4.5. (devam)

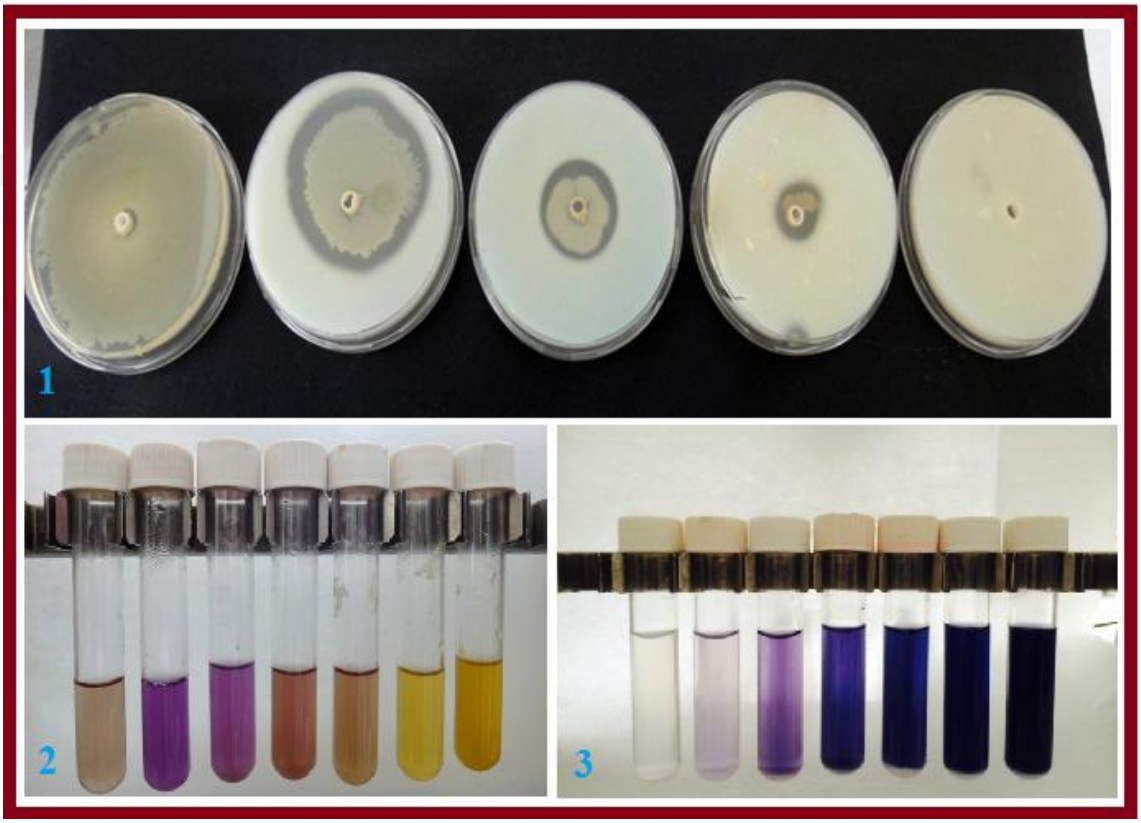
Bakteri türü	İzolat No	Metabolit testler			
		HCN	IAA (µg/ml)	Sid*	Sal**
Bacillus pumilus	TV-8C	-	0,139	-	0,066
Bacillus subtilis	TV-17C	-	0,357	-	0,073
Bacillus cereus	TV-96D	-	0,152	-	0,032
Bacillus megaterium	RK-435	-	0,092	-	0,051
Pantoea agglomerans	RK-32	-	0,506	-	0,067
Aeromonas salmonicida	TV-36D	-	0,146	-	0,034
Chryseobacterium balustinum	TV-124C	-	0,201	-	0,065
Brevibacillus brevis	RK-324	-	0,242	-	0,026
Brevibacterium epidermis	PM-17	-	0,321	-	0,039
Pseudomonas putida	RK-387	-	0,112	-	0,056
Tanılanamadı	RK-394	-	0,138	-	0,055
Kocuria rosea	PM-19	-	0,216	-	0,029
Pseudomonas putida	RK-413	-	0,110	-	0,078
Bacillus megaterium	TV-99E	-	0,132	-	0,065
Bacillus cereus	PM-24	-	0,139	-	0,087
Pseudomonas chlororaphis	PM-18	+	0,726	+	0,189
Bacillus subtilis	TV-130B	-	0,108	-	0,096

*Sid (Siderofor), **Sal (Salisilik asit) = OD527, +: Sonuç pozitif, -: Sonuç negative

Biyoajan bakterilerin yapılan metabolit aktivite testleri sonucunda sadece PM-18 izolatı, HCN pozitif olarak belirlenmiştir. IAA testi sonucunda 0,092–0,959 µg/ml arasında değişen souçlar elde edilmiştir, TV-85D izolatı en güçlü ve PM-25 ve RK-435 izolatlarıise en zayıf izolatlar olarak tespit edilmiştir. Bu çalışmada siderofor üretimi sadece PM-18 izolatında görüntülenmiştir. Salisilik asit testi sonucunda 0,038-0,189 (OD 527) arasında değişen souçlar elde edilmiştir. PM-18 izolatı en güçlü, RK-447 izolatı ise en zayıf izolatlar olarak tespit edilmiştir.

4.6. Potansiyel Biyoajan Bakterilerin Enzim Aktivitesinin Sonuçları

Çalışmada kullanılan izolatlar tarafından bölüm 3.2.6'da açıklanan kitinaz, amilaz (Şekil 4.6 (1)), proteaz (Şekil 4.6 (2)), lizin dekarboksilaz (Şekil 4.6 (3)), fitaz ve lipaz enzimlerinin üretilip üretilmediği test edilmiştir (Çizelge 4.6).



Şekil 4.6. 1) Proteaz testi sonucunda potansiyel biyoajan bakterilerin oluşturduğu zonlar; 2) Lisin dekarboksilaz testi sonucunda pozitif ve negatif olarak değerlendirilen potansiyel biyoajan bakteriler; 3) Amilaz testi sonucunda potansiyel biyoajan bakterilerin amilaz üretme durumu

Çizelge 4.6. Çalışmada kullanılan potansiyel biyoajan bakterilerin enzim aktivite sonuçları

Bakteri türü	İzolat No	Bakterilerin Enzim Aktivitesi					
		Lip[1]	Ami[2]	Pro[1]	Lizi [2]	Fit[3]	Kit[4]
Bacillus megaterium	TV-1D	0	0	2	1	0,188	0,268
Bacillus laevolacticus	TV-87D	2	2	1	4	0,167	0,151
Bacillus laevolacticus	TV-10F	2	4	2	6	0,148	0,180
Bacillus subtilis	PM-15	3	1	3	1	0,148	0,125
Paenibacillus alvei	DKG	2	0	1	5	0,164	0,342
Bacillus subtilis	RK-447	3	3	2	2	0,159	0,127
Bacillus megaterium	TV-49A	1	2	2	2	0,080	0,317
Bacillus pumilus	TV-3C	1	1	2	2	0,202	0,186
Janithobacterium lividum	RK-347	2	6	1	3	0,205	0,159
Bacillus cereus	TV-85D	3	1	1	4	0,163	0,120
Brevibacterium epidermis	PM-20	2	1	3	4	0,156	0,080
Bacillus subtilis	RK-339	2	1	1	5	0,274	0,060
Micobacterium flavescens	TV-6G	2	1	2	6	0,159	0,219
Yersinia aldovae	PM-34	3	2	0	6	0,142	0,189
Bacillus atrophaeus	TV-47B	2	3	3	4	0,169	0,133
Bacillus pumilus	TV-67C	1	0	1	4	0,131	0,113
Bacillus megaterium	TV-91D	3	4	0	5	0,097	0,122
Bacillus lentimorbus	RK-340	2	1	1	0	0,248	0,173
Bacillus cereus	PM-25	3	6	2	1	0,196	0,133
Tanılanamadı	RK-306	0	0	2	2	0,339	0,182
Bacillus atrophaeus	TV-45E	2	3	1	3	0,187	0,164
Pantoea agglomerans	TV-131D	2	2	0	3	0,126	0,171
Kocuria rosea	TV-14C	1	5	2	5	0,186	0,198
Bacillus megaterium	TV-13C	2	4	2	4	0,125	0,144
Burkholderia pyrrocinia	RK-308	0	1	2	1	0,108	0,139
Aeromonas salmonicida	TV-92C	3	1	0	5	0,157	0,167
Bacillus subtilis	PM-16	3	1	2	3	0,156	0,142
Bacillus atrophaeus	RK-1253	1	0	1	6	0,158	0,178
Bacillus megaterium	PM-23	3	1	0	3	0,090	0,170
Bacillus atrophaeus	TV-15B	2	1	1	5	0,160	0,175
Tanılanamadı	RK-307	0	0	1	3	0,173	0,194
Bacillus pumilus	TV-8C	1	4	0	4	0,152	0,165
Bacillus subtilis	TV-17C	1	3	3	6	0,134	0,116
Bacillus cereus	TV-96D	3	2	1	0	0,142	0,159
Bacillus megaterium	RK-435	1	6	1	2	0,230	0,181

Çizelge 4.6. (devam)

Bakteri türü	İzolat No	Bakterilerin Enzim Aktivitesi					
		Lip[1]	Ami[2]	Pro[3]	Lizi[4]	Fit[5]	Kit[6]
Pantoea agglomerans	RK-32	0	1	0	4	0,186	0,184
Aeromonas salmonicida	TV-36D	3	1	0	6	0,185	0,146
Chryseobacterium balustinum	TV-124C	2	6	3	5	0,179	0,074
Brevibacillus brevis	RK-324	1	2	2	0	0,349	0,195
Brevibacterium epidermis	PM-17	1	0	3	4	0,172	0,196
Pseudomonas putida	RK-387	1	3	1	1	0,103	0,174
Tanılanamadı	RK-394	1	2	2	3	0,179	0,144
Kocuria rosea	PM-19	1	1	3	3	0,190	0,142
Pseudomonas putida	RK-413	2	4	0	5	0,132	0,163
Bacillus megaterium	TV-99E	3	1	2	2	0,119	0,133
Bacillus cereus	PM-24	3	0	1	1	0,185	0,146
Pseudomonas chlororaphis	PM-18	3	6	3	4	0,189	0,186
Bacillus subtilis	TV-130B	1	2	2	2	0,284	0,200

1) Lip: lipaz, 2) Ami: amilaz, 3) Pro: proteaz, 4) Lizi: lizin dekarboksilaz, 5) Fit:fitaz ve 6) Kit: kitinaz; Lip ve Proskala değerleri 0: Negatif , 1: Zayıf pozitif, 2: Pozitif , 3: Kuvvetli pozitif; Ami ve Lizi skala değerleri 0: Negatif , 1 ve 2: Zayıf pozitif, 3 ve 4: Pozitif, 5 ve 6: Kuvvetli pozitif; Fit: OD_{700}; Kit: OD_{540}

Bu çalışmada lipaz enziminin üretilmesi sonucunda 5 izolat (RK-32, RK-306, RK-307, RK-308 ve TV-1D) için bu enzimi üretilmediği görülmüştür. Amilaz enziminde 8 izolat (PM-17, PM-24, TV-1D, TV-67C, DKG, RK-306, RK-307 ve RK-1253) negatif sonuç vermiş ve 5 izolat (RK-347, RK-435, PM-18, PM-25 ve TV-124C) ise en yuksek oranda bu enzimi üretmeleri saptanmıştır. Proteaz enziminde 9 izolat (RK-32, RK-413, PM-23, PM-34, TV-8C, TV-36D, TV-91D, TV-92C ve TV-131D) için bu enzimi üretilmediği görülmüştür. Lizin dekarboksilaz enziminde 3 izolat (RK-324, RK-340 ve TV-96D) negatif sonuç vermiştir. Fitaz enziminde bütün izolatların üretebildiği miktar 0,080-0,349 arasında olmuş, TV-49A izolatı zayıf ve RK-324 izolatı ise güçlü izolat olarak belirlenmiştir. Kitinaz enzimi üretilmesi sonucunda bütün izolatların üretebildiği miktar 0,060-0,342 arasında olmuş, RK-339 izoltında zayıf ve DKG izolatında ise güçlü olarak saptanmıştır.

4.7. Viyol Deneme Sonuçları

Cmm'ye karşı potansiyel biyoajan bakterilerintarafından engelleme yeteneğinin belirlenmesi için viyol denemeleri yapılmıştır (Şekil 4.7). Negatif kontrol olarak sadece su uygulaması yapılan bitkilerde ise herhangi bir hastalık simptomu gözlenmemiştir (Şekil 4.8). Solgunluğun skalası ve uygulamaların etkinliği Çizelge 4.7'de verilmiştir.



Şekil 4.7. Viyol denemesineait genel bir görünüm



Şekil 4.8. Viyol denemelerinden bir görünüm (1:TV-49A izolatı, 2:Negatif kontrol, 3:Pozitif kontrol)

Çizelge 4.7. Biyoajanların viyol çalışmasında domates bakteriyel solgunluk hastalığını engelleme oranları

Uygulamalar	Skala*	% Etki	Uygulamalar	Skala*	% Etki
PM-25	3,6±0,04 a-c	21,7	RK-1253	2,6±0,02 b-e	43,3
PM-17	3,6±0,04 a-c	21,7	RK-32	4,0±0,04a-c	13,0
PM-16	2,6±0,02b-e	43,4	RK-307	2,3±0,02 c-f	50,0
PM-34	3,3±0,03 a-c	28,2	RK-324	3,6±0,04 a-c	21,7
PM-20	4,3±0,05 ab	6,5	TV-99E	2,6±0,02b-e	43,3
PM-19	4,0±0,04 a-c	13,0	TV-47B	3,0±0,03a-d	34,7
PM-24	3,0±0,03 a-d	34,7	DKG	2,3±0,02c-f	50,0
TV-131D	2,6 ±0,02b-e	43,4	TV-85D	0,6±0,01fg	86,9
TV-6G	4,0 ±0,04a-c	13,0	RK-306	3,6±0,04a-c	21,7
TV-10F	3,0±0,03 a-d	34,7	RK-387	3,6±0,04a-c	21.7
TV-26A2	3,6±0,04 a-c	21,7	RK-413	3,0±0,03a-d	34,7
TV-96D	3,6 ±0,04a-c	21,7	RK-435	4,0±0,04a-c	13,0
TV-129A2	3,3±0,03 a-c	28,2	RK-447	2,6±0,02b-e	43,3
PM-18	1,0±0,01 e-g	78,2	TV-8C	2,3±0,02c-f	50,0
RK-308	4,0±0,04 a-c	13,0	TV-14C	1,3±0,01d-g	71,7
PM-23	2,6 ±0,02b-e	43,4	TV-15B	1,0±0,01e-g	78,2
PM-15	3,6 ±0,04a-c	21,7	TV-13C	1,0±0,01e-g	78,2
TV-3C	2,3±0,02 c-f	50,0	TV-130B	2,6±0,02b-e	43,3
TV-124C	3,0±0,03 a-d	34,7	TV-91D	4,0±0,04a-c	13,0
TV-1D	3,6±0,04 a-c	21,7	TV-92C	2,6±0,02b-e	43,3
TV-17C	3,3±0,03a-c	28,2	TV-49A	0,3±0,01g	93,4
RK-394	3,3±0,03 a-c	28,2	TV-67C	3,3±0,03a-c	28,2
RK-339	2,3±0,02 c-f	50,0	TV-87D	3,0±0,03a-d	34,7
RK-340	1,3±0,01d-g	71,7	RK-347	3,6±0,04a-c	21,7
Pozitif Kontrol	4,6±0,05 a	-	Negatif kontrol	0,0±0,00 g	-

*Sütun içerisinde aynı harfler ile gösterilen uygulamalar arasında fark önemli değildir (Duncan çoklu karşılaştırma testi, $p \leq 0.01$)

Pozitif kontrol uygulamasındaki bitkilerin tümünde simptom gözlendikten sonra değerlendirme yapılmış ve kontroldeki hastalık şiddetinin ortalama 4,6 skala değerinde olduğu saptanmıştır. TV-49A ve TV-85D izolatlarının uygulamalarında *Cmm*'yi sırasıyla %93,4 ve %86,9 oranında baskıladığı tespit edilmiştir. Yapılan denemede *Cmm*'yi baskılamada en zayıf kalan izolat ise %6,5'lık oranıyla PM-20 izolatı olduğu belirlenmiştir. İstatistiki olarak da incelendiğinde TV-49A'in negatif kontrol ile aynı grupta yer alarak etkli olduğu saptanmıştır. Negatif kontrol olarak sadece su uygulaması yapılan bitkilerde ise hiçbir hastalık simptomu gözlenmemiştir.

4.8. Saksı Deneme Sonuçları

Viyol denemelerinde en etkili olan 7 bakteri (TV-49A, TV-85D, TV-13C, TV-15B, TV-14C, PM-18 ve RK-340) saksı çalışmaları için seçilimiştir (Çizelge 4.8). Negatif kontrol olarak sadece su uygulaması yapılan bitkilerde herhangi bir hastalık simptomu gözlenmemiştir. Hastalıklı ve sağlıklı bitkilere ait resimler Şekil 4.9'da verilmiştir. Yapılan sera denemelerinde potansiyel biyoajan bakterilerin bitki gelişimi üzerine etkisi değerlendirilmiştir (Çizelge 4.9).

Çizelge 4.8. Potansiyel biyoajan bakterilerin saksı çalışmasında domates bakteriyel solgunluk hastalığını engelleme oranları

Uygulamalar	**Skala***	**% Etki**
TV-85D	0,5±0,01b-d	89,3
TV-49A	0,2±0,01 bc	95,7
TV-13C	1,0±0,02 bc	78,7
TV-15B	0,7 ±0,01bc	85,1
TV-14C	1,5±0,02 b	68,0
PM-18	1,0±0,02bc	78,7
RK-340	1,2±0,02 bc	74,4
Negatif kontrol (Su)	0,0±0,00c	-
Pozitif kontrol (Patojen)	4,7±0,08 a	-

*Sütun içerisinde aynı harfler ile gösterilen uygulamalar arasında fark önemli değildir (Duncan çoklu karşılaştırma testi, $p \leq 0.01$)

Pozitif kontrol uygulamasındaki bitkilerin tümünde simptom gözlendikten sonra değerlendirme yapılmış ve kontroldeki hastalık şiddetinin ortalama 4,7 skala değerinde olduğu saptanmıştır. Uygulamalarda TV-49A ve TV-85D izolatlarının hastalığı sırasıyla %95,7 ve %89,3 oranında baskıladığı görülmüş ve istatistiki olarak pozitif kontrolden farklı olduğu belirlenmiştir. Yapılan denemede hastalık şiddetinin ortalama 0,2-1,5 (skala değeri) arasında olduğu saptanmıştır.



Şekil 4.9. Potansiyel biyoajan bakterilerin saksı denemeleri

Çizelge 4.9. Yapılan sera denemelerinde potansiyel biyoajan bakterilerin bitki gelişimi üzerine etki sonuçları

Değerlendirilen parametreler	Uygulamalara ait değerler								
	TV-85D	TV-49A	TV-13C	TV-15B	TV-14C	PM-18	RK-340	Pozitif kontrol	Negatif Kontrol
Bitki boyu (cm)*	65,8±0,67a	68,0±0,67a	54,4±0,55cd	59,8±0,56b	55,4±0,55c	65,5±0,66a	52,5±0,53cd	42,8±0,40e	52,1±0,52d
Gövde çapı (cm)*	4,6±0,04a	4,8±0,04a	4,0±0,04bc	4,2±0,04b	4,0±0,04bc	4,5±0,04a	4,0±0,04bc	3,2±0,03d	3,9±0,03c
Çiçek sayısı (Adet/bitki)*	31,7±0,33a	31,7±0,32a	31,5±0,32a	27,0±0,27b	25,0±0,23b	30,2±0,30a	26,2±0,26b	5,5±0,05d	19,7±0,20c
Yaprakta klorofil (SPAD)*	43,4±0,45b	46,4±0,45a	40,2±0,45c	41,2±0,41bc	39,8±0,39c	41,5±0,41bc	37,4±0,35d	29,3±0,24e	35,6±0,32d
Dalsayısı (Adet/bitki)*	16,0±0,15a	16,7±0,15a	14,2±0,13bc	15,5±0,14ab	14,0±0,13c	16,5±0,15a	13,5±0,12c	11,2±0,11d	13,7±0,12c
Meyve sayısı (Adet/bitki)*	27,5±0,24a	27,7±0,24a	27,2±0,24a	22,2±0,21b	20,0±0,19b	26,0±0,23a	22,5±0,21b	3,2±0,03d	15,2±0,12c
Meyve ağırlığı (g/ meyve)*	128,9±1,22a	133,7±1,27a	116,2±1,12ab	121,1±1,19ab	117,6±1,14ab	127,7±1,22a	88,0±0,85cd	69,7±0,71d	98,7±0,89bc
Yaş bitki ağırlığı (g/bitki)*	506,1±5,01a	500,6±5,o2a	476,9±4,55bc	487,4±4,60b	476,9±4,65bc	498,3±4,78a	473,5±4,63c	389,2±3,45e	462,2±4,54d
Kurubitki ağırlığı (g/bitki)*	208,2±2,11ab	211,4±2,14a	201,1±2,06cd	204,8±2,06c	201,5±1,94cd	206,3±1,95abc	198,7±1,91d	161,0±1,53f	185,7±1,71e
İlk çiçeklenme (gün)	52,2±0,61d	52,2±0,61d	53,7±0,62cd	53,0±0,62d	54,7±0,64cd	54,2±0,64cd	56,7±0,65c	74,0±0,81a	65,7±0,72b

*Aynı satır içerisinde aynı harfler ile gösterilen uygulamalar arasında fark önemli değildir (Duncan çoklu karşılaştırma testi, $p \leq 0.01$)

Yapılan saksı denemelerinde potansiyel biyoajan bakterilerin bitki boyuna olan etkisi değerlendirilmiştir. Yapılmış olan denemede TV-49A, TV-85D, PM-18, TV-15B, TV-14C, TV-13C ve RK-340 izolatlarının bitki boyunun pozitif kontrole göre sırası ile %37,0-%34,9- %34,6- %28,4- %22,7- %21,3 ve %18,4 oranında artırdıgı görülmüştür. Saksı denemelerinde gövde çapını artırmada en etkili uygulamanın %33,3'lük artış gösteren TV-49A uygulaması olduğu saptanmıştır. Bu uygulamayı %30,4 ve %28,8'lik artış ile TV-85D ve PM-18 uygulamaları takip etmiştir. Uygulamalardan hiç biri gövde çapını negatif yönde etkilemiştir. Saksı denemelerinde çiçek sayısı bakımından TV-49A ve TV-85D %82,6 oranında artırarak en etkili uygulamalar olmuştur. Bunları sırasıyla TV-13C, PM-18, TV-15B, RK-340 ve TV-14C takip etmiştir. Aday bakterilerin yaprakta klorofil SPAD değeri saksı çalışmasında pozitif kontrole göre etkili olmuştur. Yaprakta klorofil SPAD değeriaçısından iyi sonucu TV-49A göstermiştir. Bakteriler %17-%32,9 oranında dal sayısını artırmıştır. Bu çalışmada TV-49A meyve sayısında %88,4 artış sağlayarak en etkili uygulama olmuştur. Diğer bakteri uygulamaları ise değişen oranlarda dal ve meyve sayısında artışa neden olmuştur. Saksı denemelerinde bakteri uygulamalarının pozitif kontrolle karşılaştırıldığında meyve ağırlığını %20,7-%47,8 oranında artırdığı saptanmıştır.

Saksı denemelerinde bakteri uygulamalarının pozitif kontrolle karşılaştırıldığında bitki yaş ağırlığını %17,8 -%23,0 oranında artırdığı saptanmıştır. En yüksek sonucu %23'lük artışla TV-85D uygulaması en düşük sonucu ise %17,8'lik artışla RK-340 uygulaması göstermiştir.

Saksı denemelerinde bakteri uygulamalarının pozitif kontrolle karşılaştırıldığında bitki kuru ağırlığını %18,9-%23,8 oranında artırdığı saptanmıştır. En yüksek sonucu %23,8'lik artışla TV-49A uygulaması en düşük sonucu ise %18,9'lik artışla RK-340 uygulaması göstermiştir. Çiçek açma zamanı en erken TV-49A ve TV-85D bakterisinde görülmüştür.

4.9. Tarla Deneme Sonuçları

Saksı denemeleri yapılan7 bakteri (TV-49A, TV-85D, TV-13C, TV-15B, TV-14C, PM-18 ve RK-340) için tarla çalışmaları yapılmıştır. Negatif kontrol olarak sadece su uygulaması yapılan bitkilerde herhangi bir hastalık simptomu gözlenmemiştir (Çizelge 4. 10 ve Şekil 4.10). Yapılan tarla denemesinde kökten bakteri uygulamasının domates bitkilerin gelişimine (bitki boyu, gövde çapı, çiçek sayısı, yaprakta klorofil, dal sayısı, yaş bitki ağırlığı, kuru bitki ağırlığı ve ilk çiçeklenme) etkisi değerlendirilmiştir (Çizelge 4.11).

Çizelge 4.10. Potansiyel biyoajan bakterilerin tarla denemesinde domates bakteriyel solgunluk hastalığını engelleme oranları

Uygulamalar	Skala*	% Etki
TV-85D	0,75±0,01cd	85,1
TV-49A	0,5±0,01cd	89,3
TV-13C	1,0±0,02bc	78,7
TV-15B	1,0±0,02bc	78,7
TV-14C	1,7±0,02b	63,8
PM-18	1,2±0,02bc	74,4
RK-340	1,7±0,02b	63,8
Pozitif kontrol (Patojen)	4,7±0,08a	-
Negatif kontrol (Su)	0,0±0,00d	-

*Sütun içerisindeki aynı harfler ile gösterilen uygulamalar arasında fark önemli değildir (Duncan çoklu karşılaştırma testi, $p \leq 0.01$)

Pozitif kontrol uygulamasındaki bitkilerin tümünde simptom gözlendikten sonra değerlendirme yapılmış ve kontroldeki hastalık şiddetinin ortalama 4,7 skala değerinde olduğu saptanmıştır. Uygulamalarda TV-49A ve TV-85D izolatlarının hastalığı sırasıyla %89,3 ve %85,1 oranında baskıladığı görülmüş ve istatistiki olarak pozitif kontrolden farklı olduğu belirlenmiştir. Yapılan denemede hastalık şiddetinin ortalama 0,5-1,7 (skala değeri) arasında olduğu saptanmıştır.

Çizelge 4.11. Yapılan tarla denemelerinde potansiyel biyoajan bakterilerin bitki gelişimi üzerine etki sonuçları

Değerlendirilen parametreler	Uygulamalara ait değerler								
	TV-85D	TV-49A	TV-13C	TV-15B	TV-14C	PM-18	RK-340	Pozitif kontrol	Negatif Kontrol
Bitki boyu (cm)*	66,8±0,65abc	68,5±o,67a	60,0±0,61d	65,3±0,64bc	65,9±0,64abc	68,1±0,67ab	64,9±0,63c	40,2±0,41f	51,4±0,52e
Gövde çapı (cm)*	6,4±0,06a	6,3±0,06a	6,1±0,06ab	5,8±0,05b	5,4±0,05c	6,4±0,06a	5,4±0,05c	4,0±0,04d	5,1±0,05c
Çiçek sayısı (Adet/bitki)*	56,5±0,51bc	60,0±0,61ab	62,0±0,63a	52,0±0,49d	53,5±0,51cd	54,5±0,52cd	50,2±0,46d	23,0±0,21f	43,2±0,41e
Yaprakta klorofil (SPAD)*	47,8±0,45ab	49,9±0,45a	46,5±0,45bc	46,6±0,45bc	44,5±0,43cd	47,2±0,45b	43,8±0,41d	31,7±0,29f	39,7±0,34e
Dalsayısı (Adet/bitki)*	15,7±0,15ab	16,7±0,16a	14,7±0,14bcd	15,7±0,15ab	14,5±0,14bcd	15,2±0,15abc	13,7±0,13cd	10,0±0,10e	13,0±0,13d
Meyvesayısı (Adet/bitki) *	52,0±0,49bc	54,5±0,52ab	57,5±0,55a	46,0±0,44de	47,2±0,47de	49,2±0,48cd	44,5±0,42e	16,0±0,15g	37,7±0,34f
Meyve ağırlığı (g/ meyve)*	207,2±2,12bc	248,2±2,23a	187,1±1,86cd	184,0±1,75cd	176,7±1,60d	184,2±1,75cd	226,2±2,13ab	82,2±0,74e	182,4±1,69cd
Yaş bitki ağırlığı (g/bitki)*	693,5±6,70a	687,3±6,96a	665,4±6,42b	640,9±6,25c	621,0±5,90d	663,7±6,42b	550,7±5,21e	449,0±4,22g	535,0±5,02f
Kurubitki ağırlığı (g/bitki)*	335,3±3,02a	333,7±3,02a	324,5±2,90ab	317,0±2,85b	301,3±2,71c	323,9±2,90ab	274,9±2,01d	162,3±1,49f	234,6±1,96e
İlk çiçeklenme (gün)	58,5±0,52efg	56,0±0,50g	60,7±0,0,61de	59,0±0,58ef	62,5±0,61cd	64,5±0,63c	57,2±0,51fg	82,0±0,76a	70,2±0,63b

*Aynı satır içerisinde aynı harfler ile gösterilen ortalamalar arasındaki fark önemli değildir (Duncan çoklu karşılaştırma testi, $p \leq 0.01$)

TV-49A, PM-18, TV-85D, TV-14C, TV-15B, RK-340 ve TV-13C ile kurulan denemede izolatların bitki boyunu pozitif kontrole göre sırası ile %41,3- %40,9- %39,8- %38,9- %38,4- %38,0 ve %33,0 oranında artırdığı saptanmıştır.

Tarla denemelerinde gövde çapını artırmada en etkili uygulamanın %37,5'lük artış gösteren TV-85D ve PM-18 uygulamaları olduğu saptanmıştır. Bu uygulamayı %36,5 ve %34,4'lik artış ile TV-49A ve TV-13C uygulaması takip etmiştir. Uygulamalardan hiç biri gövde çapını negatif yönde etkilenmemiştir.

Tarla denemelerinde TV-13C çiçek sayısında %62,9 artış sağlayarak en etkili uygulama olmuştur. Bu uygulamayı TV-49A, TV-85D, PM-18, TV-14C, TV-15B ve RK-340uygulamaları sırası ile takip etmiştir. Aday bakterilerin yaprakta klorofil SPAD değeri pozitif kontrole göre etkili olmuştur. En etkili sonucu TV-49A göstermiştir. Bakterilerin dal sayısında ise %27,0-%60,1oranlarında artışa neden olduğu gözlemlenmiştir.

Bu çalışmada TV-13C, meyve sayısında %72,1 oranında artış sağlayarak en etkili uygulama olmuştur. Bu uygulamayı TV-49A, TV-85D, PM-18, TV-14C, TV-15B ve RK-340 uygulamalarısırası ile takip etmiştir. Tarla denemelerindebakteri uygulamaları pozitif kontrolle karşılaştırıldığında meyve ağırlığını %53,4-%66,8 oranında artırdığı saptanmıştır. Bakteri uygulamaları pozitif kontrolle karşılaştırıldığında bitki yaş ağırlığını %18,4- %35,2 oranında artırdığı saptanmıştır. En etkili sonucu %35,2'lik artışla TV-85D uygulaması en düşüketkiyi ise %18.4'lük artışla RK-340 uygulaması göstermiştir. Bitki kuru ağırlığını %40,9-%51,5 oranında artış saptanmıştır. En iyi sonucu %51,5'lik artışla TV-85D uygulaması, endüşük sonucu %40,9'lik artışla RK-340 uygulaması göstermiştir. TV-49A ve PM-18 bakteri uygulamalarındaçiçek açma zamanı en erken olduğu görülmüştür. Bu denemede bakteri uygulamaları ve pozitif kontrol arasında istatistiki olarak büyük bir fark saptanmamıştır.



Şekil 4.10. Potansiyel biyoajan bakterilerin tarla denemeleri

4.10. Bitki Savunma Metabolizma Enzimlerin Değerlendirilmesi

Sera denemelerinde toplam 7 farklı izolatın kontrole karşı test edildiği bu denemenin sonuçlarına göre, kontrole kıyasla denemede kullanılan 7 bakterininenzim aktivitesini önemli miktarda artırdığı görülmüştür (Çizelge 4.12).

Çizelge 4.12. Uygulamaların sera koşullarında bitki enzim aktiviteleri üzerine etkisi

Uygulamalar	PPO[1*]	POX[2*]	Phenol[3*]	SOD[4*]	CAT[5*]
TV-85D	16,14±0,15b	25,63±0,22b	0,24±0,03b	0,008±0,00b	8,41±0,09a
TV-49A	16,76±0,16a	26,43±0,23a	0,26±0,04a	0,007±0,00c	8,40±0,09a
TV-14C	15,36±0,14c	18,27±0,15g	0,24±0,03ab	0,005±0,00d	7,85±0,09ab
TV-15B	13,06±0,12d	20,37±0,19f	0,22±0,02bc	0,006±0,00c	7,43±0,08bc
PM-18	15,99±0,15b	24,15±0,22c	0,22±0,02bc	0,009±0,00a	6,96±0,07cd
RK-340	11,94±0,11e	22,93±0,20d	0,20±0,02c	0,007±0,00c	6,85±0,07cd
TV-13C	15,93±0,15bc	21,72±0,20e	0,23±0,03b	0,006±0,00c	6,30±,07d
Pozitif Kontrol (Patojen)	7,29±0,06f	10,00±0,08h	0,13±0,01d	0,002±0,00e	1,38±0,01e
Negatif Kontrol (Su)	6,87±0,06f	10,04±0,09h	0,13±0,01d	0,002±0,00e	1,37±0,01e

PPO[1] (Polifenol Oksidaz)= ΔOD 515/min/mg; POX[2] (Peroksidaz)= ΔOD 475/min/mg; Total Fenol[3]= mg/gr; SOD[4] (Superoksid Dismutaz)= unit $E\mu g^{-1}pr$; CAT[5] (Katalaz)= ΔOD 240/min/g

[*]Sütun içerisindeki aynı harfler ile gösterilen uygulamalar arasında fark önemli değildir (Duncan çoklu karşılaştırma testi, $p \leq 0.01$)

En yüksek PPO aktivitesi TV-49A aşılamasında göstermiş olup bunu sırasıyla TV-85D, PM-18, TV-13C, TV-14C,TV-15B ve RK-340 izolatları izlemiştir. En yüksek POX enzimin aktivitesi sırasıyla TV-49A, TV-85D, PM-18, RK-340, TV-13C, TV-15B ve TV-14C uygulamalarından elde edilmiştir. Yapraklarda en yüksek CAT enzim aktivite değerleri TV-85D aşılamasında ölçülürken bunu sırasıyla TV-49A, TV-14C, TV-15B, PM-18, RK-340 ve TV-13C uygulamaları takip etmiştir (Çizelge 4.12). En yüksek SOD enzim aktivitesi ise PM-18 aşılanmış fidelerde ölçülürken bunu sırası ile TV-85D, TV-49A, TV-13C, RK-340, TV-15B ve TV-14C aşılamaları izlemiştir.

Tarla denemelerinde toplam 7 farklı izolatın kontrole karşı test edildiği bu denemenin sonuçlarına göre, kontrole kıyasla denemede kullanılan 7 bakterininenzim aktivitesini önemli miktarda artırdığı görülmüştür (Çizelge 4.13).

Çizelge 4.13. Uygulamaların tarla koşullarında bitki enzim aktiviteleri üzerine etkisi

Uygulamalar	PPO[1*]	POX[2*]	Phenol[3*]	SOD[4*]	CAT[5*]
TV-85D	18,87±0,17b	27,89±0,24b	2,98±0,02b	1,345±0,01b	10,41±0,08a
TV-49A	19,76±0,17a	28,56±0,24a	3,49±0,03a	1,023±0,01c	11,40±0,09a
TV-14C	17,45±0,16c	20,56±0,16g	2,67±0,02ab	1,012±0,01d	9,84±0,07ab
TV-15B	15,34±0,15d	23,54±0,18f	2,86±0,02bc	1,242±0,01c	9,56±0,06bc
PM-18	18,43±0,15b	26,17±0,21c	2,88±0,02bc	2,045±0,01a	8,92±0,05cd
RK-340	13,54±0,11e	24,69±0,21d	2,78±0,02c	1,021±0,01c	8,82±0,05cd
TV-13C	16,83±0,15bc	24,64±0,23e	2,93±0,02b	1,022±0,01c	7,98±0,05d
Pozitif Kontrol (Patojen)	9,56±0,06f	12,34±0,10h	2,45±0,02d	1,002±0,01e	3,65±0,02e
Negatif Kontrol (Su)	7,98±0,06f	13,64±0,10h	2,47±0,02d	1,004±0,01e	3,51±0,02e

PPO[1] (Polifenol Oksidaz)= ΔOD 515/min/mg; POX[2] (Peroksidaz)= ΔOD 475/min/mg; Total fenol[3]= mg/g; SOD[4] (Superoksid Dismutaz)= unit $E\mu g^{-1}pr$; CAT[5] (Katalaz)= ΔOD 240/min/g

[*]Sütun içerisindeki aynı harfler ile gösterilen uygulamalar arasında fark önemli değildir (Duncan çoklu karşılaştırma testi, $p \leq 0.01$)

En yüksek PPO aktivitesi TV-49A aşılamasında göstermiş olup; bunu sırasıyla TV-85D, PM-18, TV-13C, TV-14C,TV-15B ve RK-340 izolatları izlemiştir. En yüksek POX aktivitesi sırasıyla TV-49A, TV-85D, PM-18, RK-340, TV-13C, TV-15B ve TV-14C aşılamalarından elde edilmiştir. Yapraklarda en yüksek CAT enzim aktivite değerleri TV-85D aşılamasında ölçülürken bunu sırasıyla TV-49A, TV-14C, TV-15B, PM-18, RK-340 ve TV-13C uygulamaları takip etmiştir (Çizelge 4.13). En yüksek SOD enzim aktivitesi PM-18 aşılanmış fidelerde ölçülürken bunu sırası ile TV-85D, TV-49A, TV-13C, RK-340, TV-15B ve TV-14C aşılamaları izlemiştir.

4.11. Saksıda Etkili Bulunan Bakteriler İçin Formülasyon Oluşturulması

Saksıda etkili bulunan bakterilerin formülasyonunu oluşturulması için farklı pH, sıcaklık ve besi ortamlarında gelişme durumları değerlendirilmiştir (Çizelge 4.14).

Çizelge 4.14. Bakterilerin farklı pH, sıcaklık ve besi ortamlarında gelişme durumları

Uygulamalar	**Toplam bakteri sayıları**	
pH Değerleri	**TV-85D**	**TV-49A**
pH= 6,4	0,0 x 10^7	1,1 x 10^7
pH= 6,6	0,7 x 10^7	8,3 x 10^7
pH= 6,8	5,4 x 10^7	21,5 x 10^7
pH= 7,0	7,8 x 10^7	12,9 x 10^7
pH= 7,2	18,9x 10^7	4,6 x 10^7
pH= 7,4	17,1 x 10^7	3,9 x 10^7
Sıcaklıklar	**TV-85D**	**TV-49A**
24°C	0,3 x 10^7	0,9 x 10^7
26°C	8,5 x 10^7	16,9 x 10^7
28°C	17,3 x 10^7	20,2 x 10^7
30°C	15,6 x 10^7	18,7 x 10^7
32°C	3,9 x 10^7	2,2 x 10^7
Besiyerleri	**TV-85D**	**TV-49A**
Nutrient Broth	11,0 x 10^7	12,8 x 10^7
Tryptic Soy Broth	16,7 x 10^7	21,1 x 10^7

Bu aşamada sera ve tarla denemelerinden en etkili 2 bakteri (TV-49A ve TV-85D) seçilmiş ve bu bakterilerin üretiminde kullanılacak olan en uygun ticari besi yerini belirlenmesi için TSB ve NB olmak üzeri 2 farklı besiyeri denenmişir. Bütün bakteriler her iki besi yeri için ölçülen absorbans değerleri ve koloni oluşturan bakteri sayıları kayıt edilerek, hangi besi yerinde daha hızlı üredikleri tespit edilmiştir. TV-85D için: 11,0 x 10^7(kob) NB besi yerinde ve 16,7 x 10^7 (kob) TSB besi yerinde, TV-49A için: 12,8 x 10^7(kob) NB besi yerinde ve 21,1 x 10^7 (kob) TSB besiyerinde tespit edilmiştir. Her iki bakteri için en uygun besi yerinin TSB olduğu belirlenmiştir.

Biyoformülasyonda kullanılacak bakteri izolatlarının TSB sıvı besiyerini kullanılarak bu besiyerinde optimum pH ve sıcaklık değeri belirlenerek fermentörde aşılama kültürleri

geliştirilirken bu değerler kullanılmıştır. En uygun sıcaklık her iki bakteri için 28°C ve en uygun pH ise, TV-85D için 7.2 ve TV-49A için ise 6.8 olarak tespit edilmiştir.

4.12. Aşılama Kültürlerinin Fermentörde Sıvı Taşıyıcı İçerisinde Üretilmesi ve Paketlenmesi

Bu aşamada bakterilerin üretiminde raf ömürünün en uygun sıcaklığı belirlenmesi için 2 farklı sıcaklık denenmiştir. Tek tek kolonilerin sayılabildiği en uygun dilüsyondan koloni sayımı yapılmış ve sayımlar Çizelge 4.15'de verilmiştir.

Çizelge 4.15. Paketleme yapılmış ürünlerin oda sıcaklığı ve 5°C'deki raf ömürleri

Muhafaza koşulları	**Toplam bakteri sayıları**	
Oda Sıcaklığı	**TV-85D**	**TV-49A**
1 Ay	$17{,}0 \times 10^7$	$20{,}9 \times 10^7$
2 Ay	$15{,}9 \times 10^7$	$20{,}1 \times 10^7$
3 Ay	$13{,}2 \times 10^7$	$17{,}8 \times 10^7$
4 Ay	$9{,}0 \times 10^7$	$13{,}5 \times 10^7$
5 Ay	$5{,}2 \times 10^7$	$8{,}1 \times 10^7$
6 Ay	$73{,}4 \times 10^5$	$102{,}5 \times 10^5$
7 Ay	$46{,}8 \times 10^5$	$60{,}1 \times 10^5$
8 Ay	$55{,}6 \times 10^4$	$96{,}0 \times 10^4$
9 Ay	$20{,}8 \times 10^4$	$56{,}4 \times 10^4$
5°C	**TV-85D**	**TV-49A**
1 Ay	$15{,}2x\ 10^7$	$19{,}5 \times 10^7$
2 Ay	$12{,}1 \times 10^7$	$15{,}9 \times 10^7$
3 Ay	$9{,}4 \times 10^7$	$12{,}4 \times 10^7$
4 Ay	$5{,}3 \times 10^7$	$8{,}6 \times 10^7$
5 Ay	$63{,}4 \times 10^5$	$72{,}8 \times 10^5$
6 Ay	$35{,}6 \times 10^5$	$48{,}4 \times 10^5$
7 Ay	$40{,}2 \times 10^4$	$51{,}5 \times 10^4$
8 Ay	$29{,}1 \times 10^4$	$38{,}5 \times 10^4$
9 Ay	$7{,}6 \times 10^4$	$11{,}3 \times 10^4$

Her 2 bakteri için koloni oluşturan bakteri sayıları kayıt edilerek, hangi sıcaklıkta uzun süre kalabilmesi tespit edilmiştir. TV-85D için: 1 ay 17,0 x 10^7 ve 9 ay 20,8 x 10^4 (kob), TV-49A için: 1 ay 20,9 x 10^7 ve 9 ay 56,4 x 10^4 (kob) tespit edilmiş ve depolanan ürünler için en uygun sıcaklık oda sıcaklığı olduğu belirlenmiştir.

4.13. Son Ürün ile Domateste Sera ve Tarla Denemelerinin Kurulması

Son ürün ile domateste sera ve tarla denemeleri yapılmış ve bunlara ait sonuçlar Çizelge 4.16'da verilmiştir.

Çizelge 4.16. Formüle edilen biyoajanların sera ve tarla çalışmasında domates bakteriyel solgunluk hastalığını engelleme oranları

Uygulamalar	Sera		Tarla	
	Skala*	%Etki	Skala*	%Etki
Tv-85D	0,6±0,01b	%88,0	0,7±0,01b	%85,1
TV-49A	0,3±0,01b	%94,0	0,5±0,01b	%89,3
Pozitif Kontrol (Patojen)	5,0 ±0,04a	-	4,7±0,03 a	-
Negatif Kontrol (Sıvı taşıyıcı)	0,0±0,00 b	-	0,0±0,00b	-

*Sütun içerisindeki aynı harfler ile gösterilen uygulamalar arasında fark önemli değildir(Duncan çoklu karşılaştırma testi, $p \leq 0.01$).

Sera denemesinde TV-49A ve TV-85D izolatlarının uygulamalarında hastalığı sırasıyla %94,0 ve %88,0 oranında baskıladığı görülmüş ve istatistiki olarak pozitif kontrolden farklı olduğu belirlenmiştir. Sera denemelerine ait resimler Şekil 4.11'de verilmiştir.

Tarla denemesinde pozitif kontrol uygulamasındaki bitkilerin tümünde simptom gözlendikten sonra değerlendirme yapılmış ve kontroldeki hastalık şiddetinin ortalama 4,7 skala değerinde olduğu saptanmıştır. Uygulamalarda TV-49A ve TV-85D izolatlarının hastalığı sırasıyla %89,3 ve %85,1 oranında baskıladığı görülmüş ve istatistiki olarak pozitif kontrolden farklı olduğu belirlenmiştir. Tarla denemelerine ait resimler Şekil 4.12'de verilmiştir.



Şekil 4.11. Formüle edilen biyoajanların sera denemeleri



Şekil 4.12. Formüle edilen biyoajanların tarla denemeleri

Formüle edilen potansiyel biyoajan bakterilerin sera koşullarında bitki gelişimi üzerine etkileri Çizelge 4.17'de verilmiştir.

Çizelge 4.17. Formüle edilen biyoajanların sera koşullarında bitki gelişimi üzerine etkileri

Değerlendirilen parametreler	Uygulamalara ait değerler			
	TV-85D	TV-49A	Pozitif kontrol	Negatif kontrol
Bitki boyu (cm)*	62,0±0,60a	64,8±0,61a	40,3±0,38c	48,8±0,45b
Gövde çapı (cm)*	4,2±0,02ab	4,5±0,02a	3,1±0,02c	3,9±0,02b
Çiçek sayısı (adet/bitki)*	29,8±0,25a	30,3±0,30a	4,2±0,02c	19,2±0,15b
Yaprakta klorofil (SPAD)*	44,7±0,41a	47,0±0,45a	25,4±0,21c	35,2±0,30b
Dal sayısı (adet/bitki)*	16,0±0,13a	16,1±0,15a	11,0±0,10c	13,4±0,10b
Meyve sayısı (adet/bitki)*	24,2±0,21a	25,9±0,22a	3,1±0,02c	14,2±0,12b
Meyve ağırlığı (g/meyve)*	120,8±1,15b	128,8±1,22a	55,5±0,48d	94,5±0,92c
Yaş bitki ağırlığı (g/bitki)*	506,7±4,80a	502,8±4,75a	381,5±3,75c	465,3±4,50b
Kuru bitki ağırlığı (g/bitki)*	212,8±2,10a	209,2±2,01a	156,7±1,39c	182,2±1,75b
İlk çiçeklenme(gün)	60,8±0,55c	60,9±0,55c	72,9±0,68b	83,7±0,76a

*Aynı satır içerisindeki aynı harfler ile gösterilen uygulamalar arasında fark önemli değildir(Duncan çoklu karşılaştırma testi, $p \leq 0.01$)

Yapılan saksı denemesinde domates bitkilerinin bitki boyuna olan etkisi değerlendirilmiştir.Yapılmış olan denemede TV-49A ve TV-85D izolatlarının bitki boyunu pozitif kontrole göre sırası ile %37,8 ve %35 oranında artırdıgı görülmüştür.Saksı çalışmasında gövde çapını artırmada en etkili uygulamanın %31,1'lik artış gösteren TV-49A uygulaması olduğu saptanmıştır. Uygulamalardan hiç biri gövde çapını negatif yönde etkilemiştir. Saksı çalışmasında TV-49A ve TV-85D çiçek sayısını %86,1 ve %885,9 oranında artırarak en etkili uygulama olmuştur. Bakterilerin yaprakta klorofil SPAD değeri saksı çalışmasında pozitif kontrole göre etkili olmuştur. En iyi sonucu TV-49A göstermiştir. Bakterilerin dal sayısını %31,2-%31,6 oranında artırmıştır. Bu çalışmada TV-49A meyve sayısında %88 artış sağlayarak en etkili uygulama olmuştur. Saksı denemelerinde bakteri uygulamalarının pozitif kontrolle karşılaştırıldığında meyve ağırlığını %54-%56,9 oranında artırdığı saptanmıştır.

Saksı denemelerinde bakteri uygulamalarının pozitif kontrolle karşılaştırıldığında bitki yaş ağırlığını %24,7 oranında artırdığı saptanmıştır.

Saksı denemelerinde bakteri uygulamalarının pozitif kontrolle karşılaştırıldığında bitki kuru ağırlığını %25-%26,3 oranında artırdığı saptanmıştır. En yüksek sonucu %26,3'lik artışla TV-85D uygulaması göstermiştir. Çiçek açma zamanı en erken TV-49A ve TV-85D bakterisinde görülmüştür. Bu denemede bakteri uygulamaları ve pozitif kontrol arasında istatistiki olarak büyük bir fark saptanmamıştır.

Formüle edilen potansiyel biyoajan bakterilerin tarla koşullarında bitki gelişimi üzerine etkileri Çizelge 4.18'de verilmiştir.

Çizelge 4.18. Formüle edilen biyoajanların tarla koşullarında bitki gelişimi üzerine etkileri

Değerlendirilen parametreler	Uygulamalara ait değerler			
	TV-85D	TV-49A	Pozitif kontrol	Negatif kontrol
Bitki boyu (cm)*	63,9±0,60a	65,7±0,61a	40,0±0,35c	49,1±0,45b
Gövde çapı (cm)*	5,9±0,03a	5,8±0,03a	3,8±0,02c	4,8±0,03b
Çiçek sayısı (adet/bitki)*	53,1±0,47b	56,6±0,49a	18,9±0,15d	40,0±0,35c
Yaprakta klorofil (SPAD)*	48,5±0,37a	50,2±0,45a	30,3±0,30c	39,8±0,34b
Dal sayısı (adet/bitki)*	15,4±0,11a	15,8±0,11a	9,7±0,07c	12,9±0,10b
Meyve sayısı (adet/bitki)*	48,3±0,37a	51,9±0,45a	13,9±0,11c	35,1±0,29b
Meyve ağırlığı (g/meyve)*	191,0±1,75b	222,1±2,15a	77,1±0,65d	168,1±1,59c
Yaş bitki ağırlığı (g/bitki)*	696,5±6,72a	689,5±6,63a	446,9±4,50c	534,5±5,20b
Kuru bitki ağırlığı (g/bitki)*	335,3±3,11a	333,7±3,10a	162,3±1,55c	234,0±2,24b
İlk çiçeklenme (gün)	59,3±0,52a	57,5±0,43a	84,6±0,77c	71,1±0,66b

*Aynı satır içerisindeki ortalama değerler yanındaki aynı harfler uygulamalar arasındaki farkın önemli olmadığını göstermektedir (Duncan çoklu karşılaştırma testi, $p \leq 0.01$)

TV-85D ve TV-49A ile kurulan denemede izolatların bitki boyunu pozitif kontrole göre sırası ile %37,4ve %39,1 oranında artırdığı saptanmıştır. Tarla denemelerinde gövde çapını artırmada en etkili uygulamanın %35,5'lik artış gösteren TV-85D uygulaması olduğu saptanmıştır. Uygulamalardan hiç biri gövde çapını negatif yönde etkilenmemiştir.

Tarla denemelerinde TV-49AC çiçek sayısında %66,6 artış sağlayarak en etkili uygulama olmuştur. Aday bakterilerin yaprakta klorofil SPAD değeri kontrole göre etkili olmuştur. En etkili sonucu TV-49A göstermiştir. Bakterilerin dal sayısında ise %37 -%38,7oranlarında artışa neden olduğu gözlemlenmiştir.

Bu çalışmada TV-49A, meyve sayısında %73,2ve TV-85D %71,2oranlarda artışgöstermiştir. Tarla denemelerinde bakteri uygulamalarının kontrolle karşılaştırıldığında meyve ağırlığını %59,6 ve %65,2 oranında artırdığı saptanmıştır. Bakteri uygulamalarının kontrolle karşılaştırıldığında bitki yaş ağırlığını %35,1 ve %35,8 oranında artırdığı saptanmıştır. En etkili sonucu %35,8'lik artışla TV-85D uygulaması göstermiştir. Tarla denemelerinde bakteri uygulamalarının pozitif kontrolle karşılaştırıldığında bitki kuru ağırlığını %51,5 ve %51,3 oranında artırdığı saptanmıştır. En iyi sonucu %51,5'lik artışla TV-85D uygulaması göstermiştir. Çiçek açma zamanı en erken TV-85D bakteri uygulamasında görülmüştür.Bu denemede bakteri uygulamaları ve pozitif kontrol arasında istatistiki olarak büyük bir fark saptanmamıştır.

4.14. *In vitro* ve *İn vivo*'da Etkili Bulunan Bakterilerin Moleküler Tanı Sonuçları

Hem *in vitro*'da hem de *in vivo*'da etkili olan 2 biyoajan bakteri izolatının saf kültürlerinden moleküler tanı yapılmış, moleküler tanı sonuçları ve benzerlik indeksleri Çizelge 4.19'daverilmiştir. Elde edilen sekans sonuçlarına göre NCBI da Blast taramasıyla TV-49A %99, TV-85D%99 benzerlik indeksi ile sırasıyla *B. pumilus* ve *B. velezensis* olarak tanılanmıştır.Bu bakterilere ait baz dizileri aşağıda verilmiştir.

Çizelge 4.19.*In vitro* ve *in vivo*'da etkili bulunan bakterilerin moleküler tanı sonuçları ve benzerlik indeksleri

İzolat	İzole edildiği materyal	Tanı sonucu	Benzerlik indeksi	Erişim numarası*
TV-49A	Buğdaygil	*Bacillus pumilus*	%99	MK224502
TV-85D	Şeker pancarı	*Bacillus velezensis*	%99	MK224503

*GenBank

>TV-49A

AGTCGAGCGGACAGAAGGGAGCTTGCTCCCGGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACAC
GTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAG
TTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATGAAAGACGGTTTCGGCTGTCACTTACAGATGGAC
CCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCAA
CCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCA
GCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATG
AAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCGAGAGTAACTGCTC
GCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAA
TACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCT
TAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAAACTT
GAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAG
GAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTG
GGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGT
TAGGGGGTTTCCGCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTA
CGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGT
GGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCCTA
GAGATAGGGCTTTCCCTTCGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCG
TGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGC
ATTTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACG
TCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAAG
GGCTGCGAGACCGCAAGGTTTAGCCAATCCCATAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGT
CTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTG
AATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGCAACACCCGA
AGTCGGTGAGGTAACCTTTATGGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGGGCAGATGAT

>TV-85D

AGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACAC
GTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGG
TTGTCTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGAC
CCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGA
CCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCA
GCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATG
AAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGC
GGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTA
ATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTC
TTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACT
TGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGA
GGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGT
GGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTG
TTAGGGGGTTTCCGCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGT
ACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATG
TGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCT
AGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTC
GTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAG
CATTCAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGAC
GTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAA
GGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAG
TCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGT
GAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCG
AAGTCGGTGAGGTAACCTTTATGGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGGACAGATGAT

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Türkiyede domates yetiştiriciliğinin yapıldığı her bölgede görülebilen domates bakteriyel kanser ve solgunluk hastalığının (*Cmm*) mücadelesi en çok zor olan patojenlerden biridir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda *Cmm*'e karşı biyolojik mücadelenin alternatif bir yöntem olabileceği belirtilmektedir ve *Cmm*'in önlenmesine yönelik çalışmalarda bakteriyel antagonistlerle biyolojik mücadele çalışmaları dikkati çekmektedir (Umesha 2001; Boudyach *et al.* 2001; Amkraz et al. 2010; Akat ve Özaktan 2011; Aksoy *et al*. 2017; Singh *et al*. 2017; Takishita *et al*. 2018). Bu nedenle bakteriyel antagonistlerle biyolojik mücadeleye yönelik pek çok çalışma yapılmıştır. Türkiyede domates meyve etinin fermantasyon sıvısından, fermantasyon sırasında izole edilen antagonistik bakterilerin *Cmm*'e olan etkisinin araştırıldığı (Özaktan 1991), domates bitkilerinden izole edilen kök bakterilerinin *Cmm*'e karşı kullanıldığı (Çetinkaya-Yıldız 2007; Akat ve Özaktan 2011) bulunmaktadır.

Bu çalışmada toplam 1150 bakteri izolatı kullanılmıştır. Bu bakterilerin *in vitro*'da patojene karşı test edilmesi sonucunda sadece 48 izolatın etkili olduğu tespit edilmiştir. Etkili olan izolatlardan MIS sonuçlarına göre; 27 izolatın *Bacillus*, 3 izolatın *Pseudomonas*, 3 izolatın *Brevibacterium*, 2 izolatın *Pantoea*, 2 izolatın *Kocuria*, 2 izolatın *Aeromonas*, 2 izolatın *Chryseobacterium*, 1 izolatın *Paenibacillus*, 1 izolatın *Janithobacterium*, 1 izolatın *Microbacterium*, 1 izolatın *Yersinia* ve 1 izolatın *Burkholderia* cinsine ait olduğu MIS tanı sistem ile tespit edilmiştir. 48 izolat için viyol çalışması yapılmıştır ve en etkili bulunan 7 bakteri, sera ve tarla çalışmalarında test edilmiştir.

Çalışmada *in vitro* test sonuçları ile *in vivo* test sonuçlarının her zaman birbirini destekleyici olmadığı saptanmıştır. Bu durum biyolojik mücadelenin oldukça sık rastlanan bir sonucudur. Antagonist bakteriler, besi yerinde patojenin gelişimini engelleyici antibiyotik veya bazı metabolitleri üretebilmekte, ancak saksı testlerinde bunu yapmakta güçlük çekebilmektedirler. Antagonist bakteri ve patojen petri denemelerinde birbirinden belli uzaklıkta ekildiği için karşılaşma olasılığı yüksek

olabilirken saksıda bu şansı bulamayabilmektedirler (Cook & Baker 1983; Bora & Özaktan 1998; Amkraz *et al*. 2010; Akat ve Özaktan 2011).

Bu çalışmada, sera ve tarla koşullarında gerçekleştirilen dikimden önce domates bitkilerinin köklerine biyoajan bakteri uygulaması yapılmıştır ve *Cmm*'den kaynaklanan bakteriyel solgunluk ve kanser hastalığını başarıyla engellediği saptanmıştır. Benzer bir çalışmada Akat ve Özaktan (2011) floresan *Pseudomonas*ların, hem tohum hemde şaşırtma sırasında köklere uygulanmış ve hastalık çıkışını %80-97 oranında engelleyerek tek başına tohum uygulamasından daha başarılı olduğunu tespit etmişlerdir. Tek başına tohum uygulaması ile hastalığın %50-60 oranında engellendiği, şaşırtmadan önce fideye yapılan tohum + kök daldırma biçimindeki uygulamada ise *Cmm*'e karşı %59-74 oranında engelleme saptamışlardır. Araştırıcılar bunun sebebini domates bitkisinin ikincil dokularının farklılaşması sırasında oluşan ve giderek artan bir dayanıklılık mekanizmasına bağlamışlardır. Aynı araştırıcılar şaşırtma sırasında patojene karşı korunma gereksinimi duyan kök uçlarının antagonistlere daldırıldıktan sonra dikim yapılmasında daha etkili bir sonuç verdiğini bildirilmişlerdir (Boudyach *et al.* 2001).

Bu çalışmada *in vitro* ve *in vivo* denemelerinde, TV-49A ve TV-85D izolatlarının oldukça başarılı olduğu saptanmıştır. Bu iki izolatın 16s rDNA sekans sonuçlarına göre *B. pumilus* TV-49A ve *B. velezensis* TV-85D olarak tanıları yapılmıştır. MIS tanı sonuçlarına göre TV-49A izolatının *Bacillus megaterium* ve TV-85D izolatının *Bacillus cereus* olarak tanılanmıştır. Bu çalışmada bu iki yöntemin cins düzeyinde birbirlerile ortundukleri tespit edilmiştir.

Bu çalışmada kullanılan potansiyel biyoajan bakterilerin hastalık gelişimi üzerine etkilerine bakıldığında tüm uygulamaların hastalık şiddetinde düşüşe neden olduğu ve getirdiği düşüşün istatistiki olarak önemli olduğu görülmüştür. Buna göre, *B. pumilus* TV-49A izolatının %94 sera koşullarında, %89,3 tarla koşullarında ve *B. velezensis* TV-85D izolatının %88 sera koşullarında, %85,1 tarla koşullarında etkinlik göstererek hastalık şiddetini azalttıkları belirlenmiştir. Son yıllarda, *Bacillus* türleri, mikrobiyoloji

ve biyoteknoloji dallarında giderek daha önemli bir rol oynamaya başlamışlardır. *Bacillus* izolatlarından elde edilen enzimlerin, antibiyotiklerin, biyopestisitlerin, yüzey aktif maddelerin, bir çok önemli biyokimyasal maddelerin üretiminde ve gıda sanayisinde kullandığı bilinmektedir (Harwood 1989; Banat *et al.* 2000; Pinchuk *et al.* 2002). *Bacillus* türleri, biyolojik mücadelede de önemli kılan özel nitelikleri bulunmaktadır. Fungus ve bazı bakteriyel patojenlere karşı antagonistik faaliyet gösteren antibiyotik üretenleri olarak bilinirler (Loeffler *et al.* 1986; Krebs *et al.* 1998), canlılıkları yüksek olan sporlar oluşturmaları ilebiki hücreleri ile kıyas edilebilirler (Bochow 1995), *Bacillu*s türleri genellikle toprakta bulunurlar (Stabb *et al.* 1994). Bitkilerde endofitik olarak kolonize edilen en yaygın bakteriler arasındayer alırlar ve vasküler bitki patojenlerinin biyolojik kontrolünde de önemli rol oynarlar (Hardoim *et al.* 2008; Tiwari and Thakur 2014).

Dünyada yapılan bir çok çalışmada *Cmm*'e karşı genellikle *Pseudomonas* sp. izolatları kullanılmış ve iyi sonuçlar alınmıştır. Boudyach *et al.* (2001), domates rizosfer ve rizoplane' inden izole edilen antagonistlerin *Cmm* infeksiyonunu başarıyla engellediğini ve bu antagonist bakterilerinin genelde fluoresan Pseudomonaslar olduğunu bildirmiştir. Takishita *et al*. (2018) yaptıkları bir çalışmada *Pseudomonas* sp. 23S izolatını *Cmm*'e karşı kullanmışlar ve *Pseudomonas*'ın bitkide ISR dirençliğini uyandırarak hastalık şiddetinin azaldığını tespit etmişlerdir. Aynı zamanda bu izolatın siderofor ve IAA üreterek bitki gelişiminde de önemli olduğunu bildirmişlerdir.Başka bir çalışmada ise domates bitkilerinin rizosferinin, *in vitro* ve sera koşullarında domatesin bakteriyel kanserı patojenine karşı güçlü antibakteriyel aktiviteye sahip olan bir fluoresan *Pseudomonas* kaynağı olabileceğini gösterdimişlerdir (Amkraz et al. 2010).*İn vitro* şartlarında *Cmm*'e karşı test edilen beş biyoajan bakteri arasında, *P. flourescens* PfS-1izolatı etkili bulunmuştur. Bu biyoajan tohumla aşılandığında, çimlenmeyi iyileştirdiği ve saksı koşullarında hastalık simptomlarının geç görülmesine sebep olduğu tespit edilmiştir (Singh *et al.* 2017).

Ama bu patojene karşı *Bacillus* türleri ile çalışmalar daha az yapılmıştır. *Bacillus* ile yapılan çalışmalar sadece *Bacillus subtilis* izolatı ile yürütülmüştür (Utkhede & Koch 2004; Jung *et al*. 2014). Ama yapılan bu çalışmada *B. pumilus* ve *B. velezensis* türlerinin oldukça başarılı olduğu saptanmıştır. Bir diğer husus ise yapılan çalışmaların çoğu *in vitro* ve sera koşulları altında yapılmıştır. Bu çalışmada ise hem *in vitro* hem sera ve hem tarla çalışmaları yapılmış ve seçilen *Bacillus* türlerine ait izolatların formülasyonu geliştrilmiştir.

B. velezensis son yıllarda bir çok bitki hastalığına karşı test edilmiştir (Roh *et al.* 2009; Chang *et al.* 2012; Lee *et al.* 2012; Si 2014; Palazzini *et al.* 2016; Gao *et al.* 2017; Ma *et al.* 2017; Pan *et al.* 2017). *B. velezensis* izolatları çok önemli sekonder metabolitler üretmektedirler (Palazzini *et al.* 2016; Ma *et al.* 2017) ve bu metabolitlerin çoğu antibakteriyel metabolitler olarak bilinmektedir. Bu sonuçlar, bu bakterinin ayni ekolojik nişede bulunduğu diğer bakterilere karşı mücadele de antibakteriyel ajan olarak kullanabileceğini göstermektedir (Palazzini *et al.* 2016).

Yapılan bir çok çalışmada da bazı *Bacillus* izolatlarının bitki büyümesini teşvik edici etkilerinin yanı sıra bakteriyel ve fungal patojenlere karşı biyolojik mücadele elemanı oldukları belirtilmiştir (Cuppels *et al*. 1999; Kotan *et al*. 1999; Sahin *et al*. 2000; Çakmakçi *et al*. 2001; Eşitken *et al*. 2003; Compant *et al*. 2005; Young *et al*. 2006; Orhan *et al*. 2006; Aslantaş *et al*. 2007).

Potansiyel biyoajan bakterilerin uygulamalarının bazı besin elementlerinin alımını teşvik ettiği ve dolaylı olarak fitopatojenik organizmaları engellediği, bunun yanı sıra bitkilerin fiziksel ve biyokimyasal olarak etkilenmeleri sonucu dayanıklılık meydana getirebildikleri bildirilmiştir. Aynı zamanda bu bakterilerin bitki büyümesine olan etkileri çok olumlu sonuçlar vermiştir. De Freitas *et al.* (1997) *B. megaterium, B. sphaericus* ve *B. polymyxa* uygulanarak yaptıkları çalışmalarda, bu bakterilerin ortamda bulunan fosfatı çözerek bitki boyu ve ağırlığının arttığını bildirmişlerdir. Bu çalışmada kullanılan fosfatı indirgeme özelliğindeki TV-49A ve TV-85D izolatlarının domates bitkilerinde farklı oranlarda büyümeyi teşvik ettiği tespit edilmiştir. TV-49A

uygulamasının bitki yaş ağırlığını %31.7 oranında artırırken, TV-85D uygulamasının ise %32.8 oranında artırdığı belirlenmiştir.

Potansiyel biyoajan bakterilerin bitkilerde verimi artırmaya yönelik olarak kullanıldığı çok sayıda çalışma mevcuttur. Yapılan bir çalışmada; *Bacillus* OSU-140, *Bacillus* OSU-142 ve *Bacillus* M-13 izolatları arpa ve şeker pancarı bitkilerine uygulanmıştır. Çalışma sonucunda tüm uygulamalar yaprak ağırlığı, kök ağırlığı, toplam ağırlık gibi parametrelerde kontrollere nazaran önemli artışlar sağlamıştır (Şahin et al. 2004). Bu çalışmada kullanılan *B. pumilus* TV-49A izolatı ve *B. velezensis* TV-85D izolatı toplam ağırlıkta istatistiki olarak önemli bulunan artışlar sağlamışlar.

Daha önce belirtildiği gibi, izolatların ACCD, azot fiske etme ve fosfat çözme yetenekleri test edilmiştir. Buna göre; ACCD bir azot kaynağı olarak tüm bakterilerinüremelerinde kullanılmış,azot fiksasyonunda 47 izolatda gelişim gözlenmiş ve bu izolatlar pozitif olarak kabul edilmiştir. Sadece PM-34 izolatın negatif çıktığı belirlenmiştir. Fosfat çözme yetenekleri bakımından da izolatların tamamı NBRIP-BPB besiyerinde renk açılması meydana getirmiş, sadece 4 izolat negatif olarak değerlendirilmiştir.

Çakmakçı *et al.* (2001) arpa ve şeker pancarı üretim alanlarından elde ettikleri *Pseudomonas, Burkholderia* ve *Bacillus* cinsine ait izolatların, ürün miktarında ve kalitesinde önemli artışlar oluşturduğunu gözlemlemişlerdir. Mirik (2005), biberlerde yaptığı çalışmada biber rizosferinden elde ettiği izolatların bitki büyümesine olan etkilerini incelemiş ve bu izolatların sağlıklı bitkilerde bitki büyümesini farklı oranlarda artırdığını bildirmiştir. Bu çalışmada yürütülen saksı, viyol ve tarla çalışmaları sonucunda elde edilen bulgular bu konuda yapılan çalışmalarla benzer sonuçlar vermiştir ve potansiyel biyoajan bakterilerin domateslerde bitki büyüme artırıcı olarak kullanılabileceği tespit edilmiştir. Bu bağlamda, son yıllarda mikrobiyolojik etmenler olan biyolojik gübreler, bitki uyarıcılar ve biyolojik pestisidler bitkinin gerek duyduğu besin maddelerini karşılayacak olan kaynaklar olarak düşünülmektedir. Biyolojik gübre olarak kullanılacak mikroorganizmaların; ucuz olması, üretilmesinin basit,

uygulanmasının kolay olması, uzun süre depolanma imkanı sağlaması ve yüksek metabolik aktivite göstermesi gerekmektedir.

Biyolojik azot fiksasyonu, azotu toprağa kazandırmanın yollarından birisidir böylelikle bitkilerin kullanılamayan atmosferik azot, nitrogenez enzimi yardımıyla kullanılabilir amonyum formuna dönüştürülmektedir (Çakmakçı 2005).

Azot fiksasyonu yapan bakterilerden *Azospirillum*'un IAA, sitokinin ve giberallin gibi bitki hormonu üretimi ile doğrudan kök ve gövde gelişimini teşvik ederek, su ve besin maddesi alımını artırmak suretiyle bitki gelişimi ve verimini artırdığı belirttilmiştir (Gonzales *et al.* 2005). Bu çalışmada kullanılan azot fiksasyonu yapan bakterilerin de söz konusu etkileri göstererek, bitki gelişimi ve verimi arttırdığı gözlemlenmiştir.

Azot fiksasyonu yapan bakteriler ile yapılan çalışmalar, bu bakterilerin patojenlere karşı dayanıklılık sağladığını, büyüme süresini kısalttığını, bitki gelişimini teşvik ettiğini, çiçeklenme, meyve iriliğini, verim ve/veya kaliteyi ve meyve tutumunu arttırdığını göstermiştir (Bashanand de-Bashan 2002; Shridhar 2012). Elde ettiğimiz bulgular, uygulanan bakterilerin bitki gelişimi ve verim yanında, çiçeklenme süresini kısaltığını göstermiştir. Öztekin *et al.*(2015) yaptıkları bir çalışmada aynışekildeuygulanan bakterilerin bitki gelişimi ve verim yanında, çiçeklenme süresini kısaltığını bildirmişler.

Potansiyel biyoajan bakteriler azot fiksasyonu, fosforun alınabilirliğinin arttırılması, siderofor yardımıyla bitkilerce demirin alınması, bitkisel hormonların üretilmesi gibi doğrudan etkileri bulunmaktadır. Ancak toprak yapısı, pH'sı ve nemi gibi pek çok çevresel faktörün elde edilecek sonuç üzerinde etkili olacağı unutulmamalıdır (Lucy *et al.* 2004).

De-Bashan *et al.* (2014) bitki büyümesini destekleyen *B. pumilus* ES4, *B. pumilus* RIZO1 ve *Azospirillum brasilense* Cd izolatlarını, yerli *Atriplex lentiformis* bitkisinde kullanmışlar ve bu bitkininher üç bakteri ile aşılanması, çimlenme, kök uzunluğu,

sürgün ve kök kuru ağırlığı ve kök / sürgün oranı gibi bitki büyüme parametrelerini önemli ölçüde arttırdığını rapor etmişlerdir.

Gutiérrez-Mañero *et al.*(2001) Alder (*Alnus glutinosa* [L.] Gaertn.) rizosferinden izole edilen ve bitki büyümesini teşvik eden rizobakteriler (PGPR), *B. pumilus* ve *Bacillus licheniformis* izolatlaının güçlü bir büyüme destekleyici aktiviteye sahipolduğu veher iki bakteri kültürünün biyolojik olarak C19-gibberallinleri nispeten yüksek miktarda biriktiğini ve bu gibberallinin konukçu bitkide fizyolojik olarak aktif olduğunu tespit etmişlerdir.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda bitkilerde kullanılan bazı biyolojik mücadele etmenlerinin bitki hormon konsantrasyonunu artırarak gelişimi teşvik ettikleri ortaya konulmuştur (Iospenko and Ignatov 1995; Patten and Glick 1996). En önemli oksinlerden olan IAA hormonu (Ali *et al.* 2009) bitkilerde oluşturduğu etkiler şu şekildedir: Çeliklerin kök oluşumunu teşvik etmek, partenokarpik meyve tutumunu sağlamak, adventif kök oluşumunu sağlamak, meyve ve yaprak dökümünü engellemek, meyve tutumunu arttırmak, tomurcukların daha erken çiçek açmasını sağlamak ve yabancı ot gelişimini engellemek gibi etkiler olduğu bilinmektedir (Çetin 2002; Greene 2006; Baktır 2010). Bu çalışmada labaratuvar koşulları altında elde edilen sonuçlara göre iki başarılı izolatın(TV-49A ve TV-85D) bu maddeyi (IAA) üreterek bitki gelişimini teşvik ettiği belirlenmiştir.

Genellikle toprakta, suda çözünemeyen formda bulunan demir bütün canlı organizmalar için çok önemli büyüme elemanıdır (Idris *et al.* 2007). Aeroblar ve fakültatif anaeroblar metabolik fonksiyonları için demire gereksinim duymaktadırlar. Demirin kısıtlı olduğu koşullarda, birçok organizma demir iyonlarına yüksek ilgi duyan, salgılanabilir, suda çözünebilir moleküller ve düşük molekül ağırlıklı olan "siderofor"ları üretmektedirler. Bu yüksek demir (Fe^{+3}) affiniteli moleküller, demir iyonlarını bağlayarak bunları hücreye verirlmektedirler (Bora ve Özaktan, 1998). Konukçu bitkide dayanıklılığın uyarılması konusundaki çalışmalarda sideroforun, ISR'dan sorumlu olduğu saptanmıştır (Van Loon *et al.* 1998; Ramamorthy *et al.* 2001).Yürütülen bu çalışmada TV-49A ve

TV- 85D izolatlarının siderefor üretme potansiyeline sahip olduğubelirlenmiştir.Bu üretilen sideroforlar, patojen için gerekli olan demiri (III) bağlayarak, kullanım dışı yapmaktadır. Aynı zamanda sideroforlar bitki gelişiminde de katkı bulunabilmektedirler (Kamnev and Der 2002).

Çalışmada kullanılan TV-49A ve TV- 85D izolatlarının salisilik asidi oldukça yüksek oranda üretildiği tespit edilmiştir.Yapılan bir çalışmada *B. pumilus* ile uygulama yapılan bitkilerde SA oranının uygulama yapılmamış bitkilere ve gram negatif bakteriler ile uygulama yapılan bitkilere göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Zhang *et al.* 2002). SA, bitki büyümesi üzerinde olumlu etki yaptığı için yetiştiricilik açısından bazı önemli uygulamaların gerçekleştirilmesinde kullanılmaktadır. Örneğin, bitkilerde SA seviyesinin düzenlenmesi, bitki koruma alanında çok sayıda biyoteknolojik çalışmanın gerçekleştirilmesine yol açmaktadır. Günümüzde ise artık pratikte, bitkilerde SA büyüme düzenleyicisi olarak kullanılmaya başlanmıştır (Özeker 2005).SA'in çiçeklenmeyi teşvik edici etkisinin olduğuna dair ilk kanıt, tütün doku kültürlerinden elde edilmiştir (Lee and Skoog 1965). SA tütün kallus kültürlerinde çiçek tomurcuğu oluşumunu teşvik ettiği bildirilmiştir (Eberhart *et al.* 1989). Konuyla ilgili yapılan ilk çalışmalarda, ISR'nin oluşumunda da SA'in rolü olduğu düşünülmüş (Maurhofer *et al.* 1994)veyapılan çalışmalarda ISR uyarılmasını sağladığı düşünülen rizobakteryal bir metabolitin SA olduğu tespit edilmiştir. Ancak yapılan deneysel çalışmalar SA'in ISR ile direkt ilişkili olmadığını kanıtlamıştır (Özeker 2005). Patojen saldırılarına karşı bütün bitkiler aktif savunma mekanizmalarına sahiptirler. Eğer savunma mekanizmaları bitki patojeni infeksiyonundan önce başlatılabilirse hastalık azaltılabilir. ISR, bitkinin uygun şekilde teşvik edildiğinde oluşturduğu savunma kapasitesinin arttırılması durumudur (Kuc 1982; 1995). ISR, bitkinin geniş bir patojen ve zararlı dizisine karşı uygun bir uyarma sonucu savunma kapasitesi artışı olarak da tanımlanır (Ramamorthy *et al.* 2001). Bu tanımlamaların yanında ISR, olmayan bir dayanıklılığın yaratılması değil pasif durumdaki dayanıklılık mekanizmalarının harekete geçirilmesişeklinde tanımlanabilir (Van Loon *et al.* 1998). *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp. ve *Trichoderma* spp. gibi bazı biyoajan izolatlrın bitkilerde savunma oluşturdukları için çok önemli izolatlar olarak bilinmektedirler (Harman 2004; Haas and Defago 2005; Takishita *et al.*

2018). Günümüzde *Bacillus* cinsi üzerine çok çalışma yapılmıştır (Brain *et al.* 2004; Shanmugam and Narayanasamy 2008). *Bacillus cereus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus mycoides*, *B. pumilus*, *B. subtilis* ve *B. sphaericus* gibi bazı türlerinin lokal ve sistemik olarak konukçu dayanıklılık mekanizmalarını harekete geçirdikleri bildirilmiştir (Kloepper *et al.* 2004). Antibiyosis, besin-yer yarışması ve dayanıklılığın uyarılması gibi birbirinden farklı mekanizmaları kullanan kök bakterilerinin kombinasyonu yoluyla aynı konukçuda birden fazla hastalığa karşı biyolojik savaşta sinerjistik etki yoluyla başarı sağlanabilmektedir (Aslan veÖzaktan 2005). Antibiyotik (bakteriyel metabolit) üretiminin ISR'deki rolü araştırıldığında etkinin bitki aracılığıyla değil direkt patojen aracılığıyla gerçekleştirilmiştir. Ancak bu metabolitlerin bitkiler üzerinde strese yol açarak dayanıklılığı da uyarabileceği belirtilmektedir. ISR'nin uyarılmasında bir ölçüde etkili olabileceği düşünülen antibiyotiklerle ilgili çeşitli çalışmalar yapılmıştır (Bakker *et al.* 2003).

Domates solgunluğunun (*Fusarium oxysporum*f.sp. *lycopersici*) biyolojik mücadelesinde *Bacillus* spp. türleri kullanarak, savunma enzimlerinin(polifenol oksidaz (PPO) ve fenilalanin amonialiaz (PAL))bitki'de yükseldiğini bildirmişlerdir (Kloepper *et al.* 2004).Dashtipour *et al.* (2017) *B. Subtilis* izolatını *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* ve *Meloidogyne javanica* mücadelesinde kullanmışlar ve peroksidaz ve fenolun arttırıcı etkilerininher iki uygulamadagözlemlemişlerdir.Yapılan başka bir çalışmada *B. subtilis* EPCO 102tarafından pamukta biriken 1,3-glukanaz, POX ve kitinaz, bakteriyel yanıklığakarşı dirençliliği uyardığı tespit edilmiştir (Rajendran *et al.* 2006). Oraghi Ardebili *et al.* (2011)domateste *P. fluorescens* CHA0 uyguladıklarında peroksidaz (POX), polifenoloksidaz (PPO) ve superoksid dismutaz (SOD)aktivitelerinin uyarıldığını bildirmişlerdir. Bitkide savunma proteinlerini uyarılarakpatojene karşı savunma mekanizmasının faaliyet gösterdiği saptanmiştir (Ramamoorthy *et al.* 2002). *P. fluorescens* tarafından muz köklerinde biriken PAL, POX ve PPO, *F. oxysporum* f.sp. *cubense* karşıdirençliği uyardığı saptanmiştir (Saravanan *et al.* 2004). Bu çalışmada antioksidan enzimlerden: peroksidaz, polifenol oksidaz, superoksid dismutaz ve katalaz aktivitelerinin araştırılmış ve bakterilerin inokülasyonundan sonra yükseldiği tespit edilmiştir.

5.1. Sonuç

Domatesin tarımsal üretim içerisindeki ekonomik önemi, bitkilerin sağlıklı kalabilmesi için maksimum düzeyde hastalık ve zararlı kontrolünü gerektirmektedir. Domateste bakteriyel solgunluk hastalığına neden olan *Cmm*'in bitki büyüme düzenleyici bakterilerle biyolojik mücadele olanakları ve potansiyel biyoajan bakterilerin bitki gelişimini teşvik eden etkilerini hedefleyen bu doktora çalışmasında elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

1. Domates bakteriyel solgunluk hastalığı ile mücadelede yoğun kimyasal kullanımına rağmen etkili bir sonucun alınamaması ve kullanılan kimyasalların insan ve çevre sağlığına olan olumsuz etkileri alternatif yöntemler ile mücadeleyi gündeme getirmiştir. Bu çalışmada hastalığın potansiyel biyoajan bakteriler ile mücadele olanakları *in vitro* ve *in vivo* çalışmaları ile araştırılmıştır. *In vitro* çalışmalarında toplam 1150 adet izolat test edilerek sadece 48 izalatın etkili olduğu belirlenmiştir.

2. Viyol denemesinde etkili olan 7 bakteri, saksı ve tarla denemelerinde kullanılmıştır. Seçilen 7 potansiyel biyoajan bakteri izolatları saksı ve tarla denemelerinde kök uygulaması şeklinde bitkiye verildiğinde uygulamaların TV-49A ve TV-85D kodlu bakterilerin büyük bir oranda hastalığı baskıladıkları görülmüştür.

3. Saksı ve tarla çalışması sonucunda etkili bulunan 2 izolatın (TV-85D ve TV-49A) formülasyonu oluşturulmuş ve bu izolatların sadece bakteriyel patojenle mücadele etmeyip aynı zamanda domates bitkilerinde bitki büyümesini farklı oranlarda arttırdığı ortaya konulmuştur.

4. ISR hem toprak hem de yaprak patojenlerinin biyolojik mücadelesinde iş gören etkili bir biyokontrol mekanizmasıdır. Çok sayıda bitki patojenine karşı etkili olmasının yanı sıra, bitkide var olan dayanıklılık mekanizmalarını aktive ettiği için, hastalıklara karşı dayanıklılığın uyarılması son yıllarda bitki patolojisinde etkin bir bitki koruma yöntemi olarak dikkat çekmektedir. Konukçu bitkide dayanıklılığın bir kez tetiklenerek

uyarıldıktan sonra koruyucu etki diğer savaşım yöntemlerine oranla, genellikle daha kalıcı olduğu belirlenmiştir.

5. Çalışmalar sonucunda domateslerde *Cmm*'in mücadelesinde potansiyel biyoajan bakterilerin kullanımının çok olumlu sonuçlar verdiği ortaya konulmuştur. Başarılı izolatların formülasyon haline getirilerek üretici koşullarında kullanım olanakları belirlenmiştir.İlerleyen dönemlerde başarılı sonuçlar veren izolatların daha uzun raf ömrüne sahip formülasyonları araştırılmalıdır ve bu formülasyonların birden fazla yararlı organizma içermesi için araştırmalar yapılmalı ve domatesteki diğer patojenik hastalıklara karşı da etkili olabileceği en iyi kombinasyonlarının oluşturulması ile ilgili çalışmalara ağırlık verilmelidir.

6. Yapılan bu çalışmalar sonucunda domateslerde *Cmm*'in mücadelesinde potansiyel biyoajan bakterilerin 16s rDNA sekans sonuçlarına göre *B. pumilus* TV-49A ve *B. velezensis* TV-85D olarak tanıları yapılmıştır. Yapılan literatür taramasına göre bu iki izolatın daha önce *cmm*'e karşı kullanılmadığı, bu nedenle hem Dünyada hemde Türkiyede bu çalışmanın ilk olduğu düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

Agrios, G.N., 2005. Plant Pathology. 5 th., Ed. Elvesier Academic Press, 530 p, London, UK.

Akat, S. ve Özaktan, H., 2011. Domates bakteriyel kanser ve solgunluk hastalığıyla [*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis *et al.*] biyolojik mücadelede bakteriyel antagonistlerin etkinliğinin araştırılması. Türkiye Biyolojik Mücadele Dergisi, 2 (1), 3-18.

Aksoy, H.M., Kaya, Y., Ozturk, M., Secgin, Z., Onder, H. and Okumus, A., 2017. *Pseudomonas putida* – Induced response in phenolic profile of tomato seedlings (*Solanum lycopersicum* L.) infected by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Biological Control, 105, 6-12.

Alexander, D.B. and Zuberer, D.A., 1991. Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. Biology and Fertility of Soils, 12, 39-45.

Ali, B., Sabri, A.N., Ljung, K. and Hasnain, S., 2009. Auxin production by plant associated bacteria: impact on endogenous IAA content and growth of *Triticumaestivum* L. Letters in Applied Microbiology, 48, 542-547.

Amkraz, N., Boudyach, E.H., Boubaker, H., Bouizgarne, B. and Ait Ben Aoumar, A., 2010. Screening for fluorescent pseudomonades, isolated from the rhizosphere of tomato, for antagonistic activity toward *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 26,1059-1065.

Antoniou, P.P., Tjamos, E. J. and Panagopoulos, S.G., 1995. The use of soil solarization for controlling bacterial canker of tomato in plastic houses in Greece. Plant Pathology, 44, 438-447.

Aslan, E. ve Özaktan, H., 2005. Kök bakterileri tarafindan konukçu bitkide hastaliklara karşi sistemik dayanikliliğin uyarilmasi. Anadolu Journal of Aegean Agricultural Research Institute, 15 (1), 84-100.

Aslantaş, R., Çakmakçi, R. andŞahin, F., 2007. Effect of plant growth promoting rhizobacteria on young apple tree growth and fruit yield under orchard conditions. Scientia Horticulturae, 111, 371-377.

Atlas, R.M., 1997. Handbook of Microbiological Media. CRC Press, 1706 p, Boca Raton.

Bakker, P.A.H.M., Ran,L.X., Pieterse, C.M.J. and Van Loon, L.C., 2003. Understanding the involvement of rhizobacteria-mediated induction of systemic resistance in biocontrol of plant diseases. Canadian Journal of Plant Pathology, 25, 5-6.

Baktır, İ., 2010. Bitki Büyüme Düzenleyicileri Özellikleri ve Tarımda Kullanımları. Hasad Yayıncılık, 112s, Antalya.

Banat, J.M., Makkar, R.S. and Cameotra, S.S., 2000. Potential commercial applications of microbial surfactants. Applied Microbiology and Biotechnology,53, 495-508.

Bashan, Y. and de-Bashan, L.E., 2002. Protection of tomato seedlings aganist infection by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* by using the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilens*. Applied and Environmental Microbiology, 6, 2637-2643.

Basım, E., Basım, H. and Özcan, M., 2005. Antibacterial activities of Turkish polen and propolsis extracts against plant bacterial pathogens. Journal of Food Engineering, 77, 992-996.

Basim, E., Basim, H., dickstein E. R. and Jones J. B., 2004. Bacterial canker caused by *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis* on greenhouse-grown tomato in the Western Mediterranean Region of Turkey. Plant Disease, 88,1048.

Basu, P.K., 1966. Conditions for symptomatological differentiation of bacterial canker, spot, and speck of tomato seedlings. Canadian Journal of Plant Science, 46, 525-530.

Baysal, Ö., Gürsoy, Y.Z., Örnek, H. and Duru, A., 2005. Induction of oxidants in tomato leaves treated with DL-*b*-Amino butyric acid (BABA) and infected with *Clavibacter michiganensis* susp. *michiganensis.* European Journal of Plant Pathology, 112, 361-369.

Beimen, A., Bermpohl, A., Meletzus, D., Eichenlaub, R. and Barz, W., 1992. Accumulation of phenolic compounds in leaves of tomato plants after infection with *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense* strains differing in virulence. Zeitschrift für Naturforschung, 47, 898-909.

Benner, J.P., 1993. Pesticidal compounds from higher plants. Pesticide Science, 39, 95-102.

Bent, E., Tvzun, S., Chanway, C.P. and Enebak, S., 2001.Alterations in plant growth and root hormone levels of lodge pole pines inoculated with rhizobacteria. Canadian Journal of Microbiology, 47, 793-800.

Bermpohl, A., Drier, J., Bahro, R.and Eichenlaub,R., 1996. Exopolysaccharides in the pathogenic interaction of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* with tomato plants. Microbiological Research, 151, 391-399.

Bilgehan, H., 2009. Klinik Mikrobiyolojik Tanı. 3. Baskı, Barış Yayınları Fakülteler Kitapevi, 110 s, İzmir.

Bloemberg, G.V. and Lugtenberg, B.J.J., 2001. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. Current Opinion in Plant Biology, 4, 43-350.

Bochow, H., 1995. Mode of action and practical use of the *Bacillus subtilis* as complex acting bioproduct. In: Manka M, ed. Environmental Biotic Factors in Integrated Plant Disease Control. The Polish Phytopathological Society, Poznan, Poland, 97–104.

Bora, T. ve Özaktan,H., 1998. Bitki Hastalıklarıyla Biyolojik Savaş. Prizma Matbaası, 205s, Izmir.

Boudyach, E.H., Fatmi, M., Akhayat, O., Benizri, E. and Aoumar, A.A.B., 2001. Selection of Antagonistic Bacteria of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* and Evaluation of Their Efficiency Against Bacterial Canker of Tomato. Biocontrol Science and Technology, 11, 141-149.

Brain, B., Gardener, M. and Driks, A., 2004. Overview of the nature and application of biocontrol microbes: *Bacillus* sp. Phytopathology, 94, 1244-1249.

Bremer H., Karel, G., Bıyıkoğlu, K., Göksel,N. and Petrak,F., 1952. Türkiye'nin parazit mantarları üzerinde incelemeler (Schizomycetes, Oomycetes, Ascomycetes 2). İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi Mecmuası, 17, 145 -160.

Bryan, M.K., 1930. Studies on bacterial canker of tomato. Journal of Agriculture Research, 41, 825-850.

Burger, A., Eichenlaub, R., 2003. Genetics of phytopathogenic bacteria. Progress in Botany, 64, 98-114.

Burger, A., Gräfen, I., Engemann, J., Niermann, E., Pieper, M., Kirchner, O., Gartemann, K.H. and Eichenlaub, R., 2005. Identification of homologues to the pathogenicity factor Pat-1, a putative serine protease of *Clavibactermichiganensis* subsp. *michiganensis*. Microbiological Research, 160, 417-427.

Cakmakci, R., Kantar, F., and Sahin, F., 2001. Effect of N2-fixing bacterial inoculations on yield of sugar beet and barley. Journal of Plant Nutrition and Soil Science, 164, 527- 531.

Cakmak, I. and Horst, J.H., 1991. Effects of Aluminum on Lipid Peroxidation, Superoxide Dismutase, Catalase, and Peroxidase Activities in Root Tips of Soybean (Glycine max). Physiologia Plantarum, 83, 463-468.

Carlson, R.R., Randall, R., Vidaver, A.K., 1982. Bacterial mosaic, a new corynebacterial disease of wheat (*Triticum aestivum*). Plant Disease, 66, 76-79.

Carlton, W.M., Braun, E.J. and Gleason, M.L., 1998. Ingress of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* into tomato leaves through hydathodes.Phytopathology, 88, 525-529.

Castro, M.S. and Fontes, W., 2005. Plant defense and antimicrobial peptides. Protein and Peptide Letters, 12, 11-16.

Chang R.J., Ries, S.M. and Pataky, J.K., 1992. Local sources of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in the development of bacterial canker on tomatoes. Phytopathology, 82, 553-60.

Chang, M., Moon, S.H. and Chang, H.C., 2012. Isolation of *Bacillus velezensis* SSH100-10 with antifungal activity from Korean traditional soysauce and characterization of its antifungal compounds. Korean Journal of Food Preservation, 19, 757-766.

Chang, R.J., Ries, S.M. and Pataky, J.K., 1991. Dissemination of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* by practices used to produce tomatotransplants. Phytopathology, 81, 1276-1281.

Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clement, C. and Barka, E.A., 2005. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: Principles, mechanisms of action, and future prospects. Applied and Enviromental Microbiology, 71, 4951-4959.

Cook, R.J. and Baker, K.F., 1983. The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens. APS, 539 p, St Paul, Minn.

Cuppels D., Sahin, F. and Miller, S.A., 1999. Management of bacterial spot of tomato and pepper using a plant resistance activator in combination with microbial biocontrol agents. Phytopathology, 89, 19-25.

Çakmakçı, R., 2005. Bitki gelişimini teşvik eden rizobakterilerin tarımda kullanımı. Atatürk Üniviversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 36, 97-107.

Çakmakçı, R. ve Erdoğan, Ü., 2005. Organik Tarım İspir Hamza Polat Meslek Yüksek Okulu Ders Yayınları, 2, 121-124.

Çakmakçı, R., 2006. Bitki Gelişme Promotörü Rizobakteri Kullanımındaki Son Gelişmeler :Organik Tarım Perspektif ve Uygulamaları. Organik Tarım Kongresi, Yalova.

Çelik, Ş. ve Özbay, N., 2015. Almon Gecikme Modeli ile Domates Üretiminde Üretim-Fiyat İlişkisinin Analizi: Türkiye Örneği. Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi, 2 (2), 207–213.

Çetin, V., 2002. Meyve ve Sebzelerde Kullanılan Bitki Gelişmeyi Düzenleyiciler. Gıda ve Yem Bilimi Teknolojisi Dergisi, 2, 40-50.

Çetinkaya-Yıldız, R. ve Aysan, Y., 2007. Domates bakteriyel solgunluk hastalığı (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*)'nın bitki büyüme düzenleyici rhizobakteriler (PGPR) ile mücadelesi. Türkiye II. Bitki Koruma Kongresi, Isparta.

Çetinkaya-Yıldız, R., 2007. Domates bakteriyel solgunluk hastaliği etmeni [*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis et. al.]'nin tanilanmasi ve bitki büyüme düzenleyici rizobakteriler ile biyolojik mücadele olanaklarinin araştirilmasi. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Adana.

Çınar, Ö., 1978. Yapay Ortamda Corynebacterium *michiganense* (Erwin F. Smith) jensen, *Pseudomonas tomato* (Okabe) Alstatt ve *Xanthomonasvesicatoria* (Doidge) Dowson'ya karşı tarımsal savaş preperatları biyolojik savaş etkinliklerinin saptanması. Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yıllığı, Sayı 1, 14 s, Adana.

Çınar, Ö., 1980. Bakteriyel Domates solgunluğu hastalığı (*Corynebacterium michiganense* (Erwin. F. Smith) Jensen)'nın tanımı, savaş yöntemlerive etmene karşı dayanıklı domates çeşitleri üzerine araştırmalar.Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları,139, 31-36.

Dafereraa, D.J., Ziogasb, B.N. and Polissiou, M.G., 2003. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis*. Crop Protection, 22, 39-44.

Dashtipour, S., Sahebani. N. and Aminian, H., 2017. Induction of resistance and changes of phenol and peroxidase in tomato plants treated with *Bacillus subtilis* and salicylic acid against Fusarium wilt and root-knot diseases. Research in Plant Pathology, 5 (1), 47-58.

Davis, M.J., Gillaspie Jr, A.G., Vidaver, A.K. and Harris, R.W., 1984. *Clavibacter*: A new genus containing some phytopathogenic coryneform bacteria, including *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* sp. nov., subsp., nov. and *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis* subsp. nov., pathogens that cause ratoon stunting disease of sugarcane and bermudagrass stunting disease. International Journal of Systematic Bacteriology, 34, 107-117.

De Freitas, J.B., Benerjee, M.R., and Germida, J.J., 1997. Phosphate solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola (*Brassica napus* L.) Biology and Fertility of Soils, 24, 358-364.

De Gara, L., De Pinto, M. and Tommasi, F., 2003. The antioxidant systems via reactive oxygen species during plant-pathogen interaction. Plant Physiology And Biochemistry, 41, 863-870.

De León, L., Siverio, F., López, M.M. and Rodriguez, A., 2008. Comparative efficiency of chemical compounds for in vitro and in vivo activity against *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, the causal agent of tomato bacterial canker. Crop Protection, 27, 1277-1283.

De-Bashan, L.E., Hernandez, J. P., Bashana, Y. and Maiera, R., 2010. *Bacillus pumilus* ES4: candidate plant growth-promoting bacterium to enhance establishment of

plants in mine tailings. Environmental and Experimental Botany, 69(3), 343-352.

Demır, H. ve Akgun, I.H., 2014. Domatesin sağlık açısından önemi ve besin değeri. Hasad, 353, 38-40.

Dezordi, C., Maringoni, A.C., Machado Menten, J.O. and Cassia Camara, R., 2009. Semi-selective culture medium for *Xanthomonas axonopodis*pv.*malvacearum*detection in cotton seeds (*Gossypium hirsutum*L.). Asian Journal of PlantPathology, 3 (2), 39-49.

Dhanvantarı, B.N., 1989. Effect of seed extraction methods and seed treatments on control of tomato bacterial canker. Canadian Journal of Plant Pathology, 11, 400-408.

Döken, T., Demirci E. ve Zengin H., 2000. Fitopatoloji. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Ofset Tesisi, 256 s, Erzurum.

Dreier, J., Meletzus, D., and Eichenlaub, R., 1997. Characterization of the plasmid encoded virulence region *pat-1* of phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Molecular Plant-Microbe Interactions, 10, 195-206.

Eberhard, S., Doubrava, N., Marta, V., Mohnen, D., Soutwick, A., Darvill, A. and Albersheim, P., 1989. Pectic Cell Wall Fragments Regulate Tobacco Thin-CellLayer Explant Morphogenesis. Plant Cell, 1, 747-755.

Eichenlaubö R., Gartemann, K. H. and Burger, A., 2006. *Clavibacter michiganensis*, a group of Gram-positive phytopathogenic bacteria.*In* S.S. Gnanamanickam (ed.), Plant-Associated Bacteria, Springer Netherlands, Dordrecht, The Netherlands, 385-421.

Elsheikh, E.A.E. and Elzidany, A.A., 1997. Effects of Rhizobium İnoculation, Organic and Chemical Fertilizers on Yield and Physical Properties of Faba Bean Seeds. Plant Foods for Human Nutrition, 51, 137-144.

EPPO. 2016. PM 7/42 (3) *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, 46, 202–225.

Ercan, N., Ayar, F., Şensoy, A.S. and Temirkaynak, M., 2002. Bazı Domates Çeşitlerinin Antalya Koşullarında Açıkta Yetiştirme Olanakları Üzerinde Bir Araştırma. Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 15(2), 101-105.

Erman, M., Kotan, R., Çakmakçı, R., Çığ, F., Karagöz, K. and Sezen, M., 2010. Effect of nitrogen fixing and phosphate-solubilizing Rhizobacteria isolated from Van Lake Basin on the growth and quality properties in wheat and sugar beet. IV.Organic FarmingSymposium, Erzurum, Turkey.

Esitken, A., Ercisli, S., Sevik, İ. and Sahin, F., 2003b. Effect of Indole-3- Butyric Acid and Different Strains of *Agrobacterium rubi* on Adventitive Root Formation from Softwood and Semi-Hardwood Wild Sour Cherry Cuttings. Turkish Journal of Agriculture & Forestry, 27, 37-42.

Esitken, A., Karlidag, H., Ercisli, S., Turan, M. and Sahin, F., 2003a. The effect of spraying a growth promoting bacterium on the yield, growth and nutrient element composition of leaves of apricot (Prunus armeniaca L. cv. Hacihaliloglu). Australian Journal of Agricultural Research, 54(4), 377-380.

Falahian, F., Oraghi Ardebili, Z. and Fahimi, H., 2007. Effect of mycorrhizal fungi on some defence enzymes against *Gaeumannomyces graminis* in Wheat. Pakistan Journal of Biological Sciences, 10(14), 2257-2266.

Falkow, S., 1958. Activity of lysine decarboxylase as an aid in the identification of Salmonellae and Shigellae. Technical bulletin of the Registry of Medical Technologists, 28(5), 106-108.

Fatmi, F., and Schaad, N.W., 2002. Survival of *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* in infected tomato stems under natural field conditions in California, Ohio and Morocco. Plant Pathology, 51, 149-154.

Gao, Z., Zhang, B., Liu, H., Han, J. and Zhang, Y., 2017. Identification of endophytic *Bacillus velezensis* ZSY-1 strain and antifungal activity of its volatile compounds against *Alternaria solani* and *Botrytis cinerea*. Biological Control, 105, 27-39.

Gartemann, K.H., Abt, B., Bekel, T., Burger, A., Engemann, J., Flügel, M., Gaigalat, L., and Goesmann, A., 2008. The genome sequence of the tomato-pathogenic actinomycete *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382 reveals a large island involved in pathogenicity. Journal of Bacteriology,190, 2138-2149.

Gartemann, K.H., Kirchner, O., Engemann, J., Gräfen, I., Eichenlaub, R., and Burger, A., 2003. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*: first steps in the 156 understanding of virulence of a Gram-positive phytopathogenic bacterium. Journal of Biotechnology, 106, 179-191.

Giannopolitis, C.N., and Ries, S.K., 1977. Superoxide dismutases I. occurrence in higher plants. Plant Physiology, 59, 309-314.

Gitaitis, R.D., Beaver, R.W., and Voloudakis, A.E., 1991. Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in symptomless tomato transplants. Plant Disease, 75, 834-838.

Gleason, M.L., Gitaitis, R.D. and Ricker, M.D., 1993. Recent progress in understanding and controlling bacterial canker of tomato in eastern north America. Plant Disease, 77, 1069-1076.

Gonzalez, L.J., Rodelas, B., Pozo, C., Salmeron, V., Martinez, M.V. and Salmeron, V., 2005. Liberation of amino acids by heterotrophic nitrogen fixing bacteria. Amino Acids, 28, 363-367.

Greene, D.W., 2006. An update on preharvest drop control of apples with aminoethoxyvinylglycine (Retain). Acta Horticulture, 727, 311-320.

Günay, A., 2005. Sebze Yetistiriciliği. Cilt II, Meta Basımevi, 531s, İzmir.

Gutiérrez-Mañero, F.J., Ramos-Solano, B., Probanza, A., Mehouachi, J., Tadeo, F.R. and Talon, M., 2001. The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis*produce high amounts of physiologically active gibberellins. Physiologia Plantarum, 111(2), 206-211.

Haas, D. and Defago, G., 2005. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. Nature Reviews Microbiology, 3, 307-319.

Hammer – Schmidt, R., 1999. Induced disease resistance: how do induced plants stop pathogens. Physiological and Molecular Plant Pathology, 55, 77-84.

Hardoim, P.R., Van Overbeek, L.S. and Van Elsas, J.D., 2008. Properties of bacterialendophytes and their proposed role in plant growth. Trends Microbiology, 16,463-471.

Harman, G.E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I. and Lorito, M., 2004. Trichoderma species-opportunistic, avirulent plant symbionts. Nature Reviews Microbiology, 2, 43-56.

Harwood, C. R., 1989. *Bacillus*. Biotechnology Handbooks. 2. Edited by T. Atkinson & R. F. Sherwood. Elsivier, 235p,New York & London: Plenum.

Hausbeck, M. K., Bell, J., Medina-Mora, C. M., Podolsky, R., and Fulbright, D. W., 2000. Effect of bactericides on population sizes and spread of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on tomatoes in the greenhause and on disease development and crop yield in the field. Phytopathology, 90, 38-44.

Idris, E.E., Iglesias, D.J., Talon, M., Borriss, R., 2007. Tryptophan-dependent production of indole-3-acetic acid (IAA) affects level of plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. Molecular Plant-Microbe Interaction, 20, 619- 626.

Iospenko, A., Ignatov, V., 1995. Physiological aspects of phytohormon production by *Azospirillum brasilense* Sp7. NATO ASIScript Galena, 37, 307-312.

Ivey, M. L., and Miller, S. A., 2000. First report of bacterial canker of pepper in Ohio. Phytopathology, 90, 38-44.

Jacobson, C.B., Pasternak, J.J. and Glick, B.R., 1994. Partial purification and characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase from the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2. Canadian Journal of Microbiology, 40, 1019-1025.

Jahr, H., Bahro, R., Burger, A., Ahlemeyer, J. and Eichenlaub, R., 1999. Interactions between *Clavibacter michiganensis* and its host plants. Environmental Microbiology, 1, 113-118.

Jahr, H., Dreier, J., Meletzus, D., Bahro, R. and Eichenlaub, R., 2000. The Endo-β-1,4-glucanase CelA of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* is a pathogenicity determinant required for induction of bacterial wilt of tomato. Molecular Plant-Microbe Interactions, 1, 703-714.

Jung, W.J., Mabood, F., Souleimanov, A., Whyte, L.G., Niederberger, T.D. and Smith, D.L., 2014. Antibacterial activity of antagonistic bacterium *Bacillus subtilis* DJM-51 against phytopathogenic *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense* ATCC 7429 in vitro. Microbial Pathogenesis, 77, 13-16.

Kamnev, A. and Der, L.D.V., 2000. Chemical and biological parameters as tools to evaluate and improve heavy metal phytoremediation. Bioscience Reports, 20, 239-258.

Kar, M. and Mishra, D., 1976. Catalase, peroxidase and polyphenol oxidase activity during leaf senescence. Plant Physiology, 57, 315.

Karagöz, K., 2009. Bazı PGPR Bakterilerin Marulun Gelişimi ve Marul Yaprak Leke Hastalığı Üzerine Etkileri. Y. Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

Keskin, G. ve Gül, U., 2004, Tarımsal Araştırma Enstitüsü Yayını, Bakış Dergisi Sayı: 5, Nüsha: 13, Ankara.

Keskin, G., 2012, Durum ve Tahmin Domates ve Domates Salçası Durum ve Tahmin 2011-2012.Tarım Ekonomisi ve Politika Geliştirme Enistitüsü Dergisi, Sayı: 201, Ankara.

King, E.O., Ward, M.K. and Raney, D.E., 1954. Two simple media for the demonstration of pyocianin and flouresin. Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 44, 301-307.

Klement, Z., Rudolph, K. and Sands, D. C., 1990. Methods in Phytobacteriology. Akademıaı Kıado, 547 p, Budapest.

Kloepper, J.W., Ryu, C.M. and Zhang, S., 2004. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. Phytopathology, 94, 1259-1266.

Kotan, R., Sahin, F., Demirci, E., Ozbek, A., Eken,C. and Miller,S.A., 1999. Evaluation of antagonistic bacteria for biological control of Fusarium dryrot of potato. Phytopathology, 89, 41.

Kotan, R. ve Sahin, F., 2002. Bitki hastalıkları ile biyolojik mücadelede bakteriyel organizmaların kullanılması. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 31(1), 111-119.

Kotan, R., 1998. Biological and chemical control of bacterial leaf spot *(Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Doidge) Dye.) on pepper and tomato. MS Thesis, Atatürk University, Graduate School of Natural and Applied Sciences, Department of Plant Protection, Erzurum.

Kotan, R., 2002. Doğu Anadolu Bölgesi'nde yetiştirilen yumuşak çekirdekli meyve ağaçlarından izole edilen patojen ve saprofitik bakteriyel organizmaların klasik ve moleküler metotlar ile tanısı ve biyolojik mücadele imkânlarının araştırılması. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilim Dalı, Erzurum.

Kotan, R., Cakir, A., Dadasoglu, F., Aydin, T. and Cakmakci, R., 2010. Antibacterial activities of essential oils and extracts of Turkish *Achillea*,*Satureja* and *Thymus* species against plant pathogenic bacteria. Journal of the Science of Food and Agriculture, 90, 145-160.

Kotan, R., Dikbaş, N. and Bostan, H., 2009. Biological control of post harvest disease caused by *Aspergillus flavus* on stored lemon fruits. African Journal of Biotechnology, 8 (2), 209-214.

Kotan, R., Sahin, F., Demirci, E. ve Eken, C., 2002. Patates (*Solanum tuberosum* L)'te kuru çürüklüğe sebep olan fungal patojenlerden *Fusarium solani*'ye karşı potansiyel bakteriyel etmenler kullanılarak biyolojik mücadele imkanlarının araştırılması. Türkiye V. Biyolojik Mücadele Kongresi, Erzurum.

Krebs, B., Höding, B., Kübart, S., Alemayehu Workie, M., Junge, H., Schmiedeknecht, G., Grosch, R., Bochow, H. and Hevesi, M., 1998. Use of *Bacillus subtilis* as biological control agent. I. Activities and characterization of *Bacillus subtilis* strains. Journal of Plant Disease and Protection, 105, 97-181.

Krıtzman, G., 1993. A Chemi-thermal treatment for control of seedborne Bacterial Pathogens of Tomato. Phytoparasitica, 21, 101-109.

Kuc, J., 1982. Induced immunity to plant disease. Bioscience, 32, 854-60.

Kuc, J., 1995. Induced systemic resistance-an overview. Springer Link, Kentucky, USA, 169-175.

Küçük, Ç. ve Güler, İ., 2009. Bitki Gelişimini Teşvik Eden Bazı Biyokontrol Mikroorganizmalar. Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR (Eski adı: OrLab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi), 7(1), 30-42.

Lanteigne, C., Gadkar, V.J., Wallon, T., Novinscak, A. and Filion, M., 2012. Production of DAPG and HCN by *Pseudomonas* sp. LBUM300 Contributes to the Biological Control of Bacterial Canker of Tomato. Biological control, 102, 967-973.

Lee, J.H., Seo, M.W. and Kim, H.G., 2012. Isolation and characterization of an antagonistic endophytic bacterium*Bacillus velezensis* CB3 the control of citrus

green mold pathogen *Penicillium digitatum*. Indian Economic & Social History Review, 40, 415-442.

Lee, T.T. and Skoog, F., 1965. Effect of Substituted Phenols on Bud Formation and Growth of Tobacco Tissue Culture. Physiologia Plantarum, 18, 386-402.

Lelliot, R.A. and Stead, D.E., 1987. Methods For the Diagnosis of Bacterial Diseases of Plants. Black Well Scientific Puplication, 157 p, Oxford, USA.

Liu, L., Kloepper, J. W. and Tuzun, S., 1995. Induction of systemic resistance in cucumber by plant growth-promoting rhizobacteria: Duration of protection and effect of host resistance on protection and root colonization. Phytopathology, 85, 1064-1068.

Loeffler, W., Tschen, S-M, Vanittanakom, N., Kugler, M., Knorpp, E., Hsieh, T-F and Wu, T-G, 1986. Antifungal effects of bacilysin and fengymycin from *Bacillus subtilis* F-29-3: a comparison with activities of other *Bacillus* antibiotics. Journal of Phytopathology, 115, 204-13.

Lucy, M., Reed, E. and Glick, B.R., 2004. Aplications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. Antonie van Leeuwenhoek, 86, 1-25.

Ma, J., Liu,H., Liu,K., Wang,C., Li,Y., Hou, Q., Yao, L., Cui, Y., Zhang, T., Wang, H., Wang, B., Wang, Y., Ge, R., Xu, B., Yao, G., Xu,W., Fan, L., Ding, Y. and Du,B., 2017. Complete genome sequence of *Bacillus velezensis* GQJK49, a plant growth-promoting rhizobacterium with antifungal activity. Genome Announcement, Prokaryotes, 5(35), 1-2.

Malolepsza, U. and Rózalaska, S., 2005. Nitric oxide and hydrogen peroxide in tomato resistance. Nitric oxide modulates hydrogen peroxide level in O.hydroxyethylorutin-induced resistance to *Botrytis cinerea* in tomato. Plant Physiology and Biochemistry, 43, 623-635.

Mansfeld-Giese, K., 1997. Plant-to-plant transmission of the bacterial ring rot pathogen *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. Potato Research, 40, 229-235.

Manzer, F. and Genereux, H., 1981. Ring rot. In: Hocker, W.J. (Ed.), Compendium of Potato Diseases. American Phytopathology Society Street Paul,MN, USA, 31-32.

Maurhofer, M., Hase, C., Meuwly, P., Metraux, J.P. and Defago, G., 1994. Induction of systemic resistance of tobacco to tobacco necrosis virus by the rootcolonizing *Pseudomonas fluorescens* strain CHAO: influence of the gacA gene and polyverdine production. Phytopathology, 84, 139-146.

Mayer, A.M. and Harel, E., 1991. Phenol oxidases and their significance in fruit and vegetables. In: Fox PF (Ed) Food enzymology. Elsevier, New York, USA,373-398.

McCulloch, L., 1925. *Aplanobacter insidiosum* n. sp., the cause of an alfalfa disease. Phytopathology, 15, 496-497.

Mcguire R.G., 1992. Reporting of objective color measurements. HortSicence, 27, 1254-1255.

Meletzus, D., Bermpohl, A., Dreier, J. and Eichenlaub, R., 1993. Evidence for plasmid-encoded virulence factors in the phytopathogenic bacterium *Clavibactermichiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382. Journal of Bacteriology, 175, 2131-2136.

Mew, T.W. and Rosales, A.M., 1986. Bacterisation of rice plants for control of sheath blight caused by *Rhizoctonia solani*. Phytopathology, 76, 1260-1264.

Meyer, J. M., Azelvandre, P. and Georges, C., 1992. Iron metabolism in *Pseudomonas*. Salicylic acid, a siderophore of *Pseudomonas fluorescens* CHAO. Biofactors, 4, 23-27.

Meyer, J.M. and Abdallah, M.A., 1978. The fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens*: Biosynthesis, purification and physiochemical properties. Journal of General Microbiology, 107, 319-328.

Milijašević, S., Todorović, B., Potočnik, I., Rekanović, E. and Stepanović, M., 2009. Effects of Copper-based Compounds, Antibiotics and a Plant Activator on Population Sizes and Spread of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in Greenhouse Tomato Seedlings. Pesticides & Phytomedicine, 24, 19-27.

Millar, R.L. and Higgins, V.J., 1970. Association of cyanide with infection of birdsfoot trefoil by *temphylium loti*. Phytopathology, 60, 104-110.

Mirik, M., 2005. Biberde bakteriyel leke etmeni *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*'nın tanılanması ve bitki büyüme düzenleyici rizobakteriler ile biyolojik mücadele olanakları. Doktora Tezi,Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilim Dalı, Adana.

Mohammadi, M. and Kazemi, H., 2002. Changes in peroxidase and polyphenoloxidase activities in susceptible and resistant Wheat heads inoculated with *fusarium graminearum* and induced resistance. Plant Science, 162, 491-498.

Mulder, E.G., 1950. Effect of Liming of an Acid Peat Soil on Microbial Activity. Transmission 4th International Congress of Soil Science, Amsterdam.

Nandhini1, S., Sendhilvel, V. and Babu, S., 2012. Endophytic bacteria from tomato and their efficacy against *Fusariumoxysporum* f.sp. *lycopersici*, the wilt pathogen. Journal of Biopesticides, 5(2), 178-185.

Nautiyal, C.S., 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. FEMS Microbiology Letters, 170, 65-270.

O'Brien, K. P., Franjevic, S. and Jones, J., 2009. Green Chemistry and Sustainable Agriculture: The Role of Biopesticides. International Congress of soil science.

Omidvari, M., 2008. Biological control of *Fusarium solani*, the causal agent of damping off, by fluorescent *pseudomonads* and studying some of their antifungal metabolite productions on it. MS Thesis (in Persian language), Tehran University, Tehran.

Orhan, E., Esitken, A., Ercisli, S., Turan,M. and Sahin, F., 2006. Effects of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield, growth and nutrient contents in organically growing raspberry. Scientia Horticulturae, 111, 38–43.

Orman, Ş., Kaplan, M., Sönmez, S. and Bozkurt, H.A., 2004. Effect of Elemental Sulphur on Microelement Nutrition of Cucumber Grown in a Calcereous Soil. International Soil Congress on Natural Resource Management for Sustainable Development, Erzurum.

Özaktan, H., 1991. Domates Bakteriyel Solgunluğu (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) İle Savaşım Olanakları ÜzerineAraştırmalar. Doktora Tezi, Ege Üniversitesi, İzmir.

Özeker, E., 2005. Salisilik Asit ve Bitkiler Üzerindeki Etkileri. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 42(1), 213-223.

Öztekin, G.B., Tüzel, Y. and Ece, M., 2015. Azot Tutucu Bakteri Kullanımının Sera Domates Yetiştiriciliğinde Bitki Gelişimi, Verim ve Meyve Kalitesi Üzerine Etkileri. Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 5 (1), 21-27.

Palazzini, J.M., Dunalp, C.A., Bowman, M.J. and Chulze, S.N., 2016. *Bacillus velezensis* RC 218 as a biocontrol agent to reduce *Fusarium* head blight and deoxynivalenol accumulation: Genome sequencing and secondary metabolite cluster profiles. Microbiological Research, 192, 30-36.

Pan, H.Q., Li, Q.L. and Hu, J.C., 2017. The complete genome sequence of *Bacillus velezensis* 9912D reveals its biocontrol mechanism as a novel commercial biological fungicide agent. Journal of Biotechnology, 247,25-28.

Park, Y.H., Suzuki, K., Yim, D.G., Lee, K.C., Yoon, J., Kim, S., Kho, Y.H., Goodfellow, M. and Komagata, K., 1993. Suprageneric classification of peptidoglycan group B actinomycetes by sequencing of 5sribosomal RNA. Antonie Leeuwenhoek, 64, 307-313.

Patil, P., Sabale, S. and Devale, A., 2015. Isolation and Characterization of Protease Producing Bacteria from Rhizosphere Soil and Optimization of Protease Production Parameters. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 2, 58-64.

Patten, C.L. and Glick, B.R., 1996. Bacterial bio-synthesis of indole-3-acedic acid. Canadian Journal of Microbiology, 42, 207-220.

Pinchuk, I.V., Bressollier, P., Sorokulova, I. B., Verneuil, B., and Urdaci, M., 2002. Amicoumacin antibiotic production and genetic diversity of *Bacillus subtilis* strains isolated from different habitats. Research in Microbiology, 153, 269-276.

Pozo, M.J., Azcon-Aguilar, C., Dumas-Gaudot, E. and Barea, J.M., 1999. B-1, 3-glucanase activities in tomato roots inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi and or *Phytophthora parasitica* and their possible involvement in bioprotection. Plant Science, 141, 149-157.

Pozo, M.J., Cordier, G., Dumas- Gaudot, E., Gianinazzi, S., Barea, J.M. and Azcon-Aguilar. G., 2002. Localized versus systemic effect of arbuscular mycorrhizal fungi on defense responses to *Phytophthora* infection in tomato plant. Journal of Experimental Botany, 53(368), 525-534.

Pozo, M.J., Dumas- Gaudot, E., Azcon-Aguilar, C. and Barea, J.M., 1998. Chitosanase and chitinase activities in tomato roots during interactions with arbuscular mycorrhizal fungi or *Phytophthora parasitica*. Journal of Experimental Botany, 49, 1729-1739.

Pozo, M.J., Dumas-Gaudot, E., Slezack, S., Cordier, C., Asselin, A., Gianinazzi, S., Gianinazzi-Pearson, V., Azcon-Aguilar, C. and Barea, J.M., 1996. Detection of new chitinase isoforms in arbuscular mycorrhizal tomato roots: possible implications in protection against *Phytophthora nicotiana* var. *parasitica*. Agronomie, 16, 689-697.

Rai, P.V. and Strobel, G.A., 1968. Phytotoxic glycopetides produce by *Corynebacterium michiganense*. II. Biological properties. Phytopathology, 59, 53-57.

Rajendran, L., Sarvanakumar, D., Raguchander, T. and Samiyappan, R., 2006. Endophytic bacterial induction of defence enzymes against bacterial blight of cotton. Phytopathologia Mediterranea, 45, 203-214.

Ramamorthy, V., Viswanathan, R.,Raguchander, T.,Prakasam, V.and Samiyappan, R., 2001. Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. Crop Protection, 20, 111.

Ramamorthy, V., Raguchander, T. and Samiyappan, R., 2002. Induction of defense-related proteins in tomato roots treated with *Pseudomonas fluorescens* Pf1 and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Plant Soil, 239, 55-68

Rodriguez H. and Fraga R., 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. Biotechnology Advances, 17 (Suppl 4-5), 319-339.

Roh, J.Y., Liu, Q., Choi, J.Y., Wang, Y., Shim, H.J., Xu, H.G., Choi, G.J., Kim, J.C. and Je, Y.H., 2009. Construction of a recombinant *Bacillus velezensis* strain as an integrated control agent against plant diseases and insect pests. Journal of Microbiology and Biotechnology, 19, 1223-1229.

Romero, A.M., Correa, O.S., Moccia, S., and Rivas, J. G. 2003. Effect of Azospirillum-mediated plant groeth promotion on the development of bacterial diseases on fresh-market and cherry tomato. Journal of Applied Microbiology, 95, 832-838.

Sahin, F., Kotan, R., Demirci, E. and Miller, S.A., 2000. Effects of Actigard and Some Antagonists in Biological Control of Bacterial Spot Disease on Tomato and Pepper. Ataturk University Journal of the Faculty of Agriculture, 31, 11–16.

Sands, D.C., 1990. Physiological criteria-determinate tests. In: Methods in Phytobacteriology. (Edts. Klement, Z.; Rhudolp, K.;Sands, D. C.) Academia Kiado, 104p, Budapest, Hungary.

Saravanan, T., Bhaskaran, R. and Muthusamy, M., 2004. *Pseudomonas fluorescens* induced enzymological changes in banana roots against *Fusarium* wilt disease. Plant Pathology Journal, 3(2), 72-80.

Saygılı, H., 2005. Fitobakteriyoloji. Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Ders Kitabı, Bornova- İzmir.

Saygili, H., Aysan, Y., Ustun, N., Mirik, M. and Sahin, F., 2008. *Pseudomonas syringae* Pathovars and Related Pathogens-Identification. Epidemiology and Genomics, 357-366.

Saygılı, H., Sahin, F. ve Aysan, Y., 2008. Bitki Bakteri Hastalıkları. Meta Basım Matbaacılık, 317s, İzmir, Türkiye.

Schuster, M.L., 1975. Leaf freckles and wilt of corn incited by *Corynebacterium nebraskense*. Research bulletin. 270p, Agricultural Experiment Station, University of Nebraska, Lincoln.

Schwyn, B. and Neilands, J.B., 1987. Universal chemical assay for the detec- tion and determination of siderophores. Analytical Biochemistry, 160, 47-56.

Scortichini, M., 1992. Conside rations on the apperance of *Pseudomonascorrugata* as a new plant pathogen. Plant Pathogenic Bacteria, 149-154.

Seniz, V., 1992. Domates, Biber ve Patlıcan Yetistiriciliği. Tarımsal Araştırmaları Destekleme ve Geliştirme Vakfı. Yayın Sayı:26, Yalova.

Senol, M., Nadaroglu, H., Dikbas, N. and Kotan, R., 2014. Purification of Chitinase enzymesfrom *Bacillus subtilis* bacteria TV-125, investigation of kinetic properties and antifungal activity against *Fusarium culmorum*. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials, 13(35), 1-7.

Sesan, E.T. and Oprea, M., 1999. Invitro action of fungucides and insecto-fungucides on the antagonistic fungi used as biokontrol agents. Bulletion of the Academy of Sciences, 47(2-4), 183-195.

Shahzad, S.M., Khalid, A., Arshad, M. and Kalil-ur-Rehman, 2010. Screening rhizobacteria containing ACC-deaminase for growth promotion of chickpea seedlings under axenic conditions. Soil & Environment, 29(1), 38- 46.

Shaker, G.A., 2014. Identification of the bacterium tomato stem canker. American Journal of Infectious Diseases, 10 (1), 44-49.

Shanmugam, P. and Narayanasamy, M., 2008. Optimization and production of salicylic acid by rhizobacterial strain *Bacillus licheniformis* MML2501. The Internet Journal of Microbiology, 6 (1), 1-8.

Shirakawa, T., Sasaki, T. and Ozaki, K., 1991. Ecology and control of tomato bacterial canker and detection methods of its pathogen. Japan Agricultural Research Quarterly, 25, 27-32.

Shridhar, S.B., 2012. Review: Nitrogen fixing microorganisms. International Journal of Microbiological Research, 3(1), 46-52.

Si, F.Y., 2014. Selection and Application of a High-resistance Strain with Its Study of Resistance Mechanism. MS Thesis, Shanghai Normal University, Shanghai (in Chinese with English abstract).

Siddiqui, Z.A., 2006. Prospective biocontrol agents of plant pathogens. In: Siddiqui, Z.A. (ed) PGPR: biocontrol and biofertilization. Springer, 318pp, The Netherlands.

Singh , G., Bharat,N. K., Bhardwaj,R. K. and Singh, S. P., 2017. Evaluation of Germplasm and Biocontrol Agents against Bacterial Canker (*Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis*) of Tomato in Himachal Pradesh. International Journal of Pure and Applied Bioscience, 5(3), 740-748.

Slinkard, K. and Singleton, V.L., 1977. Total phenol analyses: automation and comparison with manual methods. American Journal of Enology and Viticulture, 28, 49-55.

Soylu, S., Baysal, Ö. and Soylu, E.M., 2003. Induction of disease resistance by the plant activator, acibenzolar-Smethyl (ASM), against bacterial canker (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) in tomato seedlings. Plant Science, 165, 1069-1075.

Stabb, W.V., Jacobson, L.M. and Handelsman, J., 1994. Zwittermicin A – producing strains of *Bacillus cereus* from diverse soils. Applied and Environmental Microbiology, 60, 4404-12.

Stamova, L. and Sotirova, V., 1987. Reaction of different crops to artificial inoculation with *Corynebacterium michiganense*. Archiv für Phytopathologie und Pflanzenschutz, 23, 211-216.

Stork, I., Gartemann, K.-H., Burger, A. and Eichenlaub, R., 2008. A family of serine proteases of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*: *chpC* plays a role in colonization of the host plant tomato. Molecular Plant Pathology, 9, 599-608.

Stout, M.J., Fidantsef, A.L., Duffey, S.S. and Bostock, R.M., 1999. Signal interactions in pathogen and insect attack: systemic plantmediated interactions between pathogens and herbivores of the tomato, *Lycopersicon esculentum*. Physiological and Molecular Plant Pathology, 54, 115-130.

Strider, D.L., 1967. Survival studies with the tomato bacterial canker organism. Phytopathology, 57, 1067-71.

Strider, D.L., 1969. Bacterial canker of tomato caused by *Corynebacterium michiganense*: a literature review and bibliography. No. 193: North Carolina Agricultural Experiment StationTechnical bulletin.

Sung, N., Keun, K. and Sung, H.C., 1993. Isolation of soil bacteria secreting raw-starch-digesting enzyme and the enzyme production. Journal of Microbiology and Biotechnology, 3, 99-107.

Szekeres, A., 2006. Echophysiological and molecular investigation of *Trichoderma* strains isolated from winter wheat rhizosphere. Acta Biological Sezeged, 49, 61.

Şahin, F., Uslu, H., Kotan, R. and Donmez, F., 2002. Bacterial canker, caused by *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*, on tomatoes in eastern Anatolia region of Turkey. Plant Pathology, 51, 399.

Takishita, Y., Charron,J. B.and Smith,D.L., 2018. Biocontrol Rhizobacterium*Pseudomonas* sp. 23S InducesSystemic Resistance in Tomato(*Solanum lycopersicum* L.) AgainstBacterial Canker *Clavibactermichiganensis* subsp. *michiganensis*.Frontiers in Microbiology, 9, 1-14.

Thangavelu, R., Palaniswami, A., Doraiswamy, S. and Vvelazhahan, R., 2003. The effect of *Pseudomonas fluorescens* and *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* on induction of defence enzymes and phenolics in banana. Biologia Plantarum, 46(1), 107-112.

Thyr, B.D., Samuel, M.J., and Brown, P.G., 1975. New solanaceous host records for *Corynebacterium michiganense*. Plant Disease Reporter, 59, 595-598.

Thyr, B.D., Webb, R.E., Jaworski, C.A. and Ratcliffe, T.J., 1973. Tomato bacterial canker:control by seed treatment. Plant Disease Reporter, 57, 974-977.

Tiryaki, O., Canhilal, R., Horuz, S., 2010. Tarım ilacları kullanımı ve riskleri. Erciyes Universitesi Fen Bilimleri Enstitusu Dergisi, 26(2), 154-169.

Tiwari, K. and Thakur, H.K., 2014. Diversity and molecular characterization of dominant *Bacillus amyloliquefaciens* (JNU-001) endophytic bacterial strains isolated from native Neem varieties of Sanganer region of Rajasthan. Journal of Biodiversity, Bioprospecting and Development, 1, 115.

Tokgönül, S., 1998. Ticari Domates Tohumlarında Bakteriyel SolgunlukEtmeni (*Clavibacter michiganensis* subsp.*michiganensis*)'nin Etmeninin Saptanması ve Mücadele Olanakları Üzerine Araştırmalar.Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Adana.

Tokgonul, S., Çinar, O., and Rudolph, K., 1997. The effect of soil solarization on bacterial canker of tomato in the Mediterranean Region of Turkey. Second International Conference on Soil Solarization and Integrated Managment of Soilborne Pests, Aleppo, Syria.

Tsiantos, J., 1987. Transmission of bacterium*Corynebacterium michiganense* pv. *michiganense* by seeds. Journal of Phytopathology, 119, 142-146.

TUİK, 2016, Türkiye İstatistik Kurumu. http://tuik.gov.tr.

Turan, M., Ekinci, M., Yildirim, E., Güneş, A., Karagöz, K., Kotan, R. and Dursun, A., 2014. Plant growth-promoting rhizobacteria improved growth, nutrient, and hormone content of cabbage (*Brassica oleracea*) seedlings. Türkish Journal of Agriculture and Forestry, 38, 327-333.

Tyagi, M., Kayastha, M.A. and Sinha, B., 1998. The role of phenolics and peroxidase to *Alternaria triticina* in bread wheat. Journal of Agronomy & Crop Science, 181, 29-34.

Tyagi, M., Kayastha, M.A. and Sinha, B., 2000. The role of peroxidase and polyphenol oxidase isozymes in wheat resistance to *Alternaria triticina*. Biologia Plantarum, 43, 559-562.

Uematsu, T., Fuji, H. and Ohata, K., 1977. Relationship between inoculation methods and seed infection with tomato canker bacteria. Annals of the Phytopathological Society of Japan, 43, 412- 418.

Umesha, S., 2006. Occurence of bacterial canker in tomato fields of Karnataka and effect of biological seed treatment on disease incidence. Crop Protection, 25 (4), 375-381.

Utkhede,R. and Koch, C., 2004. Biological treatments to control bacterial canker of greenhouse tomatoes. BioControl, 49, 305-313.

Van den Bulk, R.W., Löffler, H.J.M., and Dons, J.J.M., 1989. Effect of phytotoxic compounds produced by *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganensis* on resistant and susceptible tomato plants. Netherlands Journal of Plant Pathology, 95, 107-117.

Van Loon, L.C., Bakker, P. A. H. M. and Pieterse, C. M. J., 1998. Systemic Resistance induced by rhizosphere bacteria. Annual Review of Phytopathology, 36, 453-483.

Vidaver, A.K., 1967. Synthetic and complex media for rapid detectionof fluorescence of phytopathogenic *Pseudomonas*: effect of carbon source. Applied Microbiology, 15, 1523-1524.

Vural, H., Eşiyok D. ve Duman, İ., 2000, Kültür Sebzeleri (Sebze Yetiştirme), Ege Üniversitesi Basımevi, 440s, Bornova, İzmir.

Xu, X., Miller, S. A., Baysal-Gurel, F., Gartemann, K.H., Eichenlaub, R. and Rajashekara, G., 2010. Bioluminescence imaging of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* infection in tomato seeds and plants. Applied and Environmental Microbiology, 76, 3978-3988.

Yogev, A., Raviv, M., Kritzman, G., Hadar, Y., Cohen, R., Kirshner, B. and Katan, J., 2009. Suppression of bacterial canker of tomato by composts. Crop Protection, 28, 97-103.

Young, C.C., Recha, P.D., Lai, W.A. and Arun, A.B., 2006. Encapsulation of plant growth-promoting bacteria in alginate beads enriched with humic acid. Biotechnology and Bioengineering, 95, 76-83.

Zajic, J.E. and Supplisson, B., 1972. Emulsification and degradation of "Bunker C" fuel oil by microorganisms. Biotechnology and Bioengineering, 14, 331-343.

Zhang, S., Moyne, A.L., Reddy, M.S. and Kloepper, J.W., 2002. The role of salicylic acid in induced systemic resistance elicited by plant growth-promoting rhizobacteria against blue mold of tobacco. Biological Control, 25, 288-296.

ÖZGEÇMİŞ

1982 yılında Iran-Urmia'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Urmia'da tamamladı. 2001 yılında başladığı Urmia Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü'nden 2004 yılında mezun oldu. 2006 yılında Tehran Üniversitesi Bitki Koruma Anabilim Dalı'ndayüksek lisansa başladı ve 2009 yılında tamamladı. 2012 yılında Eylül ayında Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilim Dalı'nda Doktora eğitimine başladı. Evli ve bir erkek çocuk annesidir.