



T.C.

HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HATAY İLİ HAVUÇ (*Daucus carota* L.) ÜRETİM ALANLARINDA
BAKTERİYEL HASTALIK ETMENLERİNİN TESPİTİ ve *Pectobacterium
carotovorum*'un BİYOLOJİK MÜCADELE OLANAKLARININ
ARAŞTIRILMASI**

Resul VARHAN

**BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**HATAY
MART - 2024**



T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HATAY İLİ HAVUÇ (*Daucus carota* L.) ÜRETİM ALANLARINDA
BAKTERİYEL HASTALIK ETMENLERİNİN TESPİTİ ve *Pectobacterium*
carotovorum'un BİYOLOJİK MÜCADELE OLANAKLARININ
ARAŞTIRILMASI**

Resul VARHAN
ORCID:0000-0001-5536-5638

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

Danışman
Doç. Dr. Adem BOZKURT
ORCID: 0000-0002-4826-0317

HATAY
MART - 2024

T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HATAY İLİ HAVUÇ (*Daucus carota* L.) ÜRETİM ALANLARINDA
BAKTERİYEL HASTALIK ETMENLERİNİN TESPİTİ ve *Pectobacterium
carotovorum*'un BİYOLOJİK MÜCADELE OLANAKLARININ
ARAŞTIRILMASI**

Resul VARHAN

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

Doç. Dr. Adem BOZKURT danışmanlığında hazırlanan bu tez **08/03/2024** tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından **OYBİRLİĞİ** ile kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Adem BOZKURT
Başkan

Prof. Dr. Soner SOYLU
Üye

Prof. Dr. Yeşim AYSAN
Üye

Prof. Dr. İlhan ÜREMİŞ
Üye

Dr. Öğretim Üyesi Benian AKTEPE
Üye

Kod No:

Prof. Dr. Cengiz KARACA
Enstitü Müdürü

Proje No: Metin girmek için burayı tıklatın.

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

08/03/2024

TEZ BİLDİRİMİ

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



İmzası
Resul VARHAN

ÖZET

HATAY İLİ HAVUÇ (*Daucus carota* L.) ÜRETİM ALANLARINDA BAKTERİYEL HASTALIK ETMENLERİNİN TESPİTİ ve *Pectobacterium carotovorum*'un BİYOLOJİK MÜCADELE OLANAKLARININ ARAŞTIRILMASI

Bu çalışmada Hatay ili havuç (*Daucus carota* L.) üretim alanlarında bakteriyel hastalıkların tespiti ve en yaygın hastalık etmeni bakteriye karşı *in vitro* koşullarda epifit antagonist bakteriler ve bakteriyofajlarla biyolojik mücadele olanakları araştırılmıştır. Hatay ilinde en fazla havuç üretimi yapılan (%58) Kırıkhan ilçesinde, bakteriyel hastalıklarının tespiti için hasat öncesi, hasat dönemi, havuç yıkama ve paketlenme evlerinin yanı sıra Antakya sebze halinde gerçekleştirilen sörveyler sonucunda hastalık belirtisi görülen havuç yumrularında izole edilen bakteri izolatları arasında temsili olarak seçilen 6 farklı bakteri izolatı MALDI-TOF ile tanılanmıştır. MALDI-TOF tanı sonuçlarına göre 1 izolat yumuşak çürüklük ve karabacak etmeni *Pectobacterium atrosepticum* (PaH15) olarak tanılanırken, iki izolat ise bakteriyel yumuşak çürüklük etmeni *Pectobacterium carotovorum* subsp *carotovorum* (PcH16, PcK24) olarak tanılanmıştır. Ayrıca EcH4, PmH11 ve PaH27 izolatlarıda fırsatçı yumuşak çürüklük etmeni olan sırasıyla *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas marginalis* ve *Pantoea agglomerans* olarak tanılanmıştır. MALDITOF-MS ile tanısı yapılan PaH15, PcH16 ve PcK24 izolatları moleküler tanılama çalışmaları sonucunda *Pectobacterium carotovorum* subsp *carotovorum* olarak teşhis edilmiştir.

Biyolojik mücadele kapsamında sağlıklı havuç bitkilerinin yaprak, kök ve rizosfer toprağından toplam 196 epifit bakteri izole edilip saflaştırılmıştır. İkili kültür testinde etkili bulunan 39 aday antagonist bakteri izolatının MALDITOF-MS ile tanıları yapılmıştır. Çalışmada izole edilen ve tanısı yapılan aday antagonist epifit bakterilerin *in vitro* koşullarında *P.carotovorum* subsp. *carotovorum* PcH16 izolatına karşı antagonistik etkinliklerinin yanı sıra siderofor oluşturma potansiyeli, fosfor çözme potansiyeli, IAA üretme potansiyeli, proteaz enzim üretme potansiyeli, amonyak (NH₃) üretme potansiyeli, Hidrojen Siyanür (HCN) üretme potansiyellerinin belirlenmesi gibi etki mekanizmaları incelenmiştir. Epifit bakterilerin antagonistik etkilerine göre *in vitro* antibiyosis testlerinde 39 epifit bakteri patojen gelişimini farklı oranlarda engellemiştir. Antibiyosis testinde en yüksek antagonistik etki gösteren 13 izolat havuç dilimleri üzerinde yarı *in vivo* biyokontrol etkinlikleri araştırılmıştır. Test edilen izolatlar arasından 11 izolat havuç dilimleri üzerinde yumuşak çürüklük belirtilerinin çıkışını %8.33 ile %100 oranında engellerken, 2 izolat hastalık çıkışının engellemesi üzerine etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Test edilen izolatlar arasında *Bacillus cereus* HCEP-Y46, *Pseudomonas koreensis* HCEP-T31, *Bacillus megaterium* HCEP-T62 ve *Bacillus safensis* HCEP-T65 izolatları kontrol uygulamasına göre yumuşak çürüklük belirtisini %100 oranında engellemiştir. Antagonist bakteri izolatlarının yanı sıra hastalıkla bulaşık bitkilerin yetiştiği toprak ve havuç yumrularından hastalık etmenine spesifik bakteriyofajların varlığı ilk kez bu çalışmada izole edilmek suretiyle ortaya konulmuştur.

2024, 114 sayfa

Anahtar Kelimeler: Havuç, bakteriyel yumuşak çürüklük, epifit bakteri, bakteriyofaj, biyolojik mücadele

ABSTRACT

DETERMINATION of BACTERIAL DISEASE AGENTS in HATAY PROVINCE CARROT (*Daucus carota* L.) PRODUCTION AREAS and INVESTIGATION of the POSSIBILITIES of BIOLOGICAL CONTROL AGAINST of *Pectobacterium carotovorum*

In this study, the detection of bacterial diseases in carrot (*Daucus carota* L.) production areas of Hatay province and the possibilities of biological control with epiphyte antagonist bacteria and bacteriophages under *in vitro* conditions against the most common disease agent bacteria were investigated. In Kırıkhan district, where the highest carrot production (58%) in Hatay province, 6 different bacterial isolates selected as representative among the bacterial isolates isolated from carrot tubers with disease symptoms as a result of surveys carried out in Antakya vegetable market as well as pre-harvest, harvest period, carrot washing and packing houses for the detection of bacterial diseases were identified by MALDI-TOF. According to MALDI-TOF diagnostic results, one isolate was identified as *Pectobacterium atrosepticum* (PaH15), the causal agent of soft rot and blackleg, and two isolates were identified as *Pectobacterium carotovorum* subsp *carotovorum* (PcH16, PcK24), the causal agent of bacterial soft rot. In addition, EcH4, PmH11 and PaH27 isolates were identified as *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas marginalis* and *Pantoea agglomerans*, respectively. The isolates PaH15, PcH16 and PcK24 identified by MALDITOF-MS were identified as *Pectobacterium carotovorum* subsp *carotovorum* as a result of molecular identification studies.

Within the scope of biological control, a total of 196 epiphyte bacteria were isolated and purified from the leaves, roots and rhizosphere soil of healthy carrot plants. A total of 39 candidate antagonist bacteria isolates found to be effective in dual culture test were identified by MALDITOF-MS. The mechanisms of action of the candidate antagonist epiphyte bacteria isolated and identified in the study, such as siderophore formation potential, phosphorus solubilisation potential, IAA production potential, protease enzyme production potential, ammonia (NH₃) production potential, hydrogen cyanide (HCN) production potential, as well as their antagonistic activity against *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* PcH16 isolate under *in vitro* conditions were investigated. According to the antagonistic effects of epiphyte bacteria, 39 epiphyte bacteria inhibited pathogen growth at different rates in *in vitro* antibiosis tests. The 13 isolates with the highest antagonistic effect in the antibiosis test were investigated for their semi-*in vivo* biocontrol efficacy on carrot slices. Among the tested isolates, 11 isolates prevented the emergence of soft rot symptoms on carrot slices by 8.33% to 100%, while 2 isolates had no effect on the prevention of disease emergence. Among the tested isolates, *Bacillus cereus* HCEP-Y46, *Pseudomonas koreensis* HCEP-T31, *Bacillus megaterium* HCEP-T62 and *Bacillus safensis* HCEP-T65 isolates prevented soft rot symptom by 100% compared to the control treatment. In addition to the antagonist bacterial isolates, the presence of bacteriophages specific to the disease agent from the soil and carrot tubers where the infected plants were grown was revealed for the first time in this study.

2024, 114 pages

Key Words: Carrot, bacterial soft rot, epiphyte bacteria, bacteriophage, biological control

TEŞEKKÜR

Doktora tez konumun belirlenmesi, yürütülmesi, laboratuvar çalışmaları ve yazımı sırasında sahip olduğu bilgilerini ve tecrübelerini benimle paylaşan, doktora sürecim boyunca bana her konuda destek olan, çalışmamın her aşamasında yardımlarını esirgemeyen, yanında çalışmaktan mutluluk duyduğum kıymetli danışman hocam Doç. Dr. Adem BOZKURT'a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez konusunun belirlenmesi ve çalışmaların takibinde profesyonel yaklaşımları ve öngörülerini ile doktora çalışmalarımı zenginleştiren ve yardımlarını esirgemeyen Tez İzleme Komitesi üyeleri Prof. Dr. Soner SOYLU ve Prof. Dr. Yeşim AYSAN'a, doktora tez jüri üyelerinden sayın Prof. Dr. İlhan Üremiş ve Dr Öğretim Üyesi Benian AKTEPE'ye,

Tez çalışmalarım sırasında tüm bölüm olanaklarından yararlanmamı sağlayan Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi (HMKÜ) Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölüm Başkanlığı'na, maddi destek veren HMKÜ, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne (Proje No: 21D018) ve HMKÜ FBE Enstitüsü Müdürlüğü çalışanlarına teşekkürlerimi sunarım.

Doktora tez çalışmam sırasında her zaman yardım ve desteğini gördüğüm arkadaşım Dr Senem FİLİZ DOKSÖZ'e; çalışmalarım sürecinde zaman ayırıp değerli bilgilerini paylaşan ve katkıda bulunan Doç. Dr. Yusuf Ziya GÜZEY'e; bakteri izolatlarımın tanısında yardımcı olan Öğr. Gör. Dr. Aysun UYSAL, Arş. Gör. Nida ÜNLÜ ve Arş. Gör. Yusuf GÜMÜŞ'e; tez çalışmalarındaki yardımlarından dolayı başta Dr. Öğr. Üyesi Hakan ÇAPAR ve viroloji laboratuvarı hocaları ve öğrencilerine, sorvey çalışmalarında her zaman yanımda olan Zir. Müh. Doğan KARATAYLI ve uzman Biyoloji Öğretmeni Selim DOĞAN'a, Lisans, Yüksek Lisans ve Doktora eğitimim boyunca desteklerini esirgemeyen HMKÜ Eğitim Araştırma ve Uygulama Hastanesi Kalp Damar Cerrahi-Göğüs Cerrahi servisinde çalışan hemşire arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Maddi ve manevi desteklerinden güç aldığım, her zaman yanımda olup beni her konuda destekleyen eşim Mervenur VARHAN'a, kızım Lavin Arjin'e ve oğlum Mirzal'a en içten teşekkürlerimi sunuyorum.

Bu doktora tez çalışmasını, doktora sürecimde dünyaya gelen kızım Lavin Arjin'e, oğlum Mirzal'a ve 06.02.2023 depreminde hayatını kaybeden tüm çocuklara ithaf ediyorum.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	I
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER	IV
ÇİZELGELER DİZİNİ	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VII
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	X
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	14
2.1. Hastalık Etmeni <i>Pectobacterium carotovorum</i> 'un Taksonomik Sınıflandırması ..	14
2.2. <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> 'un Konukçuları	16
2.3. Türkiye ve Diğer Ülkelerde Bakteriyel Yumuşak Çürüklük Hastalığı Etmeni <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> ile İlgili Yapılan Çalışmalar.....	16
2.3.1. Türkiye'de Yapılan Çalışmalar	16
2.4. Diğer Ülkelerde Yapılan Çalışmalar	18
2.5. Bakteriyel Yumuşak Çürüklük Hastalığı Etmeni <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> ile Biyolojik Mücadele Çalışmaları	22
2.6. Bakteriyofajların Tarihçesi ve Tanılamaları.....	27
2.6.1. Dünyada Tarım Alanında Yapılan Bazı Bakteriyofaj Çalışmaları.....	27
2.6.2. Türkiye'de Bitki Bakteriyel Hastalıklarına Karşı Yapılmış Bakteriyofaj Çalışmaları	32
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	34
3.1. Materyal.....	34
3.2. Yöntem	34
3.2.1. Çalışmalarda Kullanılan Besi Yerleri ve İçerikleri	34
3.2.2. Sörvey Çalışmaları, Hastalık Etmeninin Tespiti ve Tanı Çalışmaları.....	34
3.2.3. Patojen Bakterilerin İzolasyonu ve Saflaştırılması.....	36
3.2.4. Bakteri İzolatlarının MALDI-TOF MS Yöntemiyle Tanısı	36
3.2.5. Patates Dilimleri ile Pektolitik Aktivite Testi	38
3.2.6. Havuç Dilimleri üzerinde Patojenisite Testi.....	38
3.2.7. Tütünde Aşırı Duyarlılık Testi (HR)	39
3.2.8. Potasyum Hidroksit Testi (KOH) ile Gram Reaksiyonun Belirlenmesi.....	39
3.2.9. Bakteriyel Hastalık Etmenlerin Moleküler Tanısı.....	40
3.2.10. DNA Dizileme ve Filogenetik Analizler.....	41
3.2.11. Antagonist Epifit Bakterilerin İzolasyonu.....	42
3.2.12. Aday Antagonist Epifit Bakteriler ile Tütünde Aşırı Duyarlılık Testi (HR).....	43
3.2.13. Aday Epifit Bakterilerin Havuç Dilimleri ile Yumuşak Çürüklük Testi	43
3.2.14. Aday Antagonist Bakteri İzolatlarının Potasyum Hidroksit Testi (KOH) ile Gram Reaksiyonun Belirlenmesi	43
3.2.15. Aday Antagonist Epifit Bakterilerin <i>In vitro</i> Biyokontrol Etkinin Belirlenmesine Yönelik Çalışmalar	44
3.3. <i>In vivo</i> Biyokontrol Etkinin Belirlenmesi.....	49
3.3.1. Havuç Dilimi Testleri ile Aday Antagonist Bakteri İzolatlarının Biyokontrol Etkinliğinin Belirlenmesi	49
3.4. Bakteriyofaj	51
3.4.1. Bakteriyofajların (Faj) İzolasyonu.....	51
3.4.2. Bakteriyofajların Saflaştırılması.....	55

3.5. Deneme Deseni ve İstatistik Analizler	57
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA	58
4.1. Sörvey Çalışmaları	58
4.2. Patojen Bakteri İzolasyonu.....	59
4.3. Patojen Bakteri İzolatlarının Tanısı.....	60
4.3.1. Bakteri izolatlarının MALDI-TOF MS Yöntemiyle Tanısı	60
4.3.2. Patates Dilimleri ile Yumuşak Çürüklük Testi.....	61
4.3.3. Havuç Dilimleri Üzerinde Patojenisite Testi.....	62
4.3.4. Tütünde Aşırı Duyarlılık Testi (HR)	64
4.3.5. Potasyum Hidroksit Testi (KOH) ile Gram Reaksiyonun Belirlenmesi.....	64
4.3.6. Patojen Bakterilerin Moleküler Tanısı	65
4.3.7. Filogenetik Analizler	66
4.4. Epifit Bakterilerin İzolasyonu ve Tanısı.....	67
4.5. Aday Epifit Bakteriler ile Tütünde Aşırı Duyarlılık Testi (HR)	68
4.6. Aday Epifit Bakterilerin Havuç Dilimleri ile Yumuşak Çürüklük Testi.....	68
4.7. Aday Antagonist Bakteri İzolatlarının Potasyum Hidroksit Testi (KOH) ile Gram Reaksiyonun Belirlenmesi	69
4.8. Aday Epifit Bakterilerin <i>In vitro</i> Biyokontrol Etkinin Belirlenmesine Yönelik Çalışmalar	70
4.8.1. Antagonistik Etkinin Belirlenmesi	70
4.8.2. Epifit Bakteri İzolatlarının Indol Asetik Asit (IAA) Üretme Potansiyelinin Belirlenmesi	74
4.8.3. Epifit Bakteri İzolatlarının Siderofor Üretimlerinin Belirlenmesi	76
4.8.4. Epifit Bakteri İzolatlarının Fosfor Çözme Potansiyellerinin Belirlenmesi	79
4.8.5. Epifit Bakteri İzolatlarının Proteaz Enzimi Üretme Potansiyellerinin Belirlenmesi	81
4.8.6. Epifit Bakteri İzolatlarının Amonyak (NH ₃) Üretme Potansiyellerinin Belirlenmesi	82
4.8.7. Aday Antagonist Bakteri İzolatlarının Hidrojen Siyanür (HCN) Üretme Potansiyellerinin Belirlenmesi	84
4.9. Antagonist Bakteri İzolatlarının <i>in vivo</i> Biyokontrol Etkinliklerinin Belirlenmesi	88
4.9.1. Havuç Dilimi Testleri ile Aday Bakteri İzolatlarının Biyokontrol Etkinliğinin Belirlenmesi	88
4.10. Bakteriyofaj (Faj) İzolasyonu	89
4.10.1. Bitkiden Bakteriyofaj İzolasyonu.....	89
4.10.2. Topraktan Bakteriyofaj İzolasyonu	91
4.11. Bakteriyofajların Saflaştırılması	93
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	95
KAYNAKLAR	99
ÖZGEÇMİŞ	112
EKLER.....	113

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Havuç üretiminde en çok üretim yapılan ilk on ülke	2
Çizelge 1.2. 2022 yılında en çok havuç üretimi yapılan ilk 10 il.....	4
Çizelge 1.3. Hatay iline bağlı ilçelerde 2022 yılında gerçekleşen havuç üretimi	5
Çizelge 1.4. Piyasadaki mevcut ticari faj preparatları ve uygulama alanları	12
Çizelge 4.1. Kırıkhan ilçesinde bulunan havuç tarlalarında bakteriyel hastalıkların yaygınlık ve yoğunluk durumu	58
Çizelge 4.2. MALDI-TOF ile tanısı yapılan patojen izolatları ve benzerlik indeks değerleri.....	61
Çizelge 4.3. Antibiyosis testinde etkili bulunan epifit bakterilerin genel özellikleri ve tanı sonuçları	71
Çizelge 4.4. Aday epifit bakteri izolatların patojen bakteriye karşı <i>in vitro</i> antagonistik	73
Çizelge 4.5. Epifit bakteri izolatlarının IAA üretim miktarları (µg/ml)	75
Çizelge 4.6. Epifit bakteri türlerinin <i>in vitro</i> siderofor üretimi indeks değerleri	78
Çizelge 4.7. Epifit bakteri izolatlarının fosfor çözünürlüğüne bağlı olarak elde edilen F- indeks değerleri	80
Çizelge 4.8. Epifit bakteri izolatlarının proteaz enzim üretimine bağlı olarak elde edilen Pro-İndeks değerler	82
Çizelge 4.9. Aday Antagonist Bakteri İzolatlarının Amonyak Üretme Potansiyelleri ...	84
Çizelge 4.10. Epifit bakteri izolatlarının <i>in vitro</i> test sonuçları	86
Çizelge 4.11. Havuç dilimleri inokulasyonu yönteminde tüm uygulamalarda meydana gelen epifit bakteri izolatları uygulamalarının hastalık şiddeti üzerine etkileri ve hastalık engelleme oranları	88
Çizelge 4.12. Saflaştırılan fajların 24 ve 48 saatlik absorbands değerleri	94

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Sebzelerde yeterlilik derecesi (TÜİK, 2023)	3
Şekil 1.2. 2013-2022 yılları arasında Türkiye’deki havuç üretim alanı ve üretim miktarı	3
Şekil 1.3. İllere göre havuç üretim oranı (%).....	4
Şekil 1.4. <i>Pcc</i> 'nin havuçta meydana getirdiği belirtiler	7
Şekil 3.1. Sörvey çalışmaları. a: Hasat öncesi, b: Hasat dönemi, c: yıkama ve paketleme fabrikası.....	35
Şekil 3.2. Hastalık belirtisi gösteren havuç bitkisi örnekleri	35
Şekil 3.3. Havuç bitkisinden patojen izolasyonu	36
Şekil 3.4. NA besi yerinde gelişen bakterilerin MALDI-TOF’la tanı işlemleri	37
Şekil 3.5. Yüzey dezenfeksiyonu yapılmış patates dilimlerine bakterilerin inokulasyonu	38
Şekil 3.6. Yüzey dezenfeksiyonu yapılmış havuç dilimlerine bakterilerin inokulasyonu	39
Şekil 3.7. Sağlıklı havuç bitkilerinin kök ve yapraklarında epifit bakterilerin izolasyonu	42
Şekil 3.8. Aday antagonist bakterilerin biyokontrol etkilerinin belirlenmesi amacıyla NA ortamına nokta ekimleri ve patojen bakterinin petri kabına püskürtülmesi	44
Şekil 3.9. Aday epifit bakteri izolatlarının Salkowski çözeltisi eklenerek oda sıcaklığında inkübe edilen bakteri izolatlarında IAA üretme potansiyelinin belirlenmesi ve UV-vis spektrofotometre ile absorbans değerlerinin belirlenmesi.	45
Şekil 3.10. Aday antagonist bakterilerin siderefor üretimlerinin belirlenmesi amacıyla Blu-CAS agar ortamına nokta ekimleri ve S-indeks değerlerinin hesaplanması	46
Şekil 3.11. Aday antagonist bakterilerin fosfor çözme potansiyellerinin belirlenmesi amacıyla PVK agar ortamına nokta ekimleri ve F-indeks değerlerinin hesaplanması	47
Şekil 3.12. Aday antagonist bakterileri izolatlarının proteaz enzimi üretme potansiyellerinin belirlenmesi amacıyla SMLBA agar ortamına nokta ekimleri ve Pro-indeks değerlerinin hesaplanması.....	48
Şekil 3.13. Aday antagonist bakteri izolatlarının amonyak (NH ₃) üretme potansiyellerinin belirlenmesi amacıyla peptonlu suya ekimi ve Nessler’s çözeltisi ilave edilmesi	48
Şekil 3.14. . Aday Antagonist Bakteri İzolatlarının Hidrojen Siyanür (HCN) Üretme Potansiyellerinin Belirlenmesi	49
Şekil 3.15. Havuç dilimi testleri ile aday bakteri izolatlarının biyokontrol etkinliğinin belirlenmesi. Aday antagonist (a), Patojen (<i>Pcc</i>) (b)	50
Şekil 3.16. Havuç üretim alanında bulunan Bakteriyel Yumuşak Çürüklük belirtisi gösteren bitki ve toprak örneklerinin toplanması	51
Şekil 3.17. %70 alkol ile dezenfekte edilen havuç örneklerinin steril havanda ezilmesi	52
Şekil 3.18. Havuç bitkisi örneklerinden faj izolasyonu	52
Şekil 3.19. Faj+patojen+besi yerinin petrilerde çalkalama yöntemiyle bitki örneklerinden faj izolasyonu	53
Şekil 3.20. Farklı besiyerlerinde nokta şeklinde bitki örneklerinden faj izolasyonu	53
Şekil 3.21. Toprakta faj izolasyonu işlemleri.....	54

Şekil 3.22. Faj+patojen+besi yerinin petrilere çalkalama yöntemiyle toprak örneklerinden faj izolasyonu	55
Şekil 3.23. Farklı besiyerlerinde nokta şeklinde toprak örneklerinden faj izolasyonu ...	55
Şekil 3.24. İzole edilen fajların SM Buffer ile seyreltme yöntemiyle saflaştırılması	56
Şekil 3.25. Steril bistüri ile kesilen faj plaklarının, içinde patojen bulunan NB besisi yerindeki aktivitesi	57
Şekil 4.1. Havuç bitkilerinde bakteriyel hastalık belirtileri	59
Şekil 4.2. Patates dilimleri patojenite testinde yumuşak çürüklük meydana getiren bakteri izolatları.....	62
Şekil 4.3. Patojen izolatların patojenite testinde havuç dilimlerinde meydana getirdiği yumuşak çürüklük. H16=Pcc, K24=Pcc, H15=Pca, K(+)= Pcc, K(-)=Distile su	63
Şekil 4.4. Tütün HR testinde meydana gelen HR (+) ve HR negatif alanlar.	64
Şekil 4.5. <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> PcH16'un Potasyum Hidroksit testi (KOH) ile Gram reaksiyonun negatif olarak belirlenmesi (ok)	65
Şekil 4.6. <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> 27F, 1492R primer çifti kullanılarak yapılan moleküler tanısında agaroz jel üzerinde oluşan bantlar	66
Şekil 4.7. <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> türlerinin BLAST analiz sonuçları	67
Şekil 4.8. Neighbour-joining metodu kullanılarak farklı izolatlarının ve diğer <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> türlerinin karşılaştırılması ile oluşturulan filogenetik ağaç. dalların yanında yer alan rakamlar Bootstrap değerlerini göstermektedir	67
Şekil 4.9. Tütün aşırı duyarlılık testinde (HR) epifit bakterilerin inokule edildiği alanlarda HR (-) ve HR(+) alanlar (ok).....	68
Şekil 4.10. Havuç yumuşak çürüklük testinde yumuşak çürüklük meydana getirmeyen (a) ve getiren (b) epifit bakteri izolatları (ok)	69
Şekil 4.11. KOH testinde sünme gösteren (ok) ve Gram negatif olarak kabul edilen izolat.....	70
Şekil 4.12. Antagistik etkinin belirlenmesi testlerinde aday antagonist epifit bakteri izolatlarının patojen gelişimini engellemesi sonucu oluşan engelleme bölgeleri (ok).....	72
Şekil 4.13. L-tryptophan içeren LB besisi yeri içerisinde IAA üretimine bağlı olarak meydana gelen renk değişimleri.....	76
Şekil 4.14. Epifit bakterilerin CAS agar ortamında siderofor üretmeleri sonucu oluşan sarı-turuncu alanlar(ok) ve siderofor üretmeyen izolatlar (*)	77
Şekil 4.15. Epifit bakterilerin PVK ortamında fosfor çözünürlüğü sonucu oluşturduğu şeffaf alanlar (ok) ve fosfor çözünürlük etkisi göstermeyen izolatlar (*)	79
Şekil 4.16. Bakteri izolatlarının proteaz enzim üretimleri sonucu bakteri kolonileri etrafında oluşan engelleme bölgeleri (ok) ve etkisiz izolatlar (*).....	81
Şekil 4.17. Aday antagonist bakteri izolatları tarafından üretilen amonyak tüplerdeki peptonlu suyun rengini açık kahverenginden koyu kahverengine dönüşmesiyle belirginleşir.....	83
Şekil 4.18. Petri kabı kapağındaki filtre kağıdı renginin sarı renkten kahverengi veya kırmızıya dönüşmesi ortamda HCN üretiminin oluştuğunu göstermektedir	85

Şekil 4.19. Havuç dilimleri inokulasyonu yönteminde epifit bakteri izolatlarının uygulandığı havuç dilimlerinde kontrol uygulamasına göre yumuşak çürüklük oluşumunda meydana gelen azalmalar	89
Şekil 4.20. <i>Yöntem 1</i> sonucunda petrilere faj plağı (şeffaf bölge) meydana gelmemiştir	90
Şekil 4.21. Faj izolasyonu sonucunda oluşan erime alanları veya plakları.....	90
Şekil 4.22. İzolasyon sonucunda oluşan faj (erime alanları) plakları (ok).....	91
Şekil 4.23. Nokta şeklinde faj ekiminde farklı şekil ve büyüklükte faj (erime alanları) plakları (ok).....	92
Şekil 4.24. Seyreltme yöntemi ile saflaştırılan fajların oluşturduğu erime bölgeleri.....	93
Şekil 4.24. Kesme yöntemi ile saflaştırılan fajların cam tüplerde meydana getirdiği şeffaf görüntü	94



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

SİMGELER

°C	: Celsius (Derece)
cm	: Santimetre
da	: Dekar
dak	: Dakika
g	: Gram
ha	: Hektar
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
nm	: Nanometre
ppm	: part per million (milyon birimde bir birim)
rpm	: rotation per minute (dakikadaki dönme sayısı)
µl	: Mikrolitre
sn	: Saniye
%	: Yüzde

KISALTMALAR

ANOVA	: Analysis of Variance (Varyans Analizi)
Bç	: Bakteri Çapı
CAS	: Crom Azurol S Agar Besi yeri
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
FAO	: Food and Agriculture Organization of the United Nations
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
HCN	: Hidrojen siyanür
HR	: Hypersensitive Reaction (Aşırı Duyarlılık Tepkimesi)
IAA	: Indol 3 Asetik Asit
KB	: King B Besi yeri
KOH	: Potassium Hydroxide
LB	: Luria Bertani
MALDI-TOF	: Matriks Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight
N ₂	: Azot
NA	: Nutrient Agar Besi yeri
NaOCl	: Sodium Hypochlorite
NH ₃	: Amonyak
NGA	: Nutrient Gliserol Agar
Pcc	: <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp <i>carotovorum</i>
PFU	: Plaque Forming Unit
PGPR	: Plant Growth Promoting Rhizobacteria

pH	: Hidrojen iyon konsantrasyonu
ppm	: parts per million
pv	: Pathovar
PVK	: Pikovskaya's Agar
SM Buffer	: Salt-Magnesium Buffer
SMLBA	: Skimmed Milk Luria Bertani Agar
spp	: Türler
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu
UV	: Ultraviole



1. GİRİŞ

Havuç (*Daucus carota* L) Apiaceae (Umbellifera) familyasında yer alan, üretimi tohumla yapılan, etli sulu kökleri yenen, iki yıllık, sağlık, beslenme ve ekonomi açısından önemli bir sebze türüdür. Anavatanı Orta Asya ve Yakın Doğu olduğu düşünülen havuç, Türkiye dahil dünyanın pek çok bölgesinde bolca yetiştirilmektedir (Rubatzky ve ark., 1999; Safadi, 2008; Üremiş ve ark., 2020).

Havuçların genetik özellikleri (çeşit tercihi), iklimle ilgili faktörler ve yetiştirme yöntemleri duyuşal ve kimyasal özellikleri üzerine ciddi etkileri bulunmaktadır. İklim ve toprak açısından seçici olan havuç toprak neminin uygun, düşük sıcaklık ve az ışııkta iyi gelişme gösteren kısa gün bitkisidir. Özellikle renk oluşumu üzerine önemli bir kriter olan sıcaklık optimum 16-18 °C'dir. Havucun normal gelişimi için toprak pH'sı oldukça önemlidir. Yüksek asitliğe hassas olan havuç pH değeri 6.5-7 arasında olan topraklarda iyi gelişim göstermektedir. Uygun iklim ve toprak yapısından kaynaklı ülkemizde birçok havuç çeşidi yetiştirilmektedir. Ülkemizde Soprano, Nanko, Bolero, Presto, Tempo, Maestro, Siroco, Namur F1, Nansen F1, Nantura F1, Nevis F1, Nagadir F1, Negovia, F1, Nerac F1, Samson, Nadro, Yaya, Nievz, Asubeni F1 ve Nantes gibi çeşitler yetiştirilmektedir (Tülek ve Canpolat, 2016). Havuç besin maddelerince zengin topraklarda daha iyi gelişim göstermektedir. Dekarda alınacak maksimum verim için toprakta dengeli besin elementinin olması oldukça önemlidir. Şekil ve renk bozukluğunun önüne geçmek, verim ve kaliteyi arttırmak, doğru ve dengeli gübre kullanmak için toprak analizi yapılmadan aşırı gübreleme yapılmamalıdır. Verim ve kaliteyi arttırmak ve kök gelişiminin sağlıklı olmasını etkileyen diğer bir etmende sulamadır. Havuç yetiştirme alanlarında taban suyu yüksekliği ve sulama suyunun tuzluluk oranı bitki gelişimi üzerine önemli etkileri bulunmaktadır. Taban suyunun yüksek olması ve sulama suyunun tuzluluğu havuç boylarında kısalmaya ve havuç saplarında küçülmeye sebep olmaktadır. Ayrıca sulama suyunun tuzluluğunun artması bitki su miktarını azalmasına ve kuru madde içeriğinin artmasına sebep olmaktadır (Öztürk, 1997). Havuç için en iyi sulama yöntemi damlama sulama ve yağmurlama sulamadır.

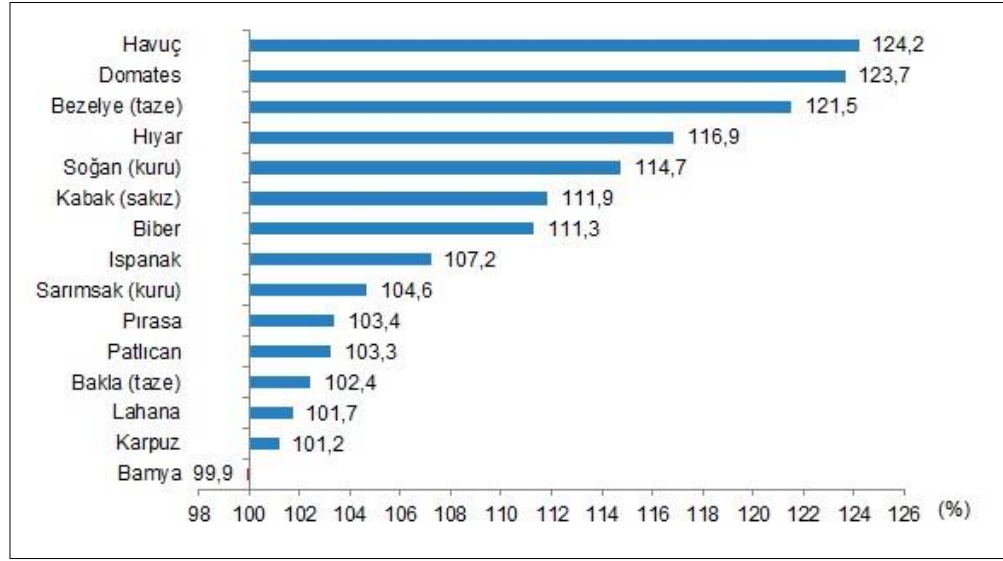
Havuç dünyanın birçok ülkesinde üretimi yapılan önemli bir sebze türüdür. Dünya Gıda ve Tarım Organizasyonu (FAO) (2022 yılı) üretim istatistiklerine göre (siyah havuç dâhil) dünyada 1.112.718 ha alanda yaklaşık 42.721.29 ton havuç üretimi

gerçekleştirilmiştir (Anonymous, 2024). Dünyada en fazla havuç üretimi 410.242 ha alanda 18.768.100 tonla Çin’de gerçekleşirken, 47.023 ha alanda 3.915.983 tonla Özbekistan ikinci sırada yer almıştır. Avrupa birliği ülkeleri arasında en fazla üretim 13.610 ha alanda 780.490 ton ile Almanya’da gerçekleştirilmiştir. Türkiye 13.657 ha alanda 790.983 ton üretimle dünya üretim sıralamasında 6. sırada yer almıştır (Çizelge 1.1). Tüm dünyada üretilen havucun %42.5’i Çin üretirken, Türkiye yüzde %1.85’lik pay ile üretimini gerçekleştirmiştir.

Çizelge 1.1. Havuç üretiminde en çok üretim yapılan ilk on ülke

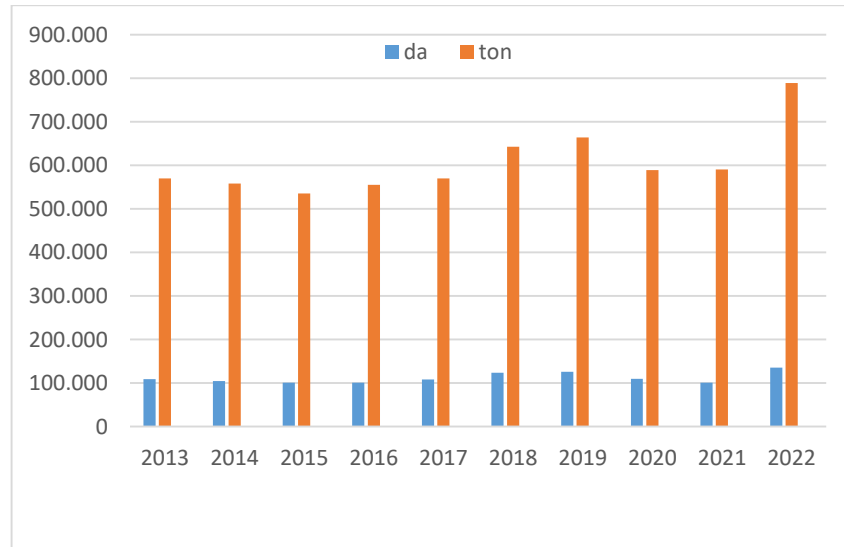
Ülkeler	Ekim Alanı (ha)	Üretim (Ton)
Çin	410.242	18.768.100
Özbekistan	47.023	3.915.983
ABD	25.576	1.381.461
Rusya Fed.	42.535	1.362.175
Büyük Britanya	14.321	887.502
Türkiye	13.657	790.983
Almanya	13.610	780.490
Ukrayna	38.200	748.930
Endonezya	39.098	737.965
Pakistan	27.165	679.652
Toplam	671.427	30.053.241

Hızla artan dünya nüfusunun dengeli beslenmesi için yeterli gıdaya özellikle yaş sebze ve meyveye ulaşmanın ne kadar önemli olduğu insan sağlığını tehdit eden pandemi koşullarında bir kez daha ortaya çıkmıştır. Türkiye, coğrafi konumundan kaynaklı sahip olduğu iklim ve ekolojik koşullar sebebiyle geniş tarımsal araziye ve ürün çeşitliliğe uygun bir ülke konumundadır. İç üretim ve iç tüketim (insan, hayvan ve endüstrinin bütün ihtiyaçlarını) dengesini ifade eden yeterlilik derecesine baktığımızda, 2021-2022 sebze ürünlerinin yeterlilik derecesi %113.5 olurken, sebzelerde en yüksek yeterlilik derecesi havuçta %124.2 olarak gerçekleşmiştir (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. Sebzelerde yeterlilik derecesi (TÜİK, 2023)

Ülkemizde son 10 yıl içerisinde havuç üretim alanı ve miktarı incelendiğinde yıllara göre değişiklik gösterdiği görülmektedir (Şekil 1.2). Sebze üretimi bir önceki yıla göre 2022 yılında %0.5 oranında azalarak yaklaşık 31.6 ton olarak gerçekleşirken, havuçta bir önceki yıla göre 2022 yılında %33.5 oranında artış göstererek 135.624 da alanda 788.578 ton havuç üretimi gerçekleştirilmiştir (Anonim, 2023). Şekil. 1.1 incelendiğinde havuçta %24.2’lik arz fazlalığı bulunmaktadır. Havuçtaki bu arz fazlalığı dünyanın çeşitli ülkelerine ihracat yapılarak üreticilere ek gelir sağlamaktadır.

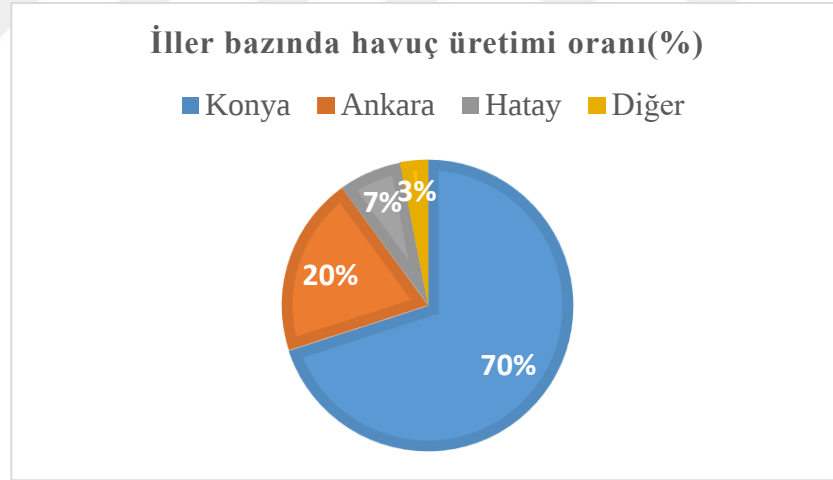


Şekil 1.2. 2013-2022 yılları arasında Türkiye’deki havuç üretim alanı ve üretim miktarı

Hatay için önemli bir gelir kaynağı olan havuç, TÜİK (2023) verilerine göre, iller bazında bakıldığında 14.202 da alan ve 55.136 (%7) ton üretimle Konya (%70) ve Ankara'dan (%20) sonra üçüncü sırada yer almaktadır (Çizelge 1.2; Şekil 1.3).

Çizelge 1.2. 2022 yılında en çok havuç üretimi yapılan ilk 10 il

İller	Ekim Alanı (Dekar)	Üretim (Ton)
Konya	84.966	552.128
Ankara	28.309	156.025
Hatay	14.202	55.136
Denizli	1.240	6.080
Eskişehir	1.292	5.492
Antalya	965	2.879
Karaman	755	2.231
Diyarbakır	200	1.100
İzmir	508	1.017
Adana	400	1000
Toplam	132.837	782.188



Şekil 1.3. İllere göre havuç üretim oranı (%)

Hatay ili ilçeler bazında baktığımızda da 8.030 da alan ve 32.120 ton (%58) üretimle Kırıkhan ilçesi ilk sırada yer almaktadır (Çizelge 1.3) (Anonim, 2023).

Çizelge 1.3. Hatay iline bağlı ilçelerde 2022 yılında gerçekleşen havuç üretimi

İlçe	Ekim Alanı (Dekar)	Üretim (Ton)
Kırıkhan	8.030	32.120
Reyhanlı	4.500	18.000
Kumlu	1.092	3.276
Antakya	550	1.650
Belen	30	90
Toplam	14.202	55.136

Havuç beslenmenin yanı sıra içerdiği birçok vitamin, mineral ve karotenden dolayı insan sağlığı açısından önemli bir yer tutmaktadır. Özellikle görme, hücre bölünmesi ve farklılaşmada önemli bir role sahip olan A vitamini 100 g havuçta 624 mg, insanın normal üreme ve gelişmesi için gerekli olan B vitaminler 100 g'da sırasıyla B1 0.036 mg, B2 0.026 mg, B3 0.98 mg, B6 0.09 mg bulunmaktadır. Serbest radikalleri temizlemek ve oksidatif stresi önlemede rol oynayan (Lui, 2013) C vitamini 100 g havuçta 5.2 mg, kanın pıhtılaşması için gerekli olan K vitamini 100 g da 3.6 mg bulunmaktadır (Kasım ve Kasım, 2019). Vitaminlerin yanı sıra kemik ve dişlerin oluşumunda, kas ve sinir sisteminin düzenli çalışmasında, vücutta önemli metabolik görevleri yerine getiren enzimlerin yapısında ve hormonlarda yer alan mineral maddeler 100 g havuçta sırasıyla Fe 0.13 mg, P 26 mg, Ca 34 mg, Mg 20mg, K 279mg, Na 52 mg ve Zn 0.15 mg bulunmaktadır (Kasım ve Kasım, 2019).

Provitamin A ve antioksidan özelliğinin yanı sıra (Francis, 1985; Tee, 1992; Ötleş ve Atlı, 1997) astım, kanser ve kardiyovasküler hastalıklar gibi kronik hastalıkları önlediği rapor edilen (Bacanlı ve ark., 2017; Kasım ve Kasım, 2019) karotenoidler, 100 g havuçta 7.493 mg β karoten ve 277 mg Lutein bulunmaktadır (Kasım ve Kasım, 2019).

Havucun verim ve kalitesini etkileyen birçok abiyotik ve biyotik etken bulunmaktadır. Biyotik etkenlerden en çok rastlanan *Cyperus rotundus* (Topalak), *Portulaca oleracea* (Semiz otu), *Amaranthus retroflexus* (Tilkikuyruğu), *Sorghum halepense* (Kanyaş) gibi yabancı otlar (Üremiş ve ark., 2020), *Alternaria* Yaprak Yanıklığı (*Alternaria dauci* Kuhn), *Cercospora* Yaprak Yanıklığı (*Cercospora carotea* Pass) ve Külleme (*Erysiphe heraclei* D.C.) gibi yeşil aksam etmenlerinin yanı sıra

Phythium spp., *Rhizoctonia* spp., *Fusarium* spp., *Alternaria* spp., *Sclerotinia* spp. gibi fungal hastalık etmenleri olarak belirlenmiştir (Davis ve Raid, 2002; Tülek ve Canpolat 2016; Soylu ve ark., 2022). Ayrıca *Carrot cryptic virus* (CaCV), *Carrot temperate virus* 1 (CteV1), *Carrot temperate virus* 2 (CteV2), *Carrot temperate virus* 3 (CteV3), *Carrot temperate virus* 4 (CteV4), *Carrot latent virus* (CtLV), *Carrot necrotic dieback virus* (CNDV-Anthriscus), *Carrot latent virus* (CtLV), *Carrot necrotic dieback virus* (CNDV-Anthriscus) bildirilen (Çabuk, 2014) virüs hastalıkları yanı sıra, havuç bitkisinde sarı-pembe renk değişimi yanı sıra bitkide bodurluk, köklerde kısılma, sekonder kılcal kök oluşumu, bitkilerin çalı görünümüne sebep olan *Spiroplasma citri* (Lee ve ark., 2006) ve Hatay ili havuç üretim alanlarında ilk defa bildirilen stolbur etmeni (Sertkaya, 2014) fitoplazmalar olarak belirlenmiştir.

Havuç bitkisinin verim ve kalitesini etkileyen diğer bir biyotik etmende Bakteriyeel Yanıklık (*Xanthomonas campestris* pv. *carotae* Kendrick, Dye), Bakteriyeel Yumuşak Çürüklüğü (*Pectobacterium atrosepticum* van Hall), Bakteriyeel Gal (*Agrobacterium tumefaciens* Smith ve Townsend.), Saçak Kök (*Agrobacterium rhizogenes* Riker ve ark.), Uyuz (*Streptomyces scabies* Thaxter) gibi bakteriyeel hastalıklardır.

Bakteriyeel patojenler arasında ise özellikle Bakteriyeel Yumuşak Çürüklüğü etmeni *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Jones)' yüksek nem ve sıcaklıkta havuç üretiminde önemli zararlara neden olabilmektedir (Naligama ve ark., 2022; Soylu ve ark., 2022). *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Syn. *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*) (family, *Enterobacteriaceae*) (*Pcc*) geniş konukçu yelpazesine sahip, ekonomik açıdan önemli Gram-negatif bir fitopatojendir. Başta patates olmak üzere havuç, lahana, hıyar, patlıcan, soğan, biber, kabak ve domates gibi ekonomik açıdan önemli birçok sebze de dünya çapında ciddi ürün kayıplarına yol açmaktadır (Davidsson ve ark., 2013; Gao ve ark., 2016; Dimas ve ark., 2018; Zhang ve ark., 2020). Yumuşak çürüklük etmeni bakteriler yaralar ve doğal açıklıklar yoluyla bitkilere giriş yaparlar. *Pcc*'nin virulansı ve patojenitesi bitki dokusunu çürütmeye ve tüm bitkinin ölümüne sebep olan pektat liyalaz (*Pel*), poligalakturonazlar (*Peh*), proteazlar (*Prt*) ve selülozlar (*Cel*) gibi çeşitli bitki hücre duvarı parçalayıcı ekstraselüler enzimleri üretme ve salgılama yeteneğine bağlıdır (Barras ve ark., 1994; Toth ve ark., 2003; Agyemang ve ark., 2020). *Pcc* havuç bitkisinin tarla, hasat, taşınma ve depolama gibi tüm aşamalarında yumuşak çürüklük meydana getirmektedir.

Hastalığın belirtisi genellikle kökün yumuşak, sulu ve sümüksü bir çürümesi olarak ortaya çıkar. Etkilenen yumru dokusu yumuşak ve granüllerdir. Çürümüş dokularında sıklıkla kahverengi-siyah pigmentler gelişir (Şekil 1.4). Toprak üstü kısımlarında en yaygın görülen belirtiler yapraklarda solgunluk, sararma ve yaprakların tamamen ölmesidir (Elphinestone and john, 2010).



Şekil 1.4. *Pcc*'nin havuçta meydana getirdiği belirtiler

Hastalığın mücadelesinde genel olarak kültürel önlemler ile birlikte bakırlı preparatlar ve kimyasal ilaçlar tedavisinde kullanılmaktadır (Gracia-Garza ve ark., 2002). Kültürel önlemler olarak; temiz ve sertifikalı tohum kullanılmalı. İyi drene olmuş uygun arazi seçilmelidir. Vektör, nematod ve böceklerle mücadele edilmeli. Enfekte bitki artıkları ve hasat sonrası bitki artıkları tarladan uzaklaştırılmalıdır. Mısır ve tahıl gibi bakteriyel yumuşak çürüklük etmeni bakterilerin konukçusu olmayan bitkilerle rotasyon yapılmalıdır. Hasat, taşınma, paketlenme ve depolama sırasında bitkilerin yaralanmasından kaçınılmalıdır. Temiz, iyi havalandırılan, nemi ve sıcaklığı uygun olan depolarda depolanmalıdır. Ayrıca yumuşak çürüklük etkilerinin azaltılmasında bazı bitki ekstraktları geliştirilmiştir (Vasinauskiene ve ark., 2006).

Kullanılan kimyasalların etkisiz olması, kimyasalların insan, hayvan ve çevre sağlığı üzerine olumsuz etkileri nedeniyle artık önerilmemektedir (Jess ve ark., 2014; Etminani ve Harighi, 2018). Tam etkili bir kimyasal tedavisinin olmaması ve

antibiyotiklerin ülkemizde yasak olmasından dolayı, biyolojik mücadele alternatif bir yöntem olarak kaçınılmaz olmuştur.

Biyolojik mücadele bakteri, fungus ve virüs gibi mikroorganizmaların bitkilerin üzerinde veya içinde kolonize olarak bitkiye herhangi bir zarar vermeden, hastalıklardan kaynaklanan zararın en düşük seviyeye çekmek için değişik formülasyonda kullanılmasıdır (Filiz Doksöz ve Bozkurt, 2022). Biyolojik mücadelede en çok kullanılan mikroorganizmalar fungal ve bakteriyel mikroorganizmalardır.

Biyolojik mücadele etmeni (BME) olarak kullanılan bakteriler bitkilerde bulundukları ve kolonize oldukları yere göre epifit ve endofit olarak iki şekilde isimlendirilir (Varhan ve Bozkurt, 2021). Epifit bakteriler bitkilerin toprak üstü kısımlarında kolonize olan ve bitkilere herhangi bir zararı olmayan bakterilerdir (Hallman ve ark., 1998; Varhan ve Bozkurt, 2021). Endofitik bakterilerin farklı birçok tanımı olmakla beraber yaygın olarak; bitki dokularında kolonize olabilen ve herhangi bir semptom ve bitkide zarara neden olmayan bakteriler olarak tanımlanmaktadır (Holliday, 1989; Schulz ve Boyle, 2006). Endofitik bakteriler yaşam stratejilerine göre obligat ve fakültatif olarak iki gruba ayrılmaktadır (Hardoim ve ark., 2008). Biyolojik mücadelede kullanılan ve bitkilerin gelişimini teşvik eden bakteriler için PGPB terimi kullanılırken, biyokontrol etki gösteren bakteriler içinse BCA (Biological Control Agent) terimi kullanılır (Kloepper ve Schroth, 1981; Fürnkranz ve ark., 2019; Filiz Doksöz ve Bozkurt, 2022). Antagonist PGPB bakterilerle PGPR grubu bakteriler bitki gelişimini teşvik edici hormonların sentezlenmesi, biyolojik azot fiksasyonu, fosfat çözünürlüğünün artırılması ve siderofor üretimi vb. mekanizmalarla bitki gelişimini teşvik ederek dolaylı olarak hastalık gelişimini azalttığı gibi (Vessey, 2003; Bozkurt, 2009), antibiyosis, yer veya besin için rekabet ve sistemik dayanıklılığın uyarılması gibi mekanizmalarla ise doğrudan patojen gelişimini engelleyerek veya hastalık şiddetini önemli ölçüde azaltarak etkili olabilmektedir (Bora ve Özaktan, 1998; Bozkurt, 2009; Sülü ve ark., 2016; Varhan ve Bozkurt, 2020). Epifit BCA grubu bakteriler ise Azot fiksasyonu, Siderofor üretimi, hormon (IAA, Sitokinin, Giberilin) üretimi, fosfor çözünürlüğü gibi mekanizmalarla dolaylı olarak hastalıkları engellerken, antibiyosis, HCN üretimi, enzim (glukonaz, kitinaz, proteaz, amilaz, lipaz, pektinaz ve selüloz) üretimi, bitkilerde dayanıklılığın sistemik olarak uyarılması (ISR induced systemic

resistans) mekanizmalarıyla patojenleri doğrudan engellemektedir (Filiz Doksöz ve Bozkurt, 2022).

Biyolojik mücadelede kullanılan diğer bir mikroorganizmada bakteriyofajlardır. Bakteriyofajlar (kısaca fajlar) bakterileri enfekte eden virüslerdir. Diğer virüslerde olduğu gibi fajlarda yaşam döngülerini devam ettirebilmeleri için canlı hücreye gereksinim duyarlar. Çıplak gözle görünmeyen, yalnızca elektron mikroskopuyla görülebilen fajlar doğada sadece bakterileri enfekte edip öldürürler. DNA veya RNA'dan oluşan nükleik asit çekirdeği taşırlar. Bu genetik materyal protein bazlı bir kapsidle çevrelenmiştir. Kapsid faj genomunu korumak (DNA'yı parçalayan enzimler gibi etkenlerden) ve konukçusu olan bakteriye bağlanması (taşıdığı reseptörler vasıtasıyla) gibi nedenlerle fajın yaşam döngüsünde önemli rol oynar (Gill and Abedon, 2003). Büyüklükleri 20-200 nm olan fajlar, iki tür yaşam döngüsüne sahiptirler.

Litik (virulent) fajların yaşam döngüsü, konukçu bakterinin hücre çeperinde bulunan reseptörlere (özel alıcılar) bağlanmasıyla (adsorbsiyon) başlar. Bu reseptörler lipopolisakkarit, oligosakkarit, peptidoglikan ve protein gibi yüzey bileşenleri olabileceği gibi, bazende kapsül, pili ve flagellada faj tarafından reseptör olarak kullanılabilir. Faj bakterinin yüzeyine bağlandıktan sonra genetik materyalini bakteri hücresinin içine enjekte (penetrasyon) eder. Bakterinin metabolik mekanizmasını ele geçiren fajlar yeni faj proteinlerin yapımına ve diğer faj bileşenlerin (kapsid, kuyruk, kuyruk fibrilleri) üretmesine yönlendirir. Tüm bu komponentler birleşerek yeni faj oluştururlar (latent dönem). Litik döngü fajların konukçu bakteri hücrelerini lize ederek konukçunun hızlı bir şekilde ölümüne sebep olması ve serbest hale gelen fajların diğer konukçu bakterilere tutunmasıyla son bulur. Fajlar lizizi gerçekleştirmesi için 'lizin' enzimini kullanırlar. Bu enzim bakteri hücre duvarı bileşenlerinden olan peptidoglikan tabakasının kesimini yaparak hücre lizisinin gerçekleştirmesini sağlamaktadır (Guttman ve ark., 2005; Soykut ve Tunail, 2009).

Fajların diğer bir yaşam döngüsünde lizojenik (virulent olmayan, ılımlı, Temperate) döngüdür. Bu yaşam döngüsünde fajlar litik döngüden farklı olarak bakteri stoplazmasına genetik materyalini penetre ettikten sonra viral DNA konak hücre DNA'sına entegre olmaya başlar. Bakteri DNA'sına entegre olmuş faja 'profaj', profajın lizojenik yaşam sürdüğü bakteriyede 'lizojen bakteri' denilmektedir. Konak

hücre DNA'sı ile viral (profaj) DNA'sı aynı hızda ve aynı anda replike olurlar. Böylece bir sonraki nesle gen aktarımı meydana gelir. Viral DNA'yı taşıyan konukçu bakteri aynı karakterdeki başka bir faj ile infeksiyon olamamaktadır. Virü lent olmayan profajlar ortam koşullarının değişmesi veya değiştirilmesi (inkübasyon sıcaklığındaki değişim, UV ışığına maruz bırakılması, mitomycin C antibiyotik vasıtasıyla ve mutajenik maddeler aracılığıyla) ile virü lent faja dönüşerek lizise indüklenebilir (Yaman Aydoğan ve Hadımlı, 2016; Cemen ve ark., 2018).

Fitopatojen bakterilere karşı laboratuvar biyoanalizlerden, sera ve tarla denemelerine kadar birçok faj çalışması yapılmıştır. *Agrobacterium tumefaciens* (Stonier ve ark., 1967), *Dickeya solani* (Adriaenssens, ve ark., 2012), *Erwinia amylovora* (Boulé ve ark., 2011; Gill ve ark., 2003; Schnabel and Jones, 2001), *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Ravensdale, ve ark., 2007), *Ralstonia solanacearum* (Tanaka Negishi and Maeda, 1990; Fujiwara, ve ark., 2011), *Streptomyces scabies* (McKenna ve ark., 2001), *Xanthomonas* (Civerolo ve Kiel, 1966-67-69; Lang ve ark., 2007; Borah ve ark., 2000; McNeil, ve ark., 2001; Obradovic ve ark., 2004; Balogh ve ark., 2008), *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Çemen ve ark., 2018). Cins ve tür üzerinde yapılan çalışmalara bakıldığında bir çoğunda umut verici sonuçlar elde edildiği belirtilmiştir (Frampton ve ark., 2012). Fajların çok çeşitli kullanım alanları vardır. İnsan, hayvan ve bitki tedavisi dışında gıdalarda dekontaminasyonları azaltmak, gıdaların raf ömürlerini uzatmak, bakterilerin doğrudan tespiti ile cins ve tür düzeyinde tanılanmasında, bitki patojen bakterilerin kontrolünde ajan olarak kullanılması ve gen teknolojisinde kullanılmaktadırlar.

Fajların biyoajan olarak kullanılmasının başlıca sebepleri; doğada toprak, su, hava, insan, hayvan ve bitki olmak üzere bakterilerin bulunduğu her yerde bulunmaları, kendilerine özgü hedef bakteriyi enfekte edebilmeleri, çok hızlı bir şekilde çoğalabilmeleri, konukçu bakteri dışında herhangi bir hücreye veya doğal floraya zarar vermemeleri, bakırlı preparatlar hariç diğer kimyasallarla birlikte uygulanabilmeleri, az maliyetle kolay üretilmesi, UV gibi olumsuz çevre koşullarına maruz kalmadığı ve konsantrasyonunda (titresinde) önemli oranda azalma olmadığı sürece +4 °C'de uzun süre saklanabilmesi, tüm virüslerde olduğu gibi fajlarda sürekli mutasyon geçirdikleri için bakterilerin faja karşı kolay dirençli hale gelmemesi ve standart tarım

ekipmanlarıyla uygulama işlemlerinin yapılabilmesi fajların kullanım nedenlerini oluşturmaktadır.

Fajların avantajlarının yanı sıra faj uygulamasında birçok zorlukta bulunmaktadır. Faj uygulamasında fajın yok olmaması için hedef bakteriye bir an önce temasa geçmesi gerekir. Bunun içinde faj konsantrasyonu, virion bozunma oranları, faj replikasyon yeteneği, ortamdaki hedef bakterinin konumu ve konsantrasyonu ve faj diffüzyonu için yeterli suyun bulunması gerekir (Gill ve Abedon, 2003). Fajlar çevresel şartlardan hızlı bir şekilde etkilenirler. Yüksek sıcaklığa maruz kalma, yüksek ve düşük pH ve yağmurla yıkanmada faj popülasyonunu azaltabilir. Özellikle 240-400 nm spektruma sahip UV-A ve UV-B güneş ışığının fajlar üzerine en yıkıcı çevresel faktör olduğu bildirilmiştir (Ignoffo and Garcia, 1994; Jones ve ark., 2007).

Fajların uygulamada etkinliğini artırmak, çevresel faktörlerden etkilenmemesi veya en az etkilenmesi için çeşitli yaklaşımlar araştırılmıştır. Hedef ortamda faj yayılımını sağlamak için taşıyıcı bakteriler kullanmak, fajın kalıcılığını sağlamak için mısır unu, süt tozu, süt tozu+şeker gibi koruyucu formülasyonlar uygulamak ve güneş ışığında etkilenmemesi için faj uygulamasını sabah erken veya akşam geç saatlerde uygulanmalıdır (Jones ve ark., 2007). Bakteriler antibiyotiklere karşı olduğu gibi fajlara karşıda dirençli hale gelebilmektedirler. Bunu önlemek için tek bir faj yerine bir kaç fajdan oluşan faj kokteyli (karışımı) önerilmektedir (Enderson ve ark., 2014; Küçükdoğan ve ark., 2021).

Doğal antibakteriyel ajan olarak kullanılan fajlar, dünyada birçok şirket tarafında faj bazlı preparat olarak üretilmektedir. Tarım-gıda sektöründe İyi Üretim Uygulamaları'na uygun üretilen faj preparatları Avrupa'da 'Gıda Güvenliği Otoritesi'(EFSA), ABD'de 'Gıda ve İlaç Kurumu' (FDA) tarafından onaylanmaktadır. Tarımda kullanılmak üzere ABD'de 2005'te onaylanan ilk faj bazlı ürün OmniLytic Inc (önceki adı 1989'da kurulmuş AgriPhi Inc'dir) tarafından üretilen "Agriphage"tır. Bu ticari preparat Florida eyaletinde tarla ve seralardaki domates bitkilerinde *Pseudomonas syringae pv tomato* 'nın neden olduğu bakteriyel benek ve *Xanthomonas campestris pv. vesicatoria* 'nın neden olduğu bakteriyel leke hastalıklarına karşı entegre mücadele kapsamında litrede 4.1×10^{12} PFU olarak kullanılmaktadır (Jones ve ark., 2007). Daha

sonra farklı bitkilere karşı faj bazlı preparat üretilmeye devam edilmiştir. Piyasada mevcut olan faj preparatları Çizelge 1.4'te gösterilmiştir (Küçükduman ve ark., 2021).

Çizelge 1.4. Piyasadaki mevcut ticari faj preparatları ve uygulama alanları

Şirket	Faj	Hedef Bakteri	Uygulama Alanı
	AgriPhage	<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> <i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	Domates, Biber
OmniLytics ABD	AgriPhage- Fire Blight	<i>Erwinia amylovora</i>	Elma, Armut
	AgriPhage- CMM	<i>Clavibacter michiganensis</i>	Domates
	AgriPhage- Citrus Canker	<i>Xanthomonas citri</i>	Turunçgiller
APS Biocontrol	Biolyse-PB	Yumuşak bakterileri	çürüklük Patates

Tarımda faj ilk kez Thomas (1934) adlı araştırmacı mısır solgunluk etmeni olan *Pantoea stewartii*'nin biyolojik mücadelesinde kullanılmıştır (Aysan ve Çemen 2016). Türkiye'de bitki bakteri hastalıklarında faj çalışmaları dünyadaki faj çalışmalarına göre çok sonradan gerçekleşmiştir. Türkiye'de bitki bakteriyel hastalıklara karşı ilk faj çalışması Saygılı ve Erkan (1985) tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada Balıkesir, Çanakkale, İzmir, Manisa ve Muğla illerinde domates hastalıkları etmeni olan *Pseudomonas syringae* pv *tomato*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* ve *Xanthomonas caampestris* pv. *vesicatoria* ile bulaşık bitki ve toprak örneklerinden, *Pseudomonas syringae* pv *tomato*, için 9, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* için 5 ve *Xanthomonas caampestris* pv. *vesicatoria* için 11 adet bakteriyofaj elde etmişlerdir.

Hatay için önemli bir gelir kaynağı olan havucun verim ve kalitesini etkileyen birçok patojen bakteriyel hastalıklarının tespiti yapılmış (Soylu ve ark., 2022), ancak gerek bu çalışmada gerekse Türkiye'de yetişen havuçlarda sorun yumuşak çürüklük hastalıklarına karşı herhangi bir biyolojik mücadele çalışması yapılmamıştır.

Bu tez çalışması kapsamında en fazla havuç üretimi yapılan Kırıkhan ilçesine 12 tarlada, 4 havuç yıkama ve paketlenme fabrikasında ve Antakya sebze haline sörveyler gerçekleştirilmiştir. Yapılan sörveylerde en yaygın bakteriyel hastalık olarak Bakteriyel Yumuşak Çürüklük etmeni *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc) izole edilmiş, sörvey alanları temsilen seçilen izolatlarıntanılamaları Matrix Assisted Laser Desorption İonization-Time Of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) ve sekans analizleri ile moleküler olarak tanılanmıştır. Bu çalışma kapsamında hastalık etmeni ile biyolojik mücadele kapsamında hastalıklı bitkilerden ve yetiştği topraklardan Pcc'ye spesifik bakteriyofaj izole edilmiş ve saflaştırmaları gerçekleştirilmiştir. Bakteriyofajların yanı sıra hastalığın yaygın görüldüğü tarlalardaki sağlıklı havuç bitkilerinin yumrularından aday antagonist epifit bakteriler izole edilmiş, tür düzeyinde MALDI-TOF MS ile tanılandıktan sonra hastalık etmenine karşı *in vitro* biyokontrol etkinliklerini belirlenmesine yönelik çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmaları tamamlayıcı olarak antagonist bakteri izolatların *in vitro* antagonistik etkinlikten ve bitki gelişimini teşvik etmekden sorumlu mekanzimaları belirlenmiştir. Aday antagonist bakteri izolatları arasında *in vitro* etkinliği yüksek izolatlarla yarı *in vivo* çalışmalar ile bakterilerin hastalık çıkışının engellenmesi üzerine olan biyokontrol etkinlikleri belirlenmiştir. Antagonist bakteri izolatlarının yanı sıra hastalıkla bulaşık bitkilerin yetiştği toprak ve havuç yumrularından hastalık etmenine spesifik bakteriyofajların varlığı ilk kez bu çalışmada izole edilmek suretiyle ortaya konulmuştur.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Hastalık Etmeni *Pectobacterium carotovorum*'un Taksonomik Sınıflandırması

Bitki patojeni *Pectobacterium* cinsi yumuşak çürüklük enterobakteriler hakkında birçok çalışma yapılmış ve taksonomik sınıflandırmaları birkaç kez revize edilmiştir (Davidsson ve ark., 2013). *Pectobacterium carotovorum* (*Bacillus carotovorus* olarak) ilk olarak Jones (1901) tarafından havuç ve sebzelerde tanımlanmıştır. Uzun süre *Erwinia* cinsinin üyesi olarak yer almıştır. *Erwinia* cinsi 1917'de Gram negatif, fermentatif, spor oluşturmeyen, kamçılı bitki patojeni tüm türleri birleştirmek amacıyla bir fitobakteriyolog olan Erwin F. Smith'e ithafen *Erwinia* ismi verilmiştir (Winslow ve ark., 1920; Haube ve ark., 1998). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology'de *Erwinia* cinsine bağlı 17 tür ve 3 alt tür tanımlanmıştır. Bunlar: *E. amylovora*, *E. ananas*, *E. carotovora* subsp. *atroseptica*, *E. carotovora* subsp. *betavascularum*, *E. carotovora* subsp. *carotovora*, *E. chrysanthemi*, *E. cypripedii*, *E. herbicola*, *E. mallotivora*, *E. nigrifluens*, *E. quercina*, *E. rhapontici*, *E. rubrifaciens*, *E. salicis*, *E. stewartii*, *E. tracheiphila* and *E. uredovora* (Lelliott and Dickey, 1984; Hauben ve ark., 1998). Walde (1945) ilk kez pectolytic *Enterobacteriaceae*'lerin *Pectobacterium* cinsine dâhil edilmesi gerektiğini önermiştir. Bu öneride *P. cypripedii* ile birlikte *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum* ve *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*'un *Pectobacterium* cinsine ait olması gerektiğini belirtmiştir. Brenner (1973) farklı metabolik ürünlerin üretilmesine dayanarak *Erwinia*'larla *Pectobacterium*'un farklı iki cins olduğunu belirtmiştir.

Yirminci yüzyılın başına kadar bakterilerin gram boyama, özel kültür ortamlarına ekilmesi, bakterinin oluşturduğu veya tükettiği metabolit özelliklere bakılarak tanımlanması mümkün olabilmekteydi. Mikrobiyoloji biliminin gelişmesiyle bakteriler fizyolojik ve biyokimyasal olarak tanımlanmaya başlanmıştır. Nükleik asit karakterizasyonu, moleküler klonlama, özellikle 1980'lerin başından itibaren 16S rRNA geninin dizinlenmesi ve PCR'la çoğaltılması gibi moleküler yöntemlerin gelişmesi, bakterilerin adlandırılması ve taksonomik yerlerinin belirlenmesinde önemli katkılar sağlamıştır. Hauben ve ark. (1998) *Enterobacteriaceae* fitopatojenlerin filogenetik konumu ile ilgili çalışmasında 16S rDNA dizi analizine dayanarak *Erwinia* cinsinin türlerini üç filogenetik gruba ayırmıştır. Buna göre yumuşak çürüklüğe sebep olan

Erwinia'ların *Pectobacterium* cinsinin içine dâhil etmiştir. Böylece *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* 'yı *Erwinia* cinsinin içinden tamamen çıkararak *Pectobacterium* içine dâhil ederek *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* tür ismini almıştır.

Toth ve ark. (1999), *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *P. atrosepticum* ve *Dickeya chrysanthemi* türlerinin saptanması için basit, hızlı ve güvenli PCR tabanlı bir yöntem geliştirmişlerdir. 16S rRNA genini kodlayan SR3F ve SR1cR primer dizilimini kullanarak 65 izolat test edilmiş ve hepsinden 119 bç'lık DNA fragmanı amplifiye etmişlerdir.

Kang ve ark. (2003), *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* 'u tanımlanması için PCR'a dayalı EXPCCF ve EXPCCR primerler ile hassas bir yöntem geliştirilmiş, bu primer setler kullanılarak 29 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* izolatından ve 3 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *wasabiae* izolatından 550 bç büyüklüğünde bantlar oluşturmuşlardır.

Aysan ve ark. (2009), farklı bölgelerdeki süs bitkilerden izole etmiş oldukları *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* 'un PCR tanısında *pel* genlerine spesifik Y1(5'-TTA CCG GAC GCC GAG CTG TGG CGT-3') ve Y2 (5'-CAG GAA GAT GTC GTT ATC GCG AGT-3') primerler kullanılmış, PCR testi sonucunda *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* izolatları 434 bp uzunlukta bant oluşturmuşlardır.

Baghaee-Ravari ve ark. (2010), İran'ın kuzeyinde yumuşak çürüklük belirtisi gösteren patates yumrularında ve bazı süs bitkilerden izole edilen 40 izolatı incelemiş, fizyolojik ve biyokimyasal tahlillerin yanı sıra PCR ve RFLP analizleriyle hem patates yumrularında hem de süs bitkilerinde izole edilen bakterilerin *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* oldukları doğrulanmıştır.

Onkedi ve Molelki (2014), Kenya'da enfekteli patateslerde 48 bakteri izolatını DNA bazlı bir metod kullanarak tanımlamalarını yapmışlardır. Kullanılan *pel* genine özgü primerlere göre 48 izolatın tamamı pectolytic olduğu gösterilmiştir. Alt türe özgü olan EXPCCF/EXPCCR ve Brif/Lır primerlerin kullanıldığı çalışmada izolatların %66'sının *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* ve %34'ünün *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* olduğu tanımlanmış ve sırasıyla 550 ile 322 bp büyüklüğünde bantlar elde etmişlerdir.

2.2. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*'un Konukçuları

Pectobacterium carotovorum subsp. *carotovorum* dünya genelinde geniş konukçu dizilime sahip bir fitopatojendir. Havuç (*Daucus carota* L.), marul (*Lactuca sativa* L.), domates (*Lycopersicon lycopersicum* L.), patates (*Solanum tuberosum* L.), soğan (*Allium cepa* L.), biber (*Capsicum annuum* L.) (Charkowski, 2018; Zhao, 2014; Ma ve ark., 2007) gibi sebzelerden ve *Primula* sp., *Kalanchoe* sp., *Diffenbachia* spp., *Cactus* sp., *Anthrium* sp, *Yucca aloifolia* (Yuka çiçeği), *Ficus elastica* (Kauçuk ağacı), *Hibiscus rosasinensis* (Japon gülü), *Schefflera actinophylla* (Şemsiye çiçeği) ve *Senecio cruentus* gibi saksılı süs bitkilerinden hastalık oluşturabilmektedir (Aysan ve ark., 2009).

2.3. Türkiye ve Diğer Ülkelerde Bakteriyel Yumuşak Çürüklük Hastalığı Etmeni *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* ile İlgili Yapılan Çalışmalar

2.3.1. Türkiye’de Yapılan Çalışmalar

Türkiye’de yumuşak çürüklük bakterileri ile ilgili uzun zamandan beri çalışmalar yapılmaktadır (Bremer ve ark., 1947; Karel ve Karahan, 1962; Baykal ve Öktem, 1978; Gundoğdu ve Karaca 1981). Yapılan tüm bu çalışmalar ve ilk kayıtlar karabacak etmeni olan *Pectobacterium atrosepticum*’la ilgilidir. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* ile ilgili ilk rapor Hollanda’lı bir araştırmacı olan Turkensteen tarafından bildirilmiştir. Turkensteen (1985), tarafından 1981-1983 yılları arasında yapılan Türkiye fungal ve bakteriyel patates hastalıkları sorveyinde yumuşak çürüklük etmeni olan *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*’u tespit etmiş ve depolardaki yumuşak çürüklük etmenlerinin sebep olduğu ürün kaybının %2 olduğu belirlemiştir.

Benlioğlu (1991), Bolu, Nevşehir ve Niğde illerindeki patates üretim alanlarında *Pectobacterium* spp’nin araştırdığı doktora çalışmasında, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* ve *Pectobacterium atrosepticum*’un yaygınlık oranları sırasıyla %22.79, %43.3 ve %38.3 olarak bulunmuştur. Aynı çalışmada yapılan sorveylerde patates tohumlarındaki bulaşma oranı ise sırasıyla %3.99, %8.97 ve %5.37 olarak bulunmuştur.

Aysan ve ark. (2002), Doğu Akdeniz bölgesinde domateslerde gövde öz nekrozuna neden olan yumuşak çürüklük etmenlerinin araştırıldığı çalışmada *P.*

atrosepticum ve *Dickeya* spp'nin yanı sıra 40 izolat *Pectobacterium carotovorum* subsp. *Carotovorum* olarak tanımlanmıştır.

Cetinkaya-Yıldız ve ark. (2004), Adana ve Mersin illerin seralarında *Dieffenbachia amoena* bitkisinin gövde, yaprak ve damarlarından izole edilen bakterilerin yağ asidi ve biyokimyasal tanı sonuçlarına göre izolatların *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* olduğunu belirlemişlerdir.

Dadaşoğlu ve Kotan (2014), Artvin, Erzincan, Erzurum ve Iğdır il ve ilçelerinde bazı meyve ve sebzelerde yumuşak çürüklük oluşturan bakterilerin araştırıldığı çalışmada, izolasyonu gerçekleştirilen bakterilerin aşırı duyarlılık testi (HR), patojenite testi ve pektolitik aktivite testi pozitif olan izolatların klasik ve moleküler yöntemlerle tanıları yapılmıştır. Mikrobiyal tanı sistemi (MIS) kullanılarak tanısı yapılan 868 izolatın 15 tanesi *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* olarak tanımlanmıştır. Y1-Y2 primerlerini kullanarak spesifik PCR testine tabi tutulan 15 izolattan 4'ünün 434 bp uzunluğunda bant oluşturduğu tespit etmişlerdir.

Boyraz ve ark. (2006), Konya'da yumuşak çürüklük belirtisi gösteren lalelerin yaprak, tomurcuk, çiçek ve soğanlardaki lezyonlardan izole edilen gram negatif, çubuk şeklinde, fermentatif, patatestte yumuşak çürüklük oluşturan, NA'da 37 °C gelişebilen, King's B'de floresan olmayan bakterilerin yapılan biyokimyasal ve fizyolojik testlerine göre izolatların tamamının *Pectobacterium carotovorum* olduğunu belirlemişlerdir. Tüm izolatlar hassas bir lale çeşidi olan Gander'e inokule edildiğinde benzer semptomların aynı şekilde ortaya çıktığını belirlemişlerdir.

Öztürk (2017), Orta Karadeniz bölgesinde patatestte sorun olan *Pectobacterium* spp ve *Dickeya* spp bakteriyel etmenlerin araştırılması için yaptığı doktora çalışmasında, 2015-2016 yıllarında patates üretim alanlarına sörveyler gerçekleştirmiş, 142 patates tarlasından 242 bitki örneği toplamıştır. İzolasyonu gerçekleştirilen 90 adet pektinolitik izolatın biyokimyasal, fizyolojik, patojenisite ve PCR'a dayalı tanıları yapılmıştır. Tanısı yapılan izolatların 16S rDNA ve recA genlerine dayalı filogenetik analizleri kesinleşmiştir. Tüm bu tanı analizlerine göre 90 izolattan 38 izolat *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* olarak tanımlanmıştır.

Öztürk ve Soylu (2022), Yozgat ili lahana üretim alanlarında 2018-2019 vejetasyon döneminde yaptıkları sörvey çalışmalarında yaprak, gövde ve kök kısımlarında yumuşak çürüklük belirtisi gösteren bakteriyel etmenlerin izolasyonunu

gerçekleştirmişlerdir. CVP (Crystal Violet Pectate) besi yerinde çukur oluşturan 16 pectolitik izolat ile yapılan PCR analizlerinde, izolatların tamamı *Pectobacterium* spp. için Y₁/Y₂ primerlerini kullanarak 434 bp uzunluğunda bant oluşturulmuştur. Ayrıca *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* için spesifik EXPCCF/EXCPCCR primerleri ile 550 bp büyüklüğünde PCR ürünü oluşturmuşlardır.

Soylu ve ark. (2022), Amik Ovası havuç ekim alanlarında sorun olan fungal ve bakteriyel hastalık etmenlerinin belirlenmesi çalışmasında, yumuşak çürüklük belirtisi gösteren havuç meyvelerinden alınan örneklerden izolasyon gerçekleştirilmiştir. Saf izolatların MALDI-TOF analiz sonuçlarına göre yumuşak çürüklük hastalığı etmenleri *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* ve *Pseudomonas corrugata*'nın yanı sıra sekonder fırsatçı (opportunistic) yumuşak çürüklük hastalığı etmenleri olan *P. marginalis*, *P. fluorescens*, *P. mediterranea*, *P. veronii*, *Erwinia rhapontici*, *E. Persicina*, *Enterobacter cloacae*, *Lelliottia amnigena*, *Rahnella aquatilis* ve *Pantoea agglomerans* gibi bakteriyel hastalık etmenleri belirlenmiştir.

2.4. Diğer Ülkelerde Yapılan Çalışmalar

Bitki patoloğları geniş konukçu aralığına sahip oldukları, enterobakterilerin ekolojisini ve evrimini incelemek için önemli bir model oldukları ve ekonomik açıdan önemli kayıplara sebep olduklarından dolayı yaklaşık 120 yıldır yumuşak çürüklük bakteriler ile ilgili birçok çalışma yapmışlardır (Charkowski 2006). Perombelon ve Kelman (1980), yumuşak çürüklük *Erwinia*'ların ekolojisi ile ilgili yaptıkları çalışmada, biyokimyasal testlerle *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*'u diğer yumuşak çürüklük bakterilerden ayıran özellikleri belirlemiştir. Buna göre *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* 37°C'de gelişebilme, maltoz ve α -metil glukoasitten asit ve sakkarozdan indirgenmiş maddeleri oluşturamama yönünden *P. atrosepticum*'dan ayrılırken, 39 °C'de gelişmeyerek bu sıcaklıkta iyi gelişim gösteren *Dickeya* spp.'den farklılık gösterdiğini belirtmişlerdir.

Perombelon ve Hyman (1989), *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* ve *P. atrosepticum*'un toprakta yaşam sürelerinin araştırdıkları çalışmada, patates ekilmiş topraklarda hasat sonrasında yoğun bir şekilde kontaminasyon görüldüğü, ancak kış boyunca ve bir sonraki yaz başında kontaminasyonun azaldığı tespit etmişlerdir. Patates ekiminin üzerinden 16 ay geçmesine rağmen yapılan izolasyonda elde edilen izolatların

%91'nin *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* olduğu geri kalanında *P. atrosepticum* olduğu tespit etmişlerdir. Islak toprakta (nem oranı %21) kuru toprağa (nem oranı %10) göre yaşam süreleri daha uzunken, sıcaklık arttıkça, özellikle 25 °C'nin üzerine çıktıkça yaşam sürelerinin azaldığını belirtmişlerdir.

Choi ve ark. (1989), Kore'de enfekteli havuç köklerinden 30 bakterinin izolasyonunu gerçekleştirmiştir. Bunlardan 4'ü floresan *Pseudomonas* olmak üzere 14 izolat *Pseudomonas* spp., 16 izolatta *Erwinia* olarak tanılanmıştır. *Erwinia*'ların tamamının *E. carotovora* subsp. *carotovora* (*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*) olduğu bildirilmiştir.

Kumar ve ark. (1991), Fenollerin patateslerde *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*'a karşı rollerininin araştırıldığı çalışmada, azot dozları arttıkça hassas türler olan Kufri Jyoti ve Kufri Badshah kıyasla Kufri Sinduri ve Kufri Lalima türlerinde toplam fenol miktarı daha çok olduğu ve çürümeninde daha az olduğu tespit etmişlerdir. Yumruların kabuğunda ve özünde dokuz fenolik asit tanılanmış, bunlardan 4'ünün *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*'yi baskıladığını bildirmişlerdir.

Ishimaru ve Loper (1992), 22 farklı *P. carotovorum* suşunun incelendiği çalışmada, fitopatojen *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* W3C105 suşunun demir sınırlayıcı koşullar altında hidroksamat siderofor aerobaktini ürettiğini bildirmişlerdir.

Hadas ve ark. (2001), ticari biber tohumlarından izole edilen örneklerin yapılan biyokimyasal ve patojenik testlerin yağ asidi ve *pel* gen primerlerle PCR'a dayalı analiz sonucuna göre izolatların *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* olduğu tanılanmıştır. Ayrıca rastgele dokuz primer kullanılarak yapılan RAPD-PCR analizlerine göre izolatların *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* olduğu desteklenmiştir. Tohumlardaki *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* seviyesi ile hastalıklı fidelerin yüzdesi arasında önemli bir orantı olduğu gözlemlenmiş, tohumların yüzeyleri sodyum hipoklorit ile yüzey sterilizasyonu gerçekleştirildiğinde tohum yüzeyindeki patojenlerin ortadan kalktığını bildirmişlerdir. Bu durumun hastalıklı biber fidelerinin birincil inokulum kaynağı kontamine tohumlar olduğunu belirtmişlerdir.

Kamysz ve ark. (2005), *P. carotovorum* ve *Dickeya chrysantemi*'ye karşı üç sentetik peptit olan CAMEL, Isegaran ve Pexiganan'ın antibakteriyel aktivitelerinin test edildiği çalışmada, CAMEL 2 ile 8 mg/ml arasında değişen dozlarda farklı

Pectobacterium türlerinin gelişmesini engelleyen en etkili peptit olduğu, Iseganan ve Pexiganan'ında CAMEL kadar olmasa da *Pectobacterium* spp.'ye karşı etkili olduğu belirtmişlerdir.

Patateslerde karabacak hastalığına sebep olan Pectonolitik bakteriler *P. atrosepticum* ve *Dickeya* spp bakterileridir. de Haan ve ark., (2008), ılıman bölgelerde karabacak hastalığındaki rolü net olmayan *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* ile ilgili yaptıkları çalışmada, Avrupa'da izole edilen bir *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* izolatu vakumla patates yumrularına inokule edilmiş ve iki farklı toprak tipinde ekimi gerçekleştirilmiştir. Sonuçta *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* 'un ılıman bölgelerde patates bitkilerinde %50'ye varan oranda karabacak hastalığına neden olabileceğini bildirmişlerdir.

Nazerian ve ark. (2011), Malezya'da 2010 yılında farklı üretim alanlarındaki bamya bitkilerinde geniş sulu lezyonlar, koyu kahverengi ve nekrotik belirti gösteren baklalar tespit edilmiş, *Pectat liyalaz (pel)* geninin *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* amplifikasyonu ve G1 ve L1 primerleri kullanılarak yapılan 16S-23S rRNA amplifikasyonunda sırasıyla 434, 535 ve 570 bp büyüklüğünde bantlar oluşturmuşlardır. Yapılan tüm biyokimyasal testlerin, PCR tabanlı pel geni ve RFLP analizlerinin sonucuna göre izolatların tamamı *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* olarak tanılanmıştır.

Al Ghazzavi ve ark. (2012), Suriye'nin Tartus ilinde 2010-2011 yıllarında kış aylarında serada yetiştirilen domates (*Lycopersicon esculentum*) bitkilerin köklerinde yumuşak çürük belirtileri tespit etmiş, izolasyonu gerçekleştirilen 12 izolat *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*'ye spesifik olan Y1: 5'-TTACCGGACGCCGAGCTGTGGCGT-3' ve Y2: 5'-CAGGAAGATGTCGTTATCGCGAGT-3' primerleri kullanılarak PCR tabanlı tanıları yapmış ve izolatların tamamının *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* olduğu tanılanmıştır. Patojenite testi için sağlam domates gövdelerine steril iğne ucuyla inokulasyon gerçekleştirilmiş, inokulasyondan 3 ile 7 gün sonra tüm bitkilerde yumuşak çürüklük belirtileri ortaya çıkmış ve bazı bitkilerin tamamen öldüğünü belirtmişlerdir.

Kettani-Halabi ve ark. (2013), Biyokimyasal analizler ile spesifik PCR tabanlı testlere kıyasla daha kolay, daha basit ve daha ucuz olan *PmrA* genini kullanarak *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*'u ve diğer *Pectobacterium* spp.'yi

tanımlamışlardır. Fasta patates tarlalarında yumuşak çürüklük belirtisi gösteren bitkilerden elde edilen izolatların %95'inin *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* olduğunu belirlemişlerdir.

Amarasinghe ve ark. (2014), tarafından *P.carovotorum* inokule edilmiş havuç bitkilerinin depo koşullarında çürümeyi engelleyen tedbirler araştırılmıştır. Buna göre havuçların normal suyla yıkandığında 8 günde %98 çürürken, hiç yıkanmamış olan havuçların 8 günde %88 oranında çürümüş olduklarını belirtmişlerdir. %2 H₂O₂ ve %5 H₂O₂ ile yıkandığında hastalığın kontrol altına alındığı, %2 H₂O₂ ile yıkamanın(16 günde %13-29 ağırlık kaybı) %5 H₂O₂ ile yıkamadan (16 günde %30-40 ağırlık kaybı) daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca ihraç edilecek ürünler için transfer boyunca ürünlerin %2 H₂O₂ ile yıkanması 6-8 °C sıcaklıkta olması gerektiğini bildirmişlerdir.

Moretti ve ark. (2016), Lübnan'ın Beka Vadisi ve Akkar bölgesinde 2009 ve 2010 yıllarında birçok Pectinolytic bakteri izolasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Bu izolatların 6 tanesi tütün bitkisinde hipersensitive reaksiyon (HR) gösterirken, patates yumrularına ve patates sapına inokulasyon gerçekleştirildiğinde yumuşak çürüklüğe neden olmuşlardır. Bu izolatlara yapılan 16S-23S intergenik transkripsiyonlu ayırıcı bölgelerin analizi ve kısmı malat dehydrogenas gen dizilerini kullanılarak yapılan filogenetik analiz sonuçlarına göre DAPP-PG7552 izolatın *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* olduğu belirtmişlerdir.

El-Habbak ve Nefaat (2019), tarafından *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*'a karşı uçucu yağların etkileri araştırılmıştır. Mısır'ın iki farklı bölgesinde toplanan izolatlar *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*'a spesifik iki primer kullanılarak 10 tane *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* izolat tanımlamıştır. Tüm bu izolatlar Pcc Y46'nın 16s-rRNA genine özdeş 220-272 bp büyüklüğünde DNA bantları elde etmişlerdir. *In vitro* ortamında tanısı yapılan *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* suşlarının hastalık şiddetine karşı iki farklı uçucu yağ (nane ve karanfil yağları) + nano-cu bazlı fungusit, ile iki farklı antibiyotik ve iki farklı bakır bazlı fungusit kullanılarak karşılaştırma yapılmış, test sonucuna göre 4 gün sonra patates yumrularında hastalık şiddetinin azalmasına yönelik en etkili preparatın karanfil yağı olduğu tespit etmişlerdir.

Naligama ve Halmillawewa (2022a), Sri Lanka'nın Gampaha bölgesinde yumuşak çürüklük belirtisi gösteren havuç bitkilerinden izolasyonu gerçekleştirilen 7

izolatın pektoliz sergilediği ve patojenisite testlerinde sadece havuçta değil aynı zamanda patates, turp, pancar ve Napo lahanasında da yumuşak çürüklük yaptıklarını tespit etmişlerdir. ITS-PCR RELP sonuçlarına göre suşlar 4 gruba ayrılmış, 16S-rRNA gen dizilimi analiz sonucuna göre 4 izolat *Pectobacterium carotovorum* (C1B5, C2B6, C2B7 ve C2B8), 2 izolat *P. aroitearum* (C1B3 ve C1B4) ve 1 izolatta *P. polaris* (C3B9) olarak tanılanmıştır.

Abdelghany ve ark. (2022), bakteriyel yumuşak çürüklük etmeni *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*'u sentetik nanoparçacık olan gümüş, krom III oksit ve çinko oksiti kullanarak kontrol etmeyi amaçlamışlardır. Her üç nanoparçacıkta etken maddesi kloramfenikol olan antibiyotikten daha etkili olduğu belirlenmiş, en etkili nanoparçacığında gümüş olduğu belirlenmiştir. *In vitro* ortamında gümüş NP'ler 10.75 mm/50 ppm dozunda etkili olurken, krom III oksit NP'ler 10.28mm/100 ppm, çinko oksit 1NP'ler 0.08mm/150 ppm aralığında etkili görülmüştür. Depo ve seralarda ise Ag, Cr₂O₃ ve ZnO'nun minimum inhibasyon konsantrasyonları (MIC) sırasıyla 1800,2200 ve 2600 ppm olarak tespit edilmiştir.

2.5. Bakteriyel Yumuşak Çürükük Hastalığı Etmeni *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* ile Biyolojik Mücadele Çalışmaları

Dünya nüfusu hızla artarken, tarım arazileri sanayileşme, düzensiz kentleşme gibi sebeplerle hızla azalmaktadır. Var olan arazilerde sentetik ilaçların ve kimyasal gübrelerin aşırı kullanımından dolayı kirlenmektedir. Sürdürülebilir tarım için tüm bunlara alternatif olarak biyoloji mücadele kaçınılmaz olmaktadır. Bakteriyel yumuşak çürüklük etmeni *Pectobacterium carotovorum* subsp *carotovorum* (*Pcc*) hem hasat döneminde birçok sebze hem de hasat sonrası depo koşullarında patates, havuç gibi birçok sebze önemli kayıplara sebep olmaktadır. Kimyasal mücadelenin yeterli olmaması ve antibiyotiklerin yasak olmasından dolayı biyolojik mücadele önemli hale gelmiştir. Bu amaçla dünyanın birçok yerinde *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*'a karşı *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Pantoea*, *Serratia*, gibi bakterilerin cinslerine ait türler kullanılarak önemli biyolojik mücadele çalışmaları yapılmıştır.

Abd-Elkhair ve Haggag (2007), Streptomisin sülfat, Starner ve Micronite soreil bakterisidleri ile *Tricoderma harzianum* ve *Bacillus subtilis* iki biyoajanı kullanarak *in*

vitro ve tarla denemelerinde bakteriyel yumuşak çürüklük etmeni *Pcc*'ye karşı kullanmışlardır. *In vitro* denemesinde Starner, *B. subtilis* ve *T. harziaunum* pektolitik enzimleri (PG ve PME enzimleri) azaltırken, Starner ve Streptomycin sülfat selülotik enzimi (Cx) azalttığını, test edilen *Pcc*'ye karşı güçlü bakterisid etki gösterdiğini belirtmişlerdir. Tarla denemelerinde Streptomycin sülfat *T. harziaunum* ve *B. subtilis* *Pcc*'ye karşı güçlü aktivite gösterdiğini belirtirlerken, Staner'in Micronite soreile göre daha az etkili olduğu bildirmişlerdir.

Issazadeh ve ark. (2012), farklı bitkilerden izole edilen *Bacillus* türlerinin *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* ve *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* patojenlerine karşı biyokontrol ajanı olarak etkinliklerinin araştırmışlardır. Antibakteriyel aktivite disk yöntemi ile gerçekleştirmişlerdir. *B. thuringiensis*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. megaterium* ve *B. pumilis* her iki patojene karşı iyi aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir. Ayrıca biyo-sürfaktan bileşiklerinin üretimi ve büyümeyi takip etmek için en yüksek hemolitik ve antimikrobiyal aktivite gösterdiklerini belirtmişlerdir.

Algeblawi ve Adam (2013), *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (*Pcc*)'a karşı *Pseudomonas fluorescens* (*P.f.*), *Bacillus subtilis* (*B.s.*) ve *Bacillus thuringiensis* (*B.t.*) biyoajanlarını kullanarak biyolojik kontrolünü sağlamayı amaçlamışlardır. Bu vesileyle Libya'nın farklı bölgelerinde 6 *Pcc* izolatu enfekteli patates yumrularından izole edilmiş, bu 6 izolattan 4 izolat (*Pcc1*, *Pcc2*, *Pcc3* ve *Pcc5*) yüksek derecede patojenikken, 2 izolat (*Pcc4* ve *Pcc6*) zayıf patojenik özellik göstermiştir. Bu patojen izolatları karşı *in vitro* koşullarında *B.f.*, *B.s.* ve *B.t.* biyokontrol ajanları kullanılmış, ayrıca 1 saksı deneyide yaptıklarını belirtmişlerdir. Sonuç olarak her üç biyoajanında *Pcc*'ye karşı bir etkiye sahip olduğu, *P.f.* ve *B.s.* *Pcc1* ve *Pcc5*'e karşı en yüksek etki gösterdiği, *B.t.* *Pcc4* ve *Pcc6* 'ya karşı en düşük etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Saksı denemesinde *Pcc* izolatlarına karşı en yüksek etkiyi *P.f.* ve *B.s.* gösterdiğini bildirmişlerdir.

Doolotkeldieva ve ark. (2016), Kırgızistan'ın farklı bölgelerinde Picasso, Sante ve Nevskiy çeşitlerine ait yumrularından izole edilen *Pcc* izolatları, patates dilimlerinde patojenite testi, standart bakteriyolojik teknikler ve PCR analizleri ile tanılamışlardır. Patates dilimi patojenite testinde Picasso çeşidi en duyarlı çeşit olduğunu saptamışlardır. Seçilen 5 *Pcc* izolatından EcPo1, EcPo2 ve Eco3 yüksek derecede patojenik etki

göstermiş, Eco4 ve Eco5 izolatları ise zayıf etki göstermişlerdir. Antagonist bakteri olan *Streptomyces diastatochromogenes* suş sk-6 ve *S. graminearuss* suş sk-2 izolatları diğer antagonist organizmalara göre *in vitro* tarama testlerinde daha önemli etkiye sahip olmuştur. *Streptomyces diastatochromogenes* suş sk-6 Kırgızistan'ın en yaygın yumuşak çürükük bakteri türü olan *Pcc* EcPo2'ye karşı depolarda patateslerin kontrol denemesi için seçmişlerdir. Patates yumrularının antagonist bakteriyle muamelesinde, yumuşak çürüklük bakterilerinin ilk enfeksiyon çoğalmasını başarılı bir şekilde önlerken, depodaki patateslerde yumuşak çürüklük hastalığını azalttığını belirlemişlerdir.

Gerayeli ve ark. (2018), İran'da patatesten yumuşak çürüklük etmeni *Pcc*'ye karşı biyokontrol amacıyla 235 *Bacillus* suşu izole ettiklerini ve bunlardan 15 izolat *in vitro* koşullarında *Pcc*'yi inhibe ettiğini bildirmişlerdir. 15 izolattan 5 izolat 16S rRNA dizilimine dayanarak karakterize edilmiş biyosüpfaktan üretimi, hareketlilik, enzimatik aktiviteler, asil-homoserin laktonların üretimi ve inaktivasyon ve oksin üretme yeteneği yönünde değerlendirmişlerdir. Patates yumru deneme sonuçlarına göre *B. pumilus* IrB8 ve *B. amyloliquefaciens* IrB12 izolatları *Pcc*'yi sırasıyla %63.7 ve %47.8 oranında baskıladığı, IrB8 veya IrB12'nin tek bir uygulamasından 8 saat sonra yüksek fenilalanin, amonyak liyaz, polifenol oksidaz, peroksidaz ve toplam fenol seviyeleri elde ettiklerini belirtmişlerdir.

Azaiez ve ark. (2018), *Pc* sp II116 suşunun neden olduğu patatesten bakteriyel yumuşak çürüklüğüne karşı biyolojik mücadele için 450 bakteri izole edilmiş, antagonist etki için değerlendirmişlerdir. En güçlü antagonistlik etki gösteren Ar10 suşu biyokimyasal ve moleküler karakterizasyon analizlerine göre *Bacillus amyloliquefaciens* olarak tanımlanmışlardır. İnsan ve fitopatojen bakterilere karşı geniş spektrumlu etki gösteren Ar10 suşu 72 saat boyunca patates yumrularıyla muamele edildiğinde hastalık belirtilerinin şiddetini (nekroz derinliği/alanı ve ağırlık kaybında sırasıyla %100 ve %85.05) önemli ölçüde azalttığını saptamışlardır.

Cui ve ark. (2019), Çin lahanasında bakteriyel çürüklüğe sebep olan *Pcc*'ye karşı *Bacillus amyloliquefaciens* KC-1 antagonist adayı bakteriyi kullanarak hem *in vitro* hem de *in vivo* şartlarında biyokontrol amacıyla çalışma gerçekleştirmişlerdir. *In vitro*'da petri kabında LB agar ortamında 5 mm engelleme zonu gerçekleştirdiğini saptamışlardır. *Bacillus amyloliquefaciens* KC-1 etkinliğini daha iyi belirlemek için

organik tarım yapılan sera denemelerini gerçekleştirmişlerdir. KC-1 izolatını ekimden önce tohumlara yüzey kaplama şeklinde uygulama yapılmış, *Pcc*'nin yumuşak çürüklük boyutunun yanı sıra köklere bulaşmasını engellediğini ve *Pcc*'nin rizosferde hayatta kalmasının azaldığını belirtmişlerdir.

Viswanath ve ark. (2020), hasat sonrası depolarda önemli ürün kayıplarına sebep olan yumuşak çürüklük etmeni *Pcc*'ye karşı *in vitro* koşullarında biyokontrol amacıyla *Bacillus subtilis*, *Pseudomona fluorescens*, *B. tequilensis* ve *Bacillus spp* antagonist adayı bakterileri kullanarak çalışma gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışmada ikili kültür deneme testinde 14.3 mm engelleme zonuyla *B.subtilis* olurken, *P. fluorescens* 14 mm, *Bacillus spp* 2.16 mm engelleme zonlarıyla takip etmişlerdir. *B. tequilensis* steril suyla yapılan kontrol grubu gibi herhangi bir engelleme göstermediğini saptamışlardır. *In vitro* şartlarında en iyi sonuç veren *B. subtilis* ve *P. fluorescens* depo koşullarında patates yumrularına patojenden 12 saat önce, patojenle eş zamanlı ve patojenden 12 saat sonra inokulasyon gerçekleştirmişlerdir. Patojenden 12 saat önceki uygulamada *B. subtilis* hastalık insidansını %84 ve hastalık şiddetini %16.8 engellerken, *P. fluorescens* hastalık insidansını %88 ve hastalık şiddetini %17.6 oranında engellediğini belirtmişlerdir.

Kazemi ve ark. (2022), *Pcc*'ye karşı biyoajan olarak kullanılmak amacıyla sebze ve patatesten 12 rizosferik bakteri izole etmişlerdir. Klorofor buharı yöntemi ile antibakteriyel özellikleri değerlendirilmiş ve minimal besi yerinde quorum quenching (QQ) yetenekleri değerlendirmişlerdir. Rizosferik bakteriler arasında sebze ve patates yumruları üzerinde en iyi antibakteriyel etkiye sahip izolat A10 izolatı olurken, hem biyosensör testinde hem de sebze ve patates yumrularında kontrol grubuna göre yumuşak çürüklükleri azaltma kabiliyeti ve QQ yeteneği olan tek izolat SS5 izolatı olduğunu saptamışlardır. Bu iki izolat birbirlerine karşı olumsuz büyüme etkisi göstermediklerinden dolayı biyokontrol testinde birlikte kullanmışlardır. A10 *Pantoea* ve SS5 *Pseudomonas spp* olarak tanımladığı çalışmada yapılan denemelerde iki bakterinin kombine kullanılması patates yumrusu ve sebzelerdeki yumuşak çürüklük belirtileri azaltma kabiliyetinin tek başına uygulamasına göre daha iyi sonuç elde ettiklerini belirtmişlerdir.

Aghdam ve ark. (2023), patates yumrularından izole edilen endofitler arasındaki beş suş ile yapılan *in vitro* denemelerinde, *Pcc* (Jx029052)' ye karşı antibiyosiz etki

gösterdikleri, patates yumru testlerinde hastalık önleyici ve iyileştirici etkileri test edilerek *in vivo* denemelerinde kullanmışlardır. Endofit izolatların *Pcc*'ye antagonist olarak biyokontrol özellikleri değerlendirilen çalışmada; fenotipik özellikleri ve 16S rRNA dizilimi kullanılarak tanımlanan *Pseudomonas brassicacearum*'un EnPb suşu *in vivo* şartlarında yumuşak çürüklük gelişimini %62.2 oranında azaltırken, depolama koşullarında *Pcc*'nin semptomlarını önemli derecede azaltarak %58 oranında hastalık önleyici etki gösterirken %54.6 oranında iyileştirici etki gösterdiğini belirlemişlerdir. Hareketli floresan bir suş olan EnPb suşu antibiyosiz etkinin yanı sıra siderofor, hidrojen siyanür üretirken, amilaz, proteaz ve selüloz gibi litik enzimlerde üretir. Ayrıca 2.4-diasetilfloroglukinol (DAPG) ve pirronitrine karşılık gelen *phlD* ve *prnC* gibi antibiyotik genleri barındırdığını belirlemişlerdir.

Antagonist bakterilerle sadece *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* karşı değil farklı fitopatogen bakterilere karşıda başarılı bir şekilde kullanılarak biyolojik mücadele gerçekleştirilen birçok çalışma mevcuttur. Bu çalışmalardan birkaç tanesini incelenecek olursa;

Aysan ve ark. (2003), domates yumuşak çürüklük etmeni *Erwinia chrysantemi*'ye (*Ec*) karşı bazı antagonist bakterilerle biyolojik olarak kontrol etmek amacıyla bir çalışma yapmışlardır. Bu amaçla Türkiye'de Mersin ve Adana illerindeki domates üretim alanlarında domates rizosferinde 71 adet izolat izole edilirken, 7 izolatta İsrail'deki Bitki Koruma Departmanının'dan temin etmişlerdir. 14 izolat *Ec*'nin petrilerde gelişimini engellerken, patates yumuşak çürüklük testinde kullanılan tüm izolatlardan 16 tanesi *Ec*'nin neden olduğu yumuşak çürüklük semptomların gelişimini önlediğini belirtmişlerdir. Patates dilimlerinde patojene karşı etkili olan 16 izolattan 13 tanesi seçilerek iklim odası koşullarında domates fidelerinde yaptıkları denemede; 13 izolattan 8 izolatın %89 ile %33 arasında hastalık gelişimini azalttığını bildirmişlerdir. Fide denemelerinde etki gösteren 5 izolat sera denemelerinde kullanılmak için seçilmiş, Türkiye'de domates bakteriyel patojenlere karşı biyokontrol ajanların kullanıldığı bu ilk çalışmada seçilen 5 izolattan 1 izolat %74 oranında *Ec*'ye karşı koruma sağladığını bildirmişlerdir.

Mirik ve ark. (2008), biberde bakteriyel leke hastalığı etmeni *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*'nın biyolojik mücadelesi kapsamında, biber üretim alanları sera ve tarlalarda biberlerin rizosferlerinde alınan toprak örneklerinden 3 *Bacillus* suşu

izole etmişlerdir. Sera ve tarla denemelerinde 3 *Bacillus* suşunun tek tek veya kombine şekilde inoküle edildiği biber bitkilerinde hastalık gelişimini sırasıyla %11-%62 ve %38-%67 oranında azalttığını belirlemişlerdir.

El-Hendawy ve Abo-ElyousrKAM (2016), *in vitro* koşullarında *Pseudomonas fluorescens* (Pf2), *Bacillus subtilis* (Bs3) ve *Rahnella aquatilis* (Ra39) antagonist bakterileri patatesta karabacak etmeni *Pectobacterium atrosepticum*'un engellediğini bildirmişlerdir. Sera ve tarla koşullarında yaptıkları denemelerde üç antagonist bakteri izolatu ile tek tek veya kombinasyon halinde muamele edilen patates yumruları, muamele edilmeyen patates bitkilerine (kontrol bitkileri) göre daha az hastalık şiddeti gösterdiğini belirlerken, ayrıca tüm antagonist izolatların farklı derecede siderofor ürettiği, ancak indol asetik asit (IAA) ve hidrojen siyanür (HCN) üretmediğini bildirmişlerdir.

2.6. Bakteriyofajların Tarihçesi ve Tanılamaları

İngiliz bakteriyolog Ernest Hank'in 1896'da Hindistan'daki Ganj ve Juma nehrindeki sularda *Vibrio cholerae* yoğunluğunu azaldığını gözlemlemiş, bu azalmaya bakteri filtrelerinden geçen antibakteriyel etkiye sahip, tanımlanmamış bir maddenin sebep olabileceğini bildirmiştir (Nigam ve ark., 2014; Küçükdoğan ve ark., 2021). Fajların bağımsız olarak filtre edilebileceğini bildiren Frederick Twort (1915), fajların doğal antibakteriyel ajan olarak kullanılarak hastalıkların azaltılacağını bildirmiştir (Jones ve ark., 2007). Kanadalı mikrobiyolog Felix d'Herelle (1917), bakteriyel inhibasyonunda plak oluşumunu bakteri filtresinden geçen virüslere bağlayıp ilk kez "bakteriyofaj" terimini kullanarak dizanteri hastalığında kullanmıştır (Garcia ve ark., 2008; Lin ve ark., 2017). Helmut Rushka (1940) fajları ilk kez elektron mikroskopuyla görüntülemiştir (Ustaçelebi ve ark., 1968).

2.6.1. Dünyada Tarım Alanında Yapılan Bazı Bakteriyofaj Çalışmaları

Bakteriyofajlar d'Herelle tarafından tanımlandıktan birkaç yıl sonra bitki hastalıkları ajanları olarak kullanılmaya başlanmıştır. Mallman ve Hemstreet (1924), hastalıklı lahanada dokusundan ve çürümüş lahanadan izole ettikleri fajların *in vitro* koşullarında *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*'in büyümesini inhibe ettiklerini

bildirmişlerdir. Coon ve Kotila (1925), *Pectobacterium carovorum* subsp. *carovorum* (Pcc) ve fajları havuçlara uyguladıklarında yalnızca Pcc'nin olduğu havuçlarda çürümenin meydana geldiğini, kombine uyguladıkları havuç bitkilerinde çürümenin olmadığını, bu sonucun toprakta ve doğal ortamında fajların bakterilere karşı ajan olabileceğini bildirmişlerdir.

Thomas (1935), tarımda fajları biyolojik mücadele ajanı olarak kullanan ilk bilim insanıdır (Aysan ve Çemen, 2016). Mısır solgunluk hastalığının etmeni *Pantoea stewarti*'ye karşı kullandığı faj ajanını, hastalık etmenini %18 ile %1.4 arasında baskıladığını bildirmiştir.

Schnabel ve Jones (2001), Ateş yanıklığı etmeni *Erwinia amylovora*'yı enfekte edebilen fajları elma, armut ve ahududu bitkilerinde ateş yanıklığı belirtilerini gösteren bitki dokularından ve topraktan izole etmişlerdir. İzole ettikleri 50 fajdan 5 tanesinin tanımlarını yapmışlardır. Bunlar arasında 46 kb'lik genoma ve en yaygın izolat ϕ Ea1 fajı olmuştur. ϕ Ea100, ϕ Ea7 ve ϕ Ea125 fajlarının her biri yaklaşık 35kb'lik genoma sahipken, ϕ Ea116C yaklaşık 75kb'lik genoma sahip olduğunu bildirmişlerdir. ϕ Ea1, ϕ Ea7, ϕ Ea100, ϕ Ea125 ve ϕ Ea116C fajları Michigan'daki elma bahçelerinde izole edilen 40 *E. amylovora* suşunu sırasıyla 39, 36, 16, 20 ve 40'ını enfekte ederken, Michigan'daki ahududu (*Rubus* spp) tarlalarında izole edilen 12 *E.amylovora* izolatın sırasıyla 8, 12, 10, 10 ve 12 izolatlarını enfekte ettiğini, sıvı kültürde en etkili fajın ϕ Ea116C izolatı olduğunu belirtmişlerdir.

Balogh ve ark. (2003), domates bakteriyel hastalığı etmeni *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*'ya karşı kullanılan fajların yaprak yüzeyinde etkinliğini uzun süre kalması için tarla ve seralarda test edilen 3 farklı formülasyon geliştirmişlerdir. Bakır-Mancozeb'inde kullanıldığı çalışmada birinci formülasyon PCF (%0.5 jelatinize edilmiş mısır unu + %0.5 Sukroz), ikinci formülasyon: Cascrete (%0.5 Cascrete NH-400 + % 0.5 Sukroz) üçüncü formülasyon: Yağsız süt (%0.75 yağsız süt tozu + %0.5 Sükroz) şeklinde denemeler gerçekleştirmişlerdir. Sera denemelerinde formüle edilmeyen faj karışımı (kontrol) %1, PCF ile karıştırılan fajlar %30, Cascrete ile formüle edilen fajlar %51 ve Yağsız süt ile karıştırılan fajlar %62 oranında hastalık şiddetini azalttığını, yapılan 3 tarla denemesinde kontrol grubuna göre PCF + faj %15, Cascrete + faj %20 ve Yağsız süt + faj %9 oranında hastalığı azalttığını bildirmişlerdir. Bakır-mankozeb dâhil edilen iki tarla denemesinden birinci denemede hastalık şiddeti

%20 azaltırken, ikinci denemede hastalığın %13 arttığını saptamışlardır. PCF ile formüle edilmiş faj akşam uygulaması sabah uygulamasına göre daha etkili olduğu (sırasıyla %27 ve %23), Cascrete ile formüle edilmiş faj popülasyonları 36 saat sonra formüle edilmemiş faj popülasyonuna göre 1000 kat daha fazla olduğunu belirtmişlerdir.

Ravensdal ve ark. (2007), Gelin çiçeği (*Zantedeschia* sp.) üretilen bir serada gübre solüsyonlarından alınan örneklerden bakteriyel yumuşak çürüklük etmeni *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc)'un 14 fajını izole etmişlerdir. Fajların moleküler tanılamaları ve elektron mikroskop incelenmesinde uzun, esnek kuyrukları olan icosahedral kafalara sahip fajlar olduğunu ve Pcc fajlarının *Caudovirals* takımında yer aldığını bildirmişlerdir. Yapılan çalışmada faj izolatları gübre çözeltisinde Gelin çiçeği bitkisinin yumru yüzeyinde bakteri popülasyonlarını önemli ölçüde azalttığı, sera denemelerinde fajların yumuşak çürüme simptomlarını %50 ve daha fazla azalttığını belirtmişlerdir.

Balogh ve ark. (2008), Turunçgil Bakteriyel Kanser Hastalığı etmeni *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* ile Turunçgil Bakteriyel Leke hastalığı etmeni *Xanthomonas axonopodis* pv. *citrumelo*'ya karşı entegre mücadelesinde faj, faj +koruyucu formülasyon (süt tozu) ve faj + bakır preparatları kombinasyonunu araştırmışlardır. Beş sera denemesinde sadece faj uygulaması Turunçgil Kanser Hastalığını % 59 oranında azalttığını, tek başına faj uygulamasının koruyucu formülle kullanımından daha etkili olduğu bildirmişlerdir. Fidanlık denemelerinde fajın etkili olduğu ancak bakır-mancozeb'ten daha az etkili olduğu, faj + bakır-mancozeb kombinasyonunun bakır-mancozeb kadar veya daha az etkili olduğu bildirilmiştir. Faj tedavisi birinci denemede orta derecede hassas olan Valencia çeşidinde hastalığı %48 oranında, ikinci denemede hastalığı %35 oranında azalttığını, ancak duyarlı greyluft çeşidi üzerinde etkisiz olduğu saptamışlardır. Deneme sonucunda fidanlarda tek başına faj uygulamasının hastalığı önemli ölçüde azalttığı, ancak bakır-mancozeb ile eşit veya daha az etkili olduğu, faj+bakır-mancozeb kombinasyonunun tek başına bakır-mancozeb uygulamasına göre etkinliğini arttırmadığını bildirmişlerdir.

Lee ve ark. (2012), Bakteriyel yumuşak çürüklük emeni *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc)'a karşı biyokontrol ajanı geliştirmek amacıyla PP1 bakteriyofajının tam genom sekansını yapmışlardır. 44.400 bp'lik genom dizisine

sahip PP1 fajı, enfekte ettiği konakçılarında lizojen döngü yapmadığı için biyokontrol ajanı olarak kullanılabileceğini önermişlerdir. Bu faj *Pcc*'nin tam genom sekansının yapıldığı ilk faj olduğunu bildirmişlerdir.

Adriaenssens ve ark. (2012), patatesten çürüme ve karabacak hastalığına sebep olan *Dickeya dianthicola*'nın agresif bir biyovarı olan *D. solani*ye karşı biyokontrol amacıyla spesifik vB_Dsome_Limestone1 ve vB_Dsome_Limestone2 fajlarını izole edip tanılamalarını yapmışlardır. Limestone fajları T4 ile ilişkili bir genom yapısına sahip ve *Salmonella* faj VII benzerliğine sahip olduğu, yapılan mikrobiyolojik ve moleküler karakterizasyonunda biyolojik ajan olarak kullanılmasına uygun ve umut verici olduğunu saptamışlardır. Bu fajların laboratuvar analizlerinde patates yumrularında hastalık insidansını ve şiddetini azalttığı, *D. solani* ile enfekte edilen patates yumrularının tarla denemesinde faj tedavisinin yüksek etki ettiğini belirtmişlerdir.

Lim ve ark. (2013), *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (*Pcc*)'a karşı izole ettikleri PP1 fajını biyokontrol ajan olarak kullandıkları bir çalışmada *Pcc*'ye karşı hızlı ve güçlü litik aktivite ve yüksek spesifik gösterdiği belirtmişlerdir. Pyeongchan'ta izole edilen PP1 fajı 20-40 °C sıcaklıkta ve pH 4-11 aralığında stabil olduğu, Kore ulusal koleksiyonunda bulunan *Pcc* izolatlarının yaklaşık %37'sini lize ettiğini belirtmişlerdir. Elektron mikroskobu ile yapılan incelemede PP1 fajının icosahedral başları ve kısa kasılmayan kuyrukları olduğu ve *Podoviridae* familyasının *Caudovirales* takımında yer aldığı saptamışlardır.

Lim ve ark. (2014), *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (*Pcc*)'u enfekte eden yeni bir virülen faj olan PM1 fajının izolasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Elektron mikroskobu ile yapılan morfolojik incelenmesinde bu fajın *Myoviridae* familyasına ait olduğu, 2.665 bp'lik bir terminal tekrar olmak üzere 55.098 bp'lik genoma sahip olduğu, bir tRNA kodlama bölgesine sahip olduğu, genomun GC içeriği %44.9 olduğu ve bu fajın enterobakteri faj ϕ EcoM-gj1 ve *Erwinia* faj vB-EamM-Y2 fajlarına yüksek homolog gösterdiğini belirtmişlerdir.

Ranjani ve ark. (2018), Çeltik Bakteriyel Yanıklık Hastalığı etmeni *Xanthomonas oryzae*'ye karşı bakteriyofajların mücadele potansiyelleri üzerine yaptıkları çalışmada; hastalıklı bitki yapraklarında ve topraktan 8 faj izole edip farklı patojenik *X. oryzae* suşlarına karşı litik aktiviteleri açısından değerlendirmişlerdir. Bu fajlardan ϕ XFO4 fajı en geniş konak aralığını göstererek tüm patojenik *X. oryzae* suşlarına karşı etkili

olduğunu saptamışlardır. Elektron mikroskobu ile yapılan incelemede icosahedral başlı, kuyruklu bir faj olduğu, *Sihoviridae* familyası ve *Caudovirales* takımında yer aldığını belirtmişlerdir. 1×10^8 pfu/ml ϕ XFO4 fajı ile muamele edilen tohumlardan yetiştirilen fidelerde Bakteriyel Yanıklık Hastalığı insidansında azalma olduğu ve bakterilerin gelişmesini tamamen engellediğini bildirmişlerdir. Tüm bu bulgular ϕ XFO4 fajının Çeltikte Bakteriyel Yanıklık Hastalığına karşı biyolojik mücadele ajanı potansiyelini gösterdiğini bildirmişlerdir.

Muturi ve ark. (2019), patates bakteriyel yumuşak çürüklük etmeni *Pectobacterium carotovorum* (Pc) a karşı mücadelede litik fajların izolasyonu ve uygulama yöntemlerinin etkinliğini araştırdıkları çalışmada; Kenya'nın Nakuri kentinde yumuşak çürüklük belirtisi gösteren patateslerde Pc izolasyonu gerçekleştirilirken, bu izolatları enfekte etmek için Çin'in Wuhan kentinde 11 faj izole etmişlerdir. Fajlar patates dilimlerinde veya yumrularında Pc inokulasyonundan önce veya sonra farklı zaman aralıklarında tek tek veya kokteyl şeklinde uygulama yapmışlardır. Fajlar 20 Pc suşunu lize ederken, *Pseudomonas fluorescens* suşlarına karşı herhangi bir aktivite göstermemişlerdir. 11 fajdan Wc5r fajı *P. atrosepticum* 'a karşı çapraz etki gösterirken, *P. carotovorum* 2 faja dirençli olduğu belirtilmiştir. Patates dilimi deneylerinde Pc kontrolü için faj konsantrasyonunun ve uygulama zamanının önemli faktörler olduğu belirtmişlerdir. Patates dilimlerinde bakteri inokulasyonundan bir saat önce veya bir saat içinde mililitrede plak oluşturan birim başına 1×10^9 faj kokteyli uygulandığında yumuşak çürüklük simptomlarının %90 azalttığını bildirmişlerdir. Patates yumrularında bakteri inokulasyonundan önce uygulanan faj kokteyli hastalık kontrolünde ve simptomların azalmasında çok etkili olduğu belirtilmiştir.

Bugaeva ve ark. (2021), Rusya'nın Moskova bölgesinde yumuşak çürüklük belirtisi gösteren patates yumru ve saplarında *Pectobacterium* spp ve bunlara ait faj izolasyonunu gerçekleştirmişlerdir. *In vitro* denemelerinde faj kokteylinin pectobacterial suşlarını tamamen lize ettiğini saptamışlardır. Hasat sonrası depolarda faj kokteylini nem koruma sistemini kullanarak uygulanması fajların depo içinde eşit dağılımını sağlamış, depo içinde bulunan *Pectobacterium* spp popülasyonunu 10-12 kat azalttığını belirtmişlerdir.

Naligama ve Halmillawewa (2022b), Sri Lanka'nın Gampaha bölgesinde havuç depolarında ve bölgedeki pazar yerlerinde bakteriyel yumuşak çürüklük belirtisi

gösteren havuç bitkilerinden *Pectobacterium carotovorum*'u enfekte eden vB_PcaM_P7_Pc (kısaca P7_Pc) fajını izole etmişlerdir. Litik bir yaşam döngüsü ve *Miyovirüs* olan P7_Pc fajı, test edilen 4 *P. carotovorum* suşunu ve 1 *P. aroidearum* suşunu lize ettiğini saptamışlardır. Diğer ilgili fajlara göre daha uzun bir latent dönemi (125 dak.) olan P7_Pc fajının 147.299 bp'lik genom uzunluğunun %50.34'ünün G+C içerdiğini belirtmişlerdir. Genomunda 7 tRNA kodlayan gen tahmin edilirken, lizojeni ile ilgili herhangi bir gen bulunmadığını buda fajın litik bir faj olduğunu gösterdiğini belirtmişlerdir. Yapılan filogenetik ve genomun filogenomik analizlerine göre P7_Pc fajı *Certrevirus* cinsine ait olduğu, cinsin ortak özelliklerine bakıldığında P7_Pc fajı gelecekte biyokontrol ajanı olarak kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Kim ve ark. (2022), faj direnci en aza indirmek için faj reseptörü olarak kolonik asit (POP12 fajı) veya flagella (POP15 ve POP17 fajları) tanıyan üç litik faj içeren bir faj kokteylini *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc)'a karşı biyolojik mücadele ajanı olarak geliştirmişlerdir. *In vitro* koşullarında faj kokteyli fajların tek başına kullanılmasında daha etkili olduğunu saptamışlardır. Napa lahanası (*Brassica rapa* subsp. *pekinensis*) üzerinde yapılan denemede faj kokteylinin Pcc'nin gelişimini önemli derecede baskıladığını, yumuşak çürüklük belirtilerini önlediğini bildirmişlerdir. Sera ortamında faj kokteylinin genç napa lahanası yaprakları ile muamelesinde, faj içermeyen negatif kontrole göre yumuşak çürüklük hastalığını etkili bir şekilde önlediğini belirtmişlerdir.

2.6.2. Türkiye'de Bitki Bakteriyel Hastalıklarına Karşı Yapılmış Bakteriyofaj Çalışmaları

Dünyada tarım alanında faj çalışmaları 1920'lerde başlamış, 1934'ten sonra fitopatojen bakterilere karşı biyoajan olarak kullanılmaya başlanmıştır. Türkiye'de bitki bakteri hastalıklarında faj çalışmaları dünyadaki faj çalışmalarına göre çok sonradan gerçekleşmiştir.

Türkiye'de fitobakteri hastalıklarında ilk faj çalışması Saygılı ve Erkan (1985), tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada Balıkesir, Çanakkale, İzmir, Manisa ve Muğla illerinde domates hastalıkları etmeni olan *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* ve *Xanthomonas caampestris* pv. *vesicatoria* ile bulaşık bitki ve toprak örneklerinden, *Pseudomonas syringae* pv *tomato*,

için 9, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* için 5 ve *Xanthomonas caampestris* pv. *vesicatoria* için 11 adet bakteriyofaj elde etmişlerdir.

Çemen (2017), yüksek lisans çalışması kapsamında Adana ve Mersin illerinde domates üretim alanlarında (tarla, sera ve ticari fidelikler) bakteriyel benek hastalığı belirtisi gösteren bitki örneklerinden NYGA (Nutrient Yeast Glycerol Agar) besi yeri kullanarak *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*)'yu eriten bakteriyofaj izolasyonunu gerçekleştirmiştir. İzolasyonunu gerçekleştirdiği fajlardan 47 adetini saflaştırmış, bunlar içerisinde CMN33 kodlu faj tohum kökenli hastalığı tamamen (%100) baskılamayan yanı sıra çimlenmeyi %14.6 oranında arttırdığı belirtmiştir. CMN34 kodlu faj da hastalığı %65.8 oranında baskıladığı ve çimlenmeyi de %21.6 oranında arttırdığını bildirmiştir.

Akbaba (2019), doktora tez çalışması kapsamında İzmir ili ve çevresinde kiraz yetiştiriciliği yapılan bölgelerde bakteriyel kanser belirtisi gösteren bitkilerden alınan örneklerden patojen bakteriler izole edilmiş, biyolojik ve moleküler testlerle patojenlerin tanıları yapılmıştır. Tanısı yapılan patojen bakterilere karşı iklim odası koşullarında yararlı bakteriler (YB) ve bakteriyofajlarla biyolojik mücadele olanakları araştırılmıştır. İzolasyonu gerçekleştirilen 11 patojen bakteri izolatının 10 tane *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (*Pss*) olarak tanımlanmıştır. İklim odası koşullarında yapılan çalışmada, *Pss* ile inokule edilen kontrol bitkilerinde hastalık şiddeti %48.1 oranında saptanırken, *Pss* 'nin inokulasyonundan 10 gün sonra, YB uygulamalarının %30'u ve faj uygulamalarının %66'sı hastalık şiddetini pozitif kontrole göre %50 ve üzerinde azalttığını bildirmiştir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

Hatay ili havuç üretim alanında toplanan havuç bitkisi ve bu bitkilere ait yaprak, kök ve toprak, bakterilerin ve bakteriyofajların gelişimi için özel besi yerleri, çeşitli kimyasalların yanı sıra inkübatör, otoklav, etüv gibi laboratuvar malzemeleri bu çalışmanın materyalini oluşturmuştur.

3.2. Yöntem

3.2.1. Çalışmalarda Kullanılan Besi Yerleri ve İçerikleri

King's B Agar (KB), Luria Bertani Broth (LB) Nutrient Agar (NA), besi ortamları bakterilerin tazelenmesi ve saklanması için kullanılırken, etki mekanizmaları için Chrome Azurol-S Agar (CAS), Pikovskaya Agar (PVK) besi ortamları kullanılmış ve bu ortamların içerikleri EK-1'de verilmiştir. Tüm bu besi yerlerinin yanı sıra kullanılan tüm plastik malzemeler ve distile su 121 °C'de 15 dak. otoklav edilmiştir.

3.2.2. Sörvey Çalışmaları, Hastalık Etmeninin Tespiti ve Tanı Çalışmaları

Sörvey çalışmaları Hatay ilinde en fazla havuç üretimi yapılan (%58) Kırıkhan ilçesinde, T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı tarafından bildirilen sörvey talimatlarına göre yapılmıştır (Anonim, 2017). Bu kapsamda hasat öncesi (Ekim 2021-Ocak 2022), hasat dönemi (Şubat-Nisan 2022), havuç yıkama ve paketlenme evleri ve Antakya sebze Halinde sörveyler gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Sörvey çalışmaları. a: Hasat öncesi, b: Hasat dönemi, c: yıkama ve paketlenme fabrikası

Sörvey kapsamında gözlem yapılan tarlalarda tüm tarlayı temsil edecek şekilde zikzak çizmek veya göşegenleri doğrultusunda olmak suretiyle bitkiler kontrol edilmiştir. Hastalık belirtisi görülen bitkiler izolasyon ve teşhis işlemleri için şeffaf polietilen torbalara konularak buz kutuları içinde laboratuvara getirilmiştir (Şekil 3.2). Hastalık yaygınlığı sörvey yapılan tarlalar içinde hastalığın görüldüğü tarla sayısına göre, rastlama sıklığı ise her tarla için hastalıklı örnek sayısının o tarlada yapılan 100 bitkiye oranlanarak tespit edilmiştir.



Şekil 3.2. Hastalık belirtisi gösteren havuç bitkisi örnekleri

Bakteriyofaj izolasyonu için bitki ve toprak örnekleri hastalık belirtisi görülen tarlalardan alınarak şeffaf polietilen torbalara konulmuş, buz kutularında saklanarak laboratuvara getirilmiştir. Epifit bakteri izolasyonları içinde sağlıklı havuç bitkilerinin, yaprak, kök ve rizosfer toprağından örnekler toplanmıştır.

3.2.3. Patojen Bakterilerin İzolasyonu ve Saflaştırılması

Hastalık belirtisi görülen havuç bitkileri şeffaf polietilen torbalara konulmuş, buz kutularında saklanarak laboratuvara getirilmiştir. Buz kutularında muhafaza edilerek laboratuvara getirilen havuç örneklerinden bakteriyel etmenlerin izolasyonu; hastalık belirtisi gösteren havuç bitkilerinin yüzey dezenfeksiyonu için, içinde %70 alkol bulunan beherde 2 dak. bekletildikten sonra 2 farklı beherde bulunan steril saf suda 2'şer dak. bekletilmiştir. Steril kurutma kağıdında kurutulduktan sonra havuç bitkilerinin yumuşak doku ve sağlıklı dokunun birleştiği noktada steril bir bistüri ile kesilmiş, steril bir özeyele bitkiden doğrudan besi ortamına çizim gerçekleştirilmiştir. Petriler 24 ± 2 °C'de 24-48 saat süreyle inkübe edilmiştir. NGA besi yerinde şeffaf-krem renkte, kenarları krater-pürüzlü şekilli bakteri kolonileri NGA besi yerine transfer edilmiştir (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Havuç bitkisinden patojen izolasyonu

3.2.4. Bakteri İzolatlarının MALDI-TOF MS Yöntemiyle Tanısı

MALDI-TOF 1980 yılların sonunda Alman ve Japon bilim adamlarının ortak geliştirdiği, proteinlerinin peptid kütle parmak izi analiz olarak tanımlanan bir yöntemdir. Bakteri kolonileri saf olarak elde edildikten sonra özel matrix solüsyonlarını içeren metal veya plastik tek kullanımlık target (tabla)'e aktarılır, cihaz çalıştırıldıktan sonra target üzerine yüklenen alanlara lazer atışları yapılarak protein moleküllerinin harekete geçirilmesi (iyonizasyon) sağlanır. TOF tüpü içerisinde kütle/yük oranlarına göre kinetik enerji ile harekete geçen farklı hızlarda oluşan iyonların uçuş zamanları hesaplanır. Küçük kütleli iyonlar önce dedektöre çarpar ve sinyal kaydedilir. Elde edilen veriler daha sonra bilgisayarda yüklü olan kütüphane verileri ile karşılaştırılarak tür teşhisi yapılır (Ahmad ve ark., 2014; Wang ve ark., 2012).

İzolasyonu gerçekleştirilen saf kültürden alınan ve NGA besi yeri üzerinde 24-48 saat gelişen saf bakteri kolonisinden kürdan yardımıyla bir miktar bakteri kütlesi alınarak ependorf tüpe konulmuş, ependorf tüp içerisine 300 µl su eklenmiş deiyonize su içinde süspansiyon haline getirilmiştir. Oluşan süspansiyon üzerine 900 µl etanol (%97) eklenerek örnekler vortekslenmiştir. İşlem sonrası ependorf tüpler 2 dak. boyunca maksimum hızda santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası üst faz atılmış ve pelet üzerinde kalan etanolün uzaklaştırılması için tüpler ağzı açık şekilde oda sıcaklığında 2-3 dak. kurumaya bırakılmıştır. Kuruma işlemi sonrası peletlerin üzerine 40 µl formik asit (%70) eklenmiş ve tüpler vortekslenerek peletin formik asit içerisinde homojen bir şekilde süspanse olması sağlanmıştır. Elde edilen süspansiyonun üzerine 40 µl asetronitril eklenerek tekrar vortekslenmiş ve tüpler 2 dak. maksimum hızda santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası üst fazdan 1 µl alınarak polishtarget olarak adlandırılan metal plak üzerindeki kuyucuklara eklenmiştir. Oda sıcaklığında 1-2 dak. beklenerek örneğin kuruması sağlanmış ve üzerine 1 µl matriks solüsyonu (Matriks içerisinde: alfa siyano 4 hidroksisinnamicacid) ve solvent olarak da trifluoroasetik asit ve asetronitril eklendikten sonra tekrar oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Matriks kuruduktan sonra metal plaka MALDI-TOF cihazına yerleştirilmiştir. Her bir kuyucuktaki izolat numarası bilgisayara kaydedilerek tanı işlemi başlatılmıştır (Şekil 3.4). Cihaz içerisinde lazer ışını verilerek izolat iyonize moleküller haline dönüşmekte ve uçuşan moleküller bir detektör yardımı ile toplanarak cihazın kütüphanesindeki bilgiler ile karşılaştırılarak izolatların tür düzeyinde tanısı yapılmıştır.



Şekil 3.4. NA besi yerinde gelişen bakterilerin MALDİ-TOF’la tanı işlemleri

Teşhis sonucunda 2.30-3.0 aralığındaki skor değeri tür düzeyinde oldukça güvenilir olduğu; 2.00-2.299 aralığında ise kesin cins düzeyinde güvenilir, tür düzeyinde yüksek güvenilir olduğu; 1.70-1.999 arasında tanının cins düzeyinde

güvenilir, tür olarak muhtemel düzeyde olduğu; 1.7 değerinden aşağı olan değerler ise güvensiz tanı olarak değerlendirilmiştir.

3.2.5. Patates Dilimleri ile Pektolitik Aktivite Testi

Patates yumruları çeşme suyuyla fırçayla yıkanarak yüzey temizliği yapılmış, alevden geçirilip steril edilen bir bıçakla kabukları soyulmuştur. Yüzey dezenfeksiyonu için %70 alkolde 3 dakika bekletilmiş, alkolü uzaklaştırmak için 2 kez 3'er dak. steril saf su ile durulandıktan sonra steril bir bistüri ile 1 cm kalınlığındaki dilimler kesilip içinde steril ıslak filtre kağıtları bulunan petrilere yerleştirilmiştir. Steril bir kürdan yardımıyla patojen bakteri inokule edilmiştir (Şekil 3.5). Bakteri izolatları inokule edilmiş patates dilimlerinin bulunduğu petrilere 25±1 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnokulasyondan 2 gün sonra bakteri izolatlarının inoküle edildiği noktada yumuşama görülmesi pozitif olarak değerlendirilmiştir (Lelliott ve Stead, 1987; Schaad ve ark., 2001). Pozitif kontrol bakterisi olarak Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü bakteriyoloji laboratuvarı kültür koleksiyonunda tanılanmış olan *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc) izolatı kullanılmıştır. Negatif kontrol olarak steril saf su kullanılmıştır.



Şekil 3.5. Yüzey dezenfeksiyonu yapılmış patates dilimlerine bakterilerin inokulasyonu

3.2.6. Havuç Dilimleri üzerinde Patojenisite Testi

Havuç bitkileri çeşme suyuyla fırçayla yıkanarak yüzey temizliği yapılmış, alevden geçirilip steril edilen bir bıçakla kabukları soyulmuştur. Havuç dilimleri ile patojenisite testinde %70'lik etil alkol ile yüzey sterilizasyonu yapılan havuçlar steril bir bistüri ile 1 cm kalınlığında dilimlenerek içerisinde steril saf su ile nemlendirilmiş steril

filtre kağıtları bulunan 9 cm çapındaki cam petrilere yerleştirilmiştir. Havuç dilimlerinin üzerine steril bir kürdan yardımıyla patojen bakteri inokule edilmiştir (Şekil 3.6). Bakteri izolatları inokule edilmiş havuç dilimlerinin bulunduğu petriler 25 ± 1 °C’de inkübasyona bırakılmıştır. İnokulasyondan 2 gün sonra bakteri izolatlarının inoküle edildiği noktada yumuşama görülmesi pozitif olarak değerlendirilmiştir (Lelliot ve Stead, 1987). Pozitif kontrol bakterisi olarak Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü bakteriyoloji laboratuvarı kültür koleksiyonunda tanılanmış olan *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc) izolatı kullanılmıştır. Negatif kontrol olarak steril saf su kullanılmıştır.



Şekil 3.6. Yüzey dezenfeksiyonu yapılmış havuç dilimlerine bakterilerin inokulasyonu

3.2.7. Tütünde Aşırı Duyarlılık Testi (HR)

HR testinde NA besi yerinde 24-48 saat geliştirilen bakteri kültürlerinden 10^8 hücre/ml (OD=0.13) yoğunlukta hazırlanan süspansiyonlar steril enjektör yardımıyla tütün yaprağının damar aralarına enjekte edilmiştir. Pozitif kontrol olarak Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Bitki Sağlığı Kliniği Kültür Koleksiyon Merkezinden sağlanan *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* Psp 12 izolatı, negatif kontrol olarak ise yapraklara steril saf su inokule edilmiştir. İnokulasyondan 24-48 saat sonra inokulasyon noktasında doku çökmelerine ve nekrotik alanlara neden olan izolatlar HR (+) olarak kabul edilmiştir (Lelliott ve Stead, 1987; Schaad ve ark., 2001).

3.2.8. Potasyum Hidroksit Testi (KOH) ile Gram Reaksiyonun Belirlenmesi

Taze hazırlanan %3'lük Potasyum Hidroksit solüsyonundan lam üzerine bir damla damlatıldıktan sonra 48 saatlik bakteri kültürlerinden setril bir kürdanla alınan bakteri,

solüsyona dairesel hareketlerle karıştırılmıştır. 15-20 saniye sonra öze yukarı kaldırıldığında viskoz, yapışkanimsi bir sünmenin oluşması gram negatif olarak değerlendirilmiştir. Gram pozitif bakteri kültürü olarak *Bacillus subtilis* izolatı kullanılmıştır.

3.2.9. Bakteriye Hastalık Etmenlerin Moleküler Tanısı

Bakteri hücrelerinden DNA izolasyonu: Bakteri izolatlarından genomik DNA izolasyonu “Quick-DNA™ Fungal/Bacterial Microprep Kit –ZymoResearch-D6007” ile yapılmıştır. NA besi yerinde geliştirilmiş kültürler öze yardımı ile içerisinde 20 ml NB bulunan tüplere aktarılarak orbital çalkalayıcıda 27 °C’de 150 rpm’de 48 saat geliştirilmiştir. Ardından izolatlar 10000 rpm’de 10 dak. santrifüj edilmiş dipte kalan pellet alınmış ve steril havanlarda sıvı azot ve havan eli yardımı ile ezilmiştir. Daha sonra 20 mg/ml lizozin ilave edilerek TE buffer içeren tüplere aktarılmıştır. İçinde 200 µl distile steril su bulunan 2 ml’lik lizis tüpüne 10-20 mg bakteri hücresi eklendikten sonra tüpe 700 µl BashingBead™ tamponu ekleyip kapağı sıkıca kapatılmıştır. Tüp 5 dak. boyunca maksimum hızda vortekslelendikten sonra 1 dak. boyunca 10000 rpm’de santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra 400 µl’ye kadar süpernatant içinde ZymoSpin™ III F Filtresi bulunan toplama tüpüne aktarılmış 1 dak. boyunca 8000 rpm’de santrifüj edildikten sonra ZymoSpin™ III F Filtresi atılmıştır. Toplama tüpündeki filtrata 1200 µl Genomik Lizis Tamponu eklendikten sonra iyice karıştırılmıştır. Karışımdan 800 µl kolona aktarılmış kolon bir koleksiyon tüpü içinde 1 dak. boyunca 10000 rpm’de santrifüj edilmiştir. Toplama tüpünün içindeki sıvı faz atıldıktan sonra tekrar 800 µl kolona aktarılmış kolon bir koleksiyon tüpü içerisinde tekrar 1 dak. boyunca 10000 rpm’de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası kolon yeni koleksiyon tüpünün içine yerleştirilmiş, 200 µl DNA Pre-Wash Buffer eklendikten sonra 10000 rpm’de 1 dak boyunca santrifüj edilmiştir. Daha sonra kolon içerisine 500 µl g-DNA Wash Buffer eklendikten sonra 1 dak. 10000 rpm’de santrifüj edilmiştir. Bu işlemden sonra koleksiyon tüpü uzaklaştırılmış ve kolon 1.5 µl’lik steril mikrosantrifüj tüplerine yerleştirilmiştir. Kolon içerisine 20 µl DNA Elution Buffer doğrudan kolon matriksine uygulanmış ve 1 dak. İnkübasyon edildikten sonra 10000rpm’de 30 sn. santrifüj edilerek kolon içerisindeki Genomik DNA’nın mikrosantrifüj tüpüne geçmesi

sağlanmıştır. Tüm bu işlemler sonucu elde edilen Genomik DNA'lar PCR çalışmalarında kullanılmak için -20 °C'de saklanmıştır.

PCR Çalışmaları: PCR çalışmalarında 16S rRNA genel primerleri olan 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') (Cui ve ark., 2021) primer çifti kullanılmıştır.

Reaksiyon karışımı 2 µl bakteri DNA'sı, 5 µl 5xPCR buffer, 1 µl 25 mM MgCl₂, 0.5 µl 10 mM dNTPs, 1 µl (10 mM) Primer setleri (0.5 µl 16S 27F+0.5 µl 16S 1492R), 0.2 µl Taq polimeraz (500 ünite/ µl) ve 15.3 µl steril saf su (toplam hacim 25 µl) olarak hazırlanmıştır.

PCR programı 94 °C'de 4 dak. (ilk denetasyon), 94 °C'de 30 sn., 50-60 °C'de 45 sn. (hibridizasyon), 72 °C'de 1 dak. (uzama) olarak 40 döngü ve son olarak 72 °C'de 10 dak. final uzaması olacak şekilde uygulanmıştır.

PCR ürünlerinin görüntülenmesi için %1.5'lik agaroz jel hazırlanmıştır. Jel üzerindeki kuyucuklara yüklenen PCR ürünleri 120 V akımda 45 dak. yürütülmüştür (Leiminger ve ark., 2013). Elektrofrez işlemi sonrası jel Syber Gold ile boyama işleminden geçirildikten sonra bantların UV ışık altında görünür hale gelmesi sağlanmıştır. Jel görüntüleme cihazı ile jel üzerinde oluşan bantlar fotoğraflanmıştır.

3.2.10. DNA Dizileme ve Filogenetik Analizler

Elde edilen PCR ürünlerinin dizi analizleri ABI 3730 Automated Genetic Analyzer cihazı kullanılarak hizmet alımı şeklinde yapılmıştır (MedSanTek, İstanbul). Elde edilen diziler BLAST (NCBI) analizlerine tabii tutulmuştur. MEGAX yazılımı kullanılarak neighbor-joining metodu ile 1000 bootstrap tekrarı ile çoklu eşleştirme (Multiple alignment) genetik varyasyon ve filogenetik analizler yapılmıştır (Tamura ve ark., 2011).

3.2.11. Antagonist Epifit Bakterilerin İzolasyonu

Epifit bakteriler sağlıklı havuç bitkilerin kök, yaprak ve rizosfer toprağından izole edilmiştir. Bu amaçla Kırıkhan ilçesine bağı Çataltepe ve Yalangoz bölgelerinde 2'si siyah havuç tarlası olmak üzere 5 tarlaya sörvey gerçekleştirilmiştir.

Yaprak ve Köklerde Antagonist Epifit Bakteri İzolasyonu: Sağlıklı bitkilerden alınan kök ve yaprak örnekleri içerisinde 3 ml NB bulunan tüpler içerisinde konularak buz kutularında saklanmıştır. Laboratuvara getirilen içerisinde bitki örnekleri bulunan sıvı besi ortamından bir öze dolusu alınarak KB besi ortamına çizgi ekim şeklinde ekilerek 26 °C'de inkübasyona bırakılmıştır (Şekil 3.7). İnkübasyon sonrası gelişen tek koloniler alınarak yeni besiyerlerinde saflaştırılmıştır. İzolasyonlar sonucunda kök ve yapraklardan 144 epifit bakteri izolatu saflaştırılmış ve sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere buzdolabında +4 °C'de saklanmıştır.



Şekil 3.7. Sağlıklı havuç bitkilerinin kök ve yapraklarında epifit bakterilerin izolasyonu

Rizosfer Toprağından Aday Antagonist Epifit Bakteri İzolasyonu: Toprak örnekleri şeffaf polietilen torbalar içerisinde laboratuvara getirilmiştir. Laboratuvara getirilen topraktan 1 gr alınarak 9 ml steril saf su içinde iyice karıştırılmış daha sonra bu karışımdan 1 ml alınarak tekrar 9 ml steril saf su içine konularak karıştırılmış en son bu karışımdan da 1 ml alınarak yine 9 ml steril saf su içine konularak karışım 10^{-3} 'e kadar seyreltilmiştir.

Bu karışımlardan ayrı ayrı 0.1 ml alınarak petrilerde bulunan KB besi yerine steril cam bagele iyice yaydıktan sonra petriler 26°C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası gelişen tek koloniler alınarak yeni besi yerlerinde saflaştırılmıştır. İzolasyonlar

sonucu farklı olduğunu düşündüğümüz 52 epifit bakteri izolatu saflaştırılmış ve sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere buzdolabında +4°C’de saklanmıştır.

3.2.12. Aday Antagonist Epifit Bakteriler ile Tütünde Aşırı Duyarlılık Testi (HR)

HR testinde NA besi yerinde 24-48 saat geliştirilen aday antagonist bakteri kültürlerinden 10^8 hücre/ml (OD=0.13) yoğunlukta hazırlanan süspansiyonlar steril enjektör yardımıyla tütün yaprağının damar aralarına enjekte edilmiştir. Pozitif kontrol olarak *Pseudomonas syringae* pv *apii* (Psa) izolatu negatif kontrol olarak ise yapraklara steril saf su inokule edilmiştir. İnokulasyondan 2 gün sonra inokulasyon noktasında doku çökmelerine ve nekrotik alanlara neden olan izolatlar HR (+) olarak kabul edilmiştir (Lelliott ve Stead, 1987; Schaad ve ark., 2001).

3.2.13. Aday Epifit Bakterilerin Havuç Dilimleri ile Yumuşak Çürüklük Testi

Yumuşak çürüklük testi için aday antagonist bakteri izolatları havuç dilimleri üzerine teste tabi tutulmuştur. Havuçlar dezenfekte edilmek amacıyla kabukları soyulduktan sonra %70 alkol ile dezenfekte edilmiş ve steril bistüri ile 1 cm. eninde dilimlenmiştir. İçinde steril ıslak filtre kağıdı bulunan steril petrilere havuç dilimleri yerleştirilmiştir. Steril kürdan yardımıyla havuç dilimleri üzerine bakteri izolatları inoküle edilmiştir. Bakteri izolatları ile bulaştırılmış havuç dilimlerinin bulunduğu petrilere 25±1 °C’ de inkübasyona bırakılmıştır. İnokulasyondan 2 gün sonra bakteri izolatlarının inoküle edildiği noktada yumuşama görülmesi pozitif olarak değerlendirilmiştir. Pozitif kontrol bakterisi olarak Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü bakteriyoloji laboratuvarı kültür koleksiyonunda tanımlanmış olan *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* Ecc8 izolatu kullanılmıştır (Lelliott ve Stead, 1987; Schaad ve ark., 2001).

3.2.14. Aday Antagonist Bakteri İzolatlarının Potasyum Hidroksit Testi (KOH) ile Gram Reaksiyonun Belirlenmesi

Taze hazırlanan %3’lük Potasyum Hidroksit solüsyonundan lam üzerine bir damla damlatıldıktan sonra 48 saatlik bakteri kültürlerinden steril bir kürdanla alınan bakteri, solüsyona dairesel hareketlerle karıştırılmıştır. 15-20 saniye sonra steril kürdan yukarı

kaldırıldığında viskoz, yapışkanimsi bir sünmenin oluşması gram negatif olarak değerlendirilmiştir (Schaad ve ark., 2001). Gram pozitif bakteri kültürü olarak *Bacillus subtilis* izolatu kullanılmıştır.

3.2.15. Aday Antagonist Epifit Bakterilerin *In vitro* Biyokontrol Etkinin Belirlenmesine Yönelik Çalışmalar

Antibiyosis Testi: *In vitro* antagonistik etkisi testlenecek aday antagonist bakteri izolatlarının 24 saatlik kültüründen NA besiyeri içeren 9 cm çaplı petrilere birbirinden eşit uzaklıkta olmak üzere, 3 noktaya ekim yapılmıştır. 24 ± 1 °C’de 48 saatlik inkübasyondan sonra gelişen bakteri kolonileri üzerine 24 saatlik *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc) kültüründen hazırlanan patojen süspansiyonu (10^8 hücre/ml) pülverize edilmiştir (Şekil 3.8). Petriler 25 °C’de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. 48 saat sonunda NA besiyerinde patojen gelişiminin engellenmesi sonucu oluşan engelleme zonlarının çapının bakteri kolonisinin çapına bölünmesi ile indeks değerleri hesaplanmıştır (Ullah ve ark., 2017).



Şekil 3.8. Aday antagonist bakterilerin biyokontrol etkilerinin belirlenmesi amacıyla NA ortamına nokta ekimleri ve patojen bakterinin petri kabına püskürtülmesi

Aday Antagonist Epifit Bakterilerin Tanılaması: Antibiyosis testinde engelleme zonları oluşturan aday antagonist bakterileri izolatların Matrix Assisted Laser Desorption İonization-Time Of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) ile tanıları yapılmıştır.

Aday Antagonist Epifit Bakterilerin Indol Asetik Asit (IAA) Aktivitesi: L-tryptophan varlığında Salkowski yöntemi kullanılmak suretiyle epifit bakteri izolatlarının IAA üretme potansiyelleri belirlenmiştir (Glickman ve Dessaux., 1995).

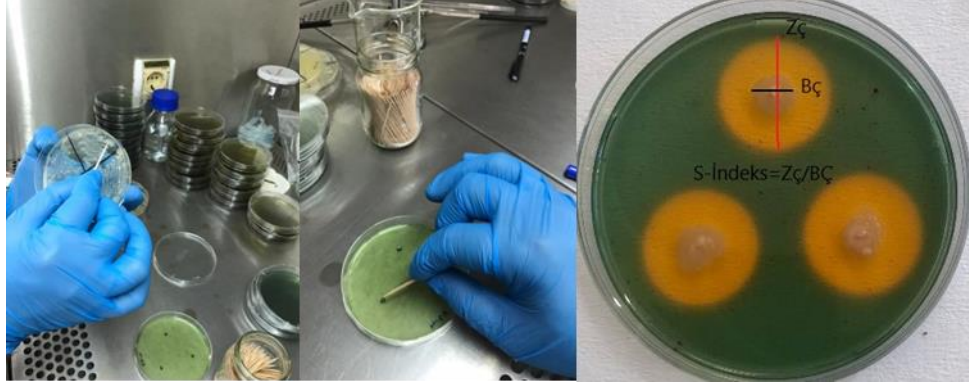
Sıvı besi ortamında 48 saat süre ile geliştirilen bakteri süspansiyondan (10^8 hücre/ml) 500 µl alınarak L-tryptophan (3 mg/ml) içeren 5 ml steril LB besi yerine eklenmiştir ve 30 °C'de 200 rpm'e ayarlı inkübatörlü orbital çalkalayıcıda 4 gün inkübasyona bırakılmıştır. L-tryptophan içermeyen besi yeri kontrol uygulama olarak değerlendirilmiştir. İnkübasyon sonrası tüpler 5000 rpm'de 30 dak. santrifüj edildikten sonra üst kısımdaki süpernatanttan 1 ml alınmış ve üzerine 2 damla (yaklaşık 40 µl) fosforik asit ilave edilmiştir. Hazırlanan karışım daha sonra içerisinde 4 ml Salkowski çözeltisi (150 ml %98'lik H_2SO_4 , 250 ml of distile H_2O , 7.5 ml of 0.5 M $FeCl_3 \cdot 6H_2O$) bulunan cam tüplere aktarılmış ve oda sıcaklığında karanlık ortamda 30 dak. bekletilmiştir. Süre sonunda örnekler UV-vis spektrofotometre (Perkin Elmer, Lamda 25, USA) ile 535 nm dalga boyunda okunarak absorbans değerleri belirlenmiştir (Şekil 3.9). Elde edilen absorbans değerleri saf IAA (Merck, Darmstadt, Germany) çözeltisi ile hazırlanan IAA konsantrasyon standart eğrisiyle karşılaştırılmak suretiyle (Aktan, 2018) aday bakteri izolatlarının IAA üretim miktarları µg/ml olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.9. Aday epifit bakteri izolatlarının Salkowski çözeltisi eklenerek oda sıcaklığında inkübe edilen bakteri izolatlarında IAA üretme potansiyelinin belirlenmesi ve UV-vis spektrofotometre ile absorbans değerlerinin belirlenmesi.

Aday Antagonist Epifit Bakterilerin Siderofor Üretiminin Belirlenmesi: Blue-CAS Agar (Schwyn ve Neilands, 1997) besi yeri kullanılarak antagonist aday bakterielerin siderofor üretimleri belirlenmiştir.

Siderofor etkinin varlığını belirlemek için 2 günlük taze kültürden steril kürdan yardımıyla test edilecek bakteriden alınan inokulum, CAS agar ortamı bulunan 9 cm çaplı petrilere birbirinden eşit uzaklıkta 3 noktaya ekim yapılmış ve petrilere 25±1 °C'de 7 gün inkübasyona bırakılmıştır. Antagonist bakteriler tarafından siderofor üretimine bağlı olarak oluşan sarı-turuncu zonlar ve bakteri kolonisinin çapları ölçülmüştür (Şekil 3.10).



Şekil 3.10. Aday antagonist bakterilerin siderofor üretimlerinin belirlenmesi amacıyla Blu-CAS agar ortamına nokta ekimleri ve S-indeks değerlerinin hesaplanması

Meydana gelen zon çapları ve bakteri kolonisi çapları her izolat için aşağıda verilen siderofor çözünürlük indeksi (S-indeks) formülüne göre hesaplanarak ölçülmüştür (Ullah ve ark., 2017). Deneme 3 kez tekrarlanmıştır.

$$S - indeks = (Z_{\text{ç}})/B_{\text{ç}} \quad (3.1)$$

Burada;

Zç: Bakteri etrafında oluşan zon çapı

Bç: Bakteri koloni çapı

Aday Antagonist Epifit Bakterilerin Fosfor Çözme Potansiyellerinin Belirlenmesi:

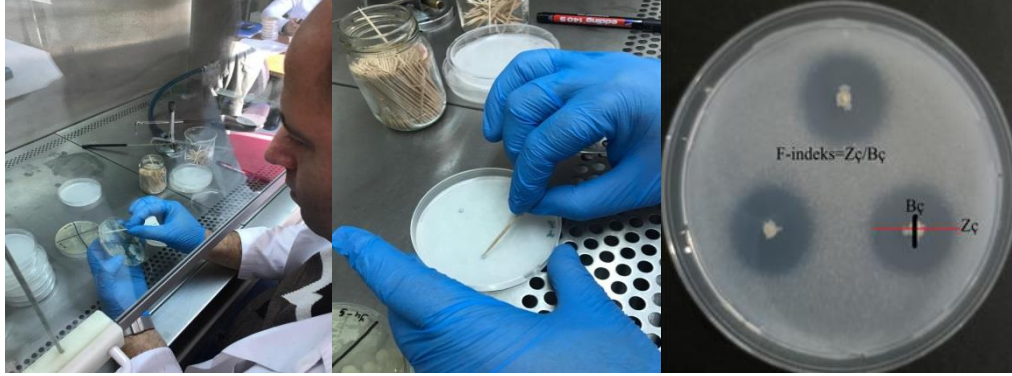
Aday bakteri izolatlarının fosfatı çözme etkinliği, trikalsiyum fosfat içeren Pikovskaya Agar (PVK) besi yeri içeren petrilere belirlenmiştir (Kumar ve ark., 2012). Test edilecek olan bakteri izolatların 2 günlük taze kültüründen steril kürdan ile alınan bakteri inokulumu, PVK Agar ortamı üzerine inokule edilmiş ve petrilere 26 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnokulasyondan 7 gün sonra bakteri kolonisi etrafında şeffaf bir zon oluşumu (engelleme bölgesi), bakterinin fosfor çözme yeteneği için pozitif olarak kabul edilmiştir. Oluşan engelleme zonu ile bakteri kolonisinin çapları ölçülmek suretiyle her izolat için Fosforu çözme indeksi (F-indeks) hesaplanmıştır (Şekil 3. 11). Deneme 3 kez tekrarlanmıştır.

$$F - indeks = (Z_{\text{ç}})/B_{\text{ç}} \quad (3.2)$$

Burada;

Z_ç: Bakteri etrafında oluşan zon çapı

B_ç: Bakteri koloni çapı



Şekil 3.11. Aday antagonist bakterilerin fosfor çözme potansiyellerinin belirlenmesi amacıyla PVK agar ortamına nokta ekimleri ve F-indeks değerlerinin hesaplanması

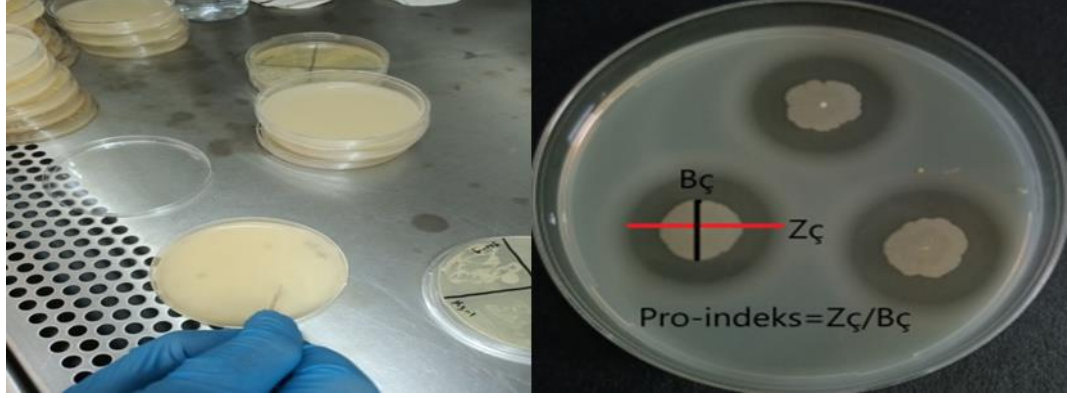
Aday Antagonist Bakteri İzolatlarının Proteaz Enzim Üretme Potansiyellerinin Belirlenmesi: İçerisinde %2 yağı alınmış süt tozu (Skimmed Milk Powder, Merck, Darmstad, Germany) bulunan LB (SMLBA) besi yeri kullanılarak aday antagonist bakteri izolatlarının proteaz enzimi üretme etkinliği belirlenmiştir (Perneel ve ark., 2007). Bu amaçla 2 günlük taze kültürden steril kürdan ile test edilecek aday antagonist bakteri inokulumu SMLBA besi yeri bulunan petrilere birbirine eşit uzaklıkta 3 noktaya ekim yapılmış ve bu petrilere 25±1 °C’de 5 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnokulasyondan 5 gün sonra bakteri kolonisi etrafında oluşan şeffaf zon (engelleme bölgesi) bakterinin proteolitik aktivite için pozitif olarak kabul edilmiştir. Bakteri kolonisi etrafında oluşan zonun ve bakteri kolonisi çapları mm olarak ölçülmüş ve her izolat için aşağıda verilen proteolitik indeksi (Pro-indeks) formülüne göre hesaplanarak ölçülmüştür (Şekil 3.12) (Ullah ve ark., 2017).

$$Pro - indeks = (Z_{\text{ç}})/B_{\text{ç}} \quad (3.3)$$

Burada;

Z_ç: Bakteri etrafında oluşan zon çapı

B_ç: Bakteri koloni çapı



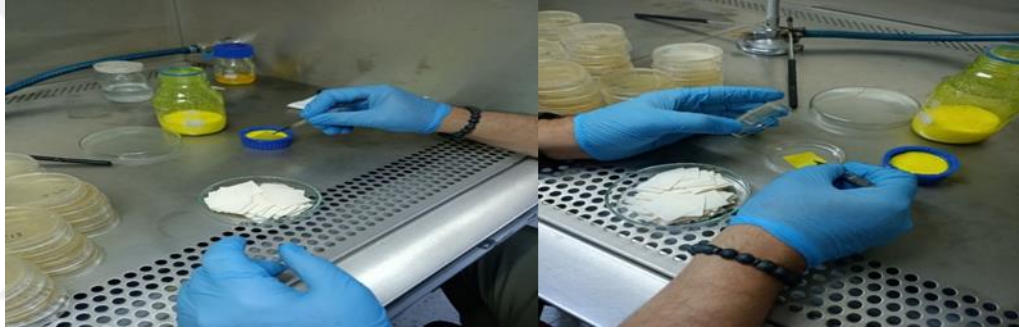
Şekil 3.12. Aday antagonist bakterileri izolatlarının proteaz enzimi üretme potansiyellerinin belirlenmesi amacıyla SMLBA agar ortamına nokta ekimleri ve Pro-indeks değerlerinin hesaplanması

Aday Antagonist Bakteri İzolatlarının Amonyak (NH₃) Üretme Potansiyellerinin Belirlenmesi: Aday antagonist bakteri izolatlarının Amonyak (NH₃) oluşturma potansiyelleri Nessler's (Sigma Aldrich, Katalog no: 109028) çözeltisi ile belirlenmiştir (Cappuccino ve Sherman, 1992). Bu amaçla steril 5 ml peptonlu su bulunan cam tüplere 2 günlük taze kültürden steril öze ile alınan bakteri izolatları inokule edilmiştir. Bu tüpler 2 gün boyunca 26±1 °C'de 150 rpm'e ayarlı inkübatörlü orbital çalkalayıcıda inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan 2 gün sonra peptonlu su içerisinde gelişen bakteriler üzerine 250 µl Nessler's çözeltisi ilave edilmiştir (Şekil 3.13). Kontrol olarak bakteri eklenmemiş peptonlu su içerisine Nessler's çözeltisi eklenmiştir. Değerlendirme bakteriler tarafından üretilen amonyağa bağlı olarak meydana gelen renk değişimlerine göre – veya + olarak yapılmıştır.



Şekil 3.13. Aday antagonist bakteri izolatlarının amonyak (NH₃) üretme potansiyellerinin belirlenmesi amacıyla peptonlu suya ekimi ve Nessler's çözeltisi ilave edilmesi

Aday Antagonist Bakteri İzolatlarının Hidrojen Siyanür (HCN) Üretme Potansiyellerinin Belirlenmesi: Aday bakteri izolatlarının Hidrojen siyanür (HCN) oluşturma potansiyelleri Castric (1977) tarafından bildirilen yöntem ile belirlenmiştir. Test edilecek olan bakteri izolatların 2 günlük taze kültüründen steril öze ile alınan bakteri inokulumu, içerisinde 4.4 gr/L-1 glycine içeren TSA besi yeri üzerine çizilerek inokulasyonları yapılmıştır. Petri kapağına ise steril filtre kağıdı (1x4 cm şerit halinde kesilmiş) yerleştirilmiş ve filtre kağıdı %0.05 picric acid + %1 sodium carbonate (Na_2CO_3) süspansiyonu ile ıslatılmış (yaklaşık 0.5-1.0 ml) ve petri kapağının iç tarafına yapıştırılmıştır. Daha sonra petri kabı kapatıldıktan sonra etrafı parafilm ile çevrilmiş ve petriler 26 °C'de 3 gün inkübasyona bırakılmıştır (Şekil 3.14). Pozitif kontrol olarak *Pseudomonas aeruginosa* izolatı kullanılmıştır.



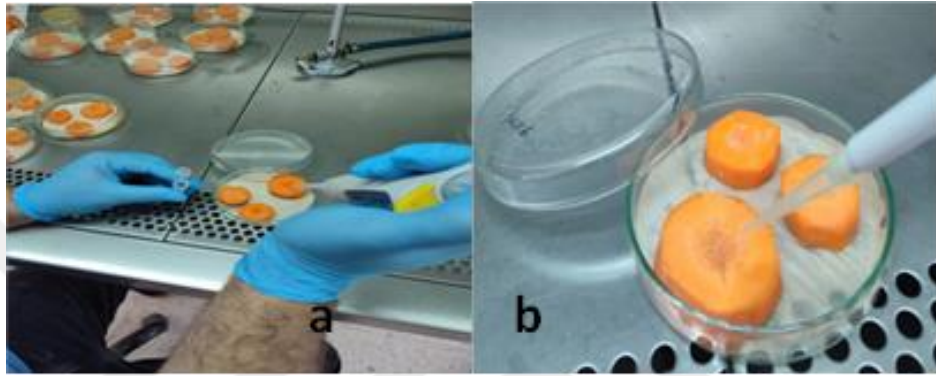
Şekil 3.14. . Aday Antagonist Bakteri İzolatlarının Hidrojen Siyanür (HCN) Üretme Potansiyellerinin Belirlenmesi

3.3. *In vivo* Biyokontrol Etkinin Belirlenmesi

3.3.1. Havuç Dilimi Testleri ile Aday Antagonist Bakteri İzolatlarının Biyokontrol Etkinliğinin Belirlenmesi

Havuç dilimi testleri ile aday bakteri izolatlarının biyokontrol etkinliğinin belirlenmesi Filiz-Doksöz ve Bozkurt (2021) tarafından bildirilen yöntem esas alınarak gerçekleştirilmiştir. Havuç dilimleri patojenisite testinde olduğu gibi havuç bitkileri çeşme suyuyla fırçayla yıkanarak yüzey temizliği yapılmış, alevden geçirilip steril edilen bir bıçakla kabukları soyulmuştur. %70'lik etil alkol ile yüzey sterilizasyonu yapılan havuçlar steril bir bistüri ile 1 cm kalınlığında dilimlenerek içerisinde steril saf su ile nemlendirilmiş steril filtre kağıtları bulunan 9 cm çapındaki cam petrilere

yerleştirilmiştir. Havuç dilimi testinde önceden belirtildiği şekilde steril edilen havuç dilimlerinin üzerine antibiyosis testinde başarılı bulunan 13 aday antagonist bakteri izolatlarından 50 µl (10^8 hücre/ml) inokule edilmiştir. İnokulasyondan 2 saat sonra dilimlerin üzerine patojen bakteri (*Pcc*) inokule edilmiş ve 27 ± 2 °C’de 2 gün inkübasyona bırakılmıştır. Kontrol olarak yalnız patojen inokule edilmiş (Kontrol pozitif) ve yalnız steril su inokule edilmiş (Kontrol negatif) dilimler kullanılmıştır (Şekil 3.15).



Şekil 3.15. Havuç dilimi testleri ile aday bakteri izolatlarının biyokontrol etkinliğinin belirlenmesi. Aday antagonist (a), Patojen (*Pcc*) (b)

Değerlendirme havuç dilimleri üzerinde oluşan eksudat ve havuç dilimlerinde meydana gelen yumuşak çürüklük belirtileri ile yapılmıştır. Oluşan hastalık belirtileri patojen inokulasyonundan 2 gün sonra 0-4 skalasına göre değerlendirilmiş (Helias ve ark., 2000) ve Thousand Heuberger* formülü ile % hastalık şiddeti belirlenmiştir. Ayrıca antagonist bakterilerin K(+)’e göre hastalığı engelleme oranları (% etki) ayrıca belirlenmiştir.

0-4 skalası

- 0 – havuç dilimlerinde eksudat ve yumuşak çürüklük yok
- 1 - havuç dilimlerinde eksudat ve yumuşak çürüklük %25
- 2 - havuç dilimlerinde eksudat ve yumuşak çürüklük %50
- 3 - havuç dilimlerinde eksudat ve yumuşak çürüklük %75
- 4 - havuç dilimlerinde eksudat ve yumuşak çürüklük %100

$$\% \text{ hastalık şiddeti} = \frac{\sum (\text{Skala değeri} \times \text{skalada değerlendirmeye giren birey sayısı})}{(\text{En yüksek skala} \times \text{toplam birey sayısı})} \times 100$$

3.4. Bakteriyofaj

3.4.1. Bakteriyofajların (Faj) İzolasyonu

Bakteriyofajların izolasyonunda Saygılı ve Erkan (1985), Cemen (2017), tarafından bildirilen yöntemler esas alınarak faj izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Faj izolasyonu için en fazla havuç üretim yapılan Kırıkhan ilçesinde havuç ekim alanlarına hasat öncesi (Ekim-Aralık 2021) ve hasat sonrası (Aralık-Nisan 2022) sörvey yapılmıştır. Bu kapsamda Topboğazı, Karadurmuşlu, Karasu, Yalangoz ve Çataltepe bölgelerinde 12 tarlada, 4 havuç yıkama ve paketlenme fabrikası ve Antakya sebze haline sörveyler gerçekleştirilmiştir. Bu alanlarda bakteriyel yumuşak çürüklük belirtisi gösteren havuçlar ve toprak örnekleri şeffaf polietilen torbalara konularak laboratuvara getirilmiştir (Şekil 3.16).



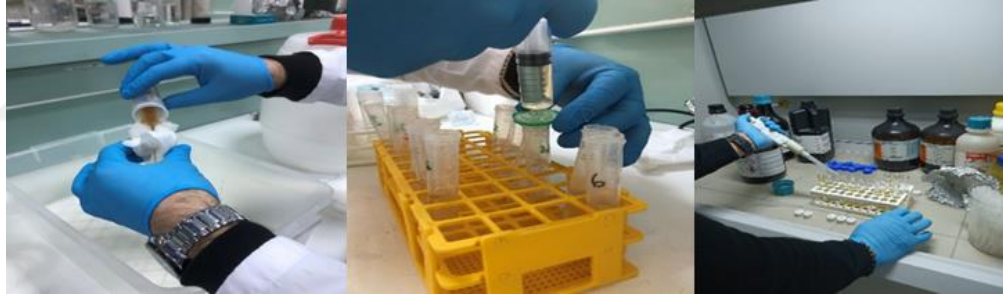
Şekil 3.16. Havuç üretim alanında bulunan Bakteriyel Yumuşak Çürüklük belirtisi gösteren bitki ve toprak örneklerinin toplanması

Bitkiden Bakteriyofaj İzolasyonu: Sörvey yapılan alanlarda bakteriyel yumuşak çürüklük belirtisi gösteren havuç bitkileri şeffaf polietilen torbalara konularak laboratuvara getirilmiştir. Laboratuvara getirilen bitki örnekleri bir fırça yardımıyla yıkanarak yüzey temizliği yapılmıştır. Daha sonra %70'lik alkol ile bitki yüzeyleri dezenfekte edildikten sonra 10-15 g havuç örnekleri steril havanda ezilmiştir. Ezilen örnekler içerisinde 35-40 ml steril saf su bulunan steril tüplere aktarılarak 24 saat süreyle +4 °C'deki buzdolabında muhafaza edilmiştir (Şekil 3.17).



Şekil 3.17. %70 alkol ile dezenfekte edilen havuç örneklerinin steril havanda ezilmesi

24 saat sonra bu süspansiyonu temiz bir tülbent ile başka bir tüpe süzerek bitki artıkları uzaklaştırılmıştır. Süzüntüde bulunan bakterilerin çökmesi için süspansiyon 10 dak. 9000 devir/dak. santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatant (sıvı faz) steril tüpe aktarılmış, pellet ise atılmıştır. 0.22 mm filtreden geçirdikten sonra kalan bakterileride uzaklaştırmak için tüplerde bulunan bakteriyofaj süspansiyonuna her 5 ml süspansiyon için 0.5 ml kloroform eklenerek 4-5 saat 150 rpm’de orbital çalkalayıcıda çalkalanmaya bırakılmıştır (Şekil 3.18).



Şekil 3.18. Havuç bitkisi örneklerinden faj izolasyonu

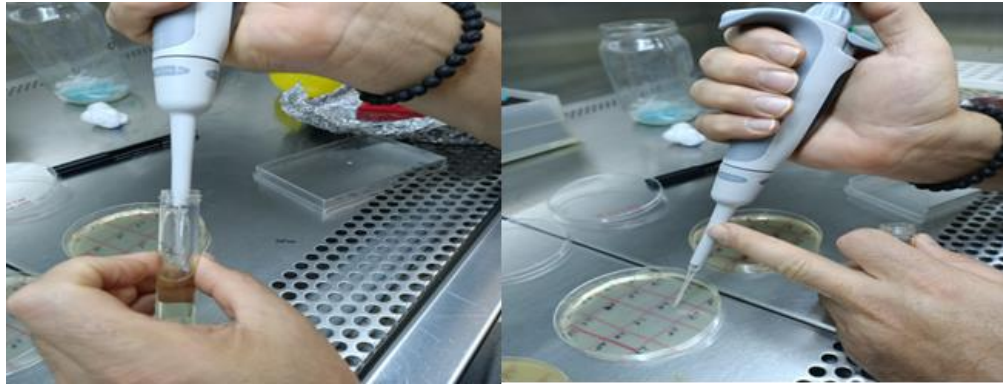
Bu aşamadan sonra faj plağı elde etmek için iki farklı yöntem denenmiştir.

Yöntem 1: Orbital çalkalayıcıda çalkalanmaya bırakılan ve 4-5 saat çalkalanan faj süspansiyonu ile 24 saatlik NB besi yerinde geliştirilen 10^8 hücre/ml yoğunlukta hazırlanan daha önce havuçta izole edilip tanısı yapılmış *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* süspansiyonundan 1’er ml alınarak steril boş petrilere konulmuştur. Faj+patojen süspansiyonun üzerine 45 °C’ye kadar ısıtılmış KB ve NA besi yerleri ayrı ayrı dökülmüş, süspansiyonlar ile besi yerinin birbirlerine karışmasını sağlamak için hafifçe çalkalanmıştır. Petriler steril kabin içinde yarı açık şekilde yaklaşık 1 saat bekletilerek kurutulduktan sonra 27 °C’de 48 saat inkübe edilmiştir (Şekil 3.19). 48 saat sonra petriler faj plakları (erime alanlar) yönünde değerlendirilmiştir.



Şekil 3.19. Faj+patojen+besi yerinin petrilere çalkalama yöntemiyle bitki örneklerinden faj izolasyonu

Yöntem 2: 24 saatlik NB besiyerinde geliştirilen, 10^8 hücre/ml yoğunlukta hazırlanan daha önce havuçta izole edilip tanısı yapılmış *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* süspansiyonundan 1 ml alınarak 45 °C'ye kadar ısıtılmış 12 ml ayrı ayrı KB ve NA besiyerleri ile birlikte petrilere dökülmüş, patojen ile besiyerinin birbirlerine karışmasını sağlamak için petrilere hafifçe çalkalanmış steril kabinde kurumaya bırakılmıştır. Patojen ile karıştırılmış besiyeri kuruduktan sonra faj süspansiyonunda 10 µl alınarak nokta şeklinde faj ekimi gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.20). Petrilere steril kabin içinde yarı açık şekilde yaklaşık 1 saat bekletilerek kurutulduktan sonra 27 °C'de 48 saat inkübe edilmiştir. 48 saat sonra petrilere faj plakları (erime alanlar) yönünde değerlendirilmiştir.



Şekil 3.20. Farklı besiyerlerinde nokta şeklinde bitki örneklerinden faj izolasyonu

Toprakta Bakteriyofaj İzolasyonu: Bakteriyel yumuşak çürüklük belirtisi gösteren havuçlar ve ekildiği toprakla birlikte şeffaf polietilen torbalara konularak laboratuvara getirilmiştir. Laboratuvara getirilen toprak kurutulduktan sonra elekten geçirilmiştir.

Elekten geçirilen topraktan 75-100 g alınarak 24 saat içinde geliştirilen patojen (*Pcc*) kültürü, 150 ml NB besi yeri bulunan erlenlere konulmuştur. Bu karışım 2 gün süreyle 27 °C’de orbital çalkalayıcıda çalkalanarak inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda erlenlerde bulunan süspansiyonlar 0.45 mm filtreden geçirilip steril cam falkon tüplere konularak 9000 devir/dak hızda 10 dak. santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra süpernatant (sıvı faz) steril tüpe alınmış ve tortu kısmı atılmıştır. Daha sonra tekrar süspansiyon 0.22 mm filtreden geçirdikten sonra her 5 ml süspansiyon için 0.5 ml kloroform eklendikten sonra 30 dak. çalkalanmıştır (Şekil 3.21).



Şekil 3.21. Toprakta faj izolasyonu işlemleri

Bu aşamadan sonra faj plağı elde etmek için bitki örneğinde olduğu gibi iki farklı yöntem denenmiştir.

Yöntem 1: 30 dak. çalkalanmadan sonra Kloroformlu faj süspansiyonu ile NB besi yerinde çoğaltılan 24 saatlik 10^8 hücre/ml yoğunlukta hazırlanan daha önce havuçta izole edilip tanısı yapılmış *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* süspansiyonundan 1'er ml alınarak steril boş petrilere konulmuştur. Faj+patojen süspansiyonu üzerine 45 °C'ye kadar ısıtılmış KB ve NA besi yerleri ayrı ayrı dökülmüş, süspansiyonlar ile besi yerinin birbirlerine karışmasını sağlamak için petriler hafifçe çalkalanmıştır. Petriler steril kabin içinde yarı açık şekilde yaklaşık 1 saat bekletilerek kurutulduktan sonra 27 °C’de 48 saat inkübe edilmiştir (Şekil 3.22). 48 saat sonra petriler faj plakları (erime alanlar) yönünde değerlendirilmiştir.

48 saat sonra petriler faj plakları (erime alanlar) yönünde değerlendirilmiştir.



Şekil 3.22. Faj+patojen+besi yerinin petrilere çalkalama yöntemiyle toprak örneklerinden faj izolasyonu

Yöntem 2: 24 saatlik 10^8 hücre/ml yoğunlukta hazırlanan daha önce havuçta izole edilip tanısı yapılmış *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* süspansiyonundan 1 ml alınarak 45 °C'ye kadar ısıtılmış 12 ml KB ve NA besi yerleri ayrı ayrı petrilere dökülmüş, patojen ile besi yerinin birbirlerine karışmasını sağlamak için petrilere hafifçe çalkalanmış ve steril kabinde kurumaya bırakılmıştır. Petrilere bulunan patojen ile karıştırılmış besi yeri kuruduktan sonra faj süspansiyonunda 10 µl alınarak **nokta** şeklinde faj ekimi gerçekleştirilmiştir. Petrilere steril kabin içinde yarı açık şekilde yaklaşık 1 saat bekletilerek kurutulduktan sonra 27 °C'de 48 saat inkübe edilmiştir (Şekil 3.23). 48 saat sonra petrilere faj plakları (erime alanları) yönünde değerlendirilmiştir.



Şekil 3.23. Farklı besiyerlerinde nokta şeklinde toprak örneklerinden faj izolasyonu

3.4.2. Bakteriyofajların Saflaştırılması

İzole edilen fajların petri incelemelerinde farklı tipte plak oluşumu gözlemlenmiş ve homojen plak elde etmek için, saflaştırma işlemi 2 farklı yöntem ile gerçekleştirilmiştir.

Yöntem 1: Seyreltme yöntemi ile saflaştırma:

Fajların saflaştırma işlemi için petri kaplarında oluşan faj plağının içine steril bir kürdan batırılmış daha sonra içinde 1 ml SM Buffer bulunan ependorf tüpün içine konularak 15 dak. bekletilmiştir. Bu şekilde 10^{-6} 'a kadar seyreltilen faj süspansiyonlarından 100'er µl ile 24 saatlik NB besi yerinde geliştirilen *Pcc* izolatından 100 µl alınarak boş petrilere konulmuştur. Daha sonra 45-50 °C'ye kadar ısıtılmış KB ve NA besi yerleri ayrı ayrı petrilerdeki süspansiyon üzerine dökülerek hafifçe çalkalanarak besi yerleri ve süspansiyonların karışımı sağlanmıştır (Şekil 3.24). Steril kabinde yarı açık şekilde kurutulan petriler 48 saat boyunca 27 °C'de inkübatöre bırakılmıştır. 48 saat sonra petriler faj plakları (erime alanlar) yönünde değerlendirilmiştir.



Şekil 3.24. İzole edilen fajların SM Buffer ile seyreltme yöntemiyle saflaştırılması

Yöntem 2: Faj plakları kesme yöntemi ile saflaştırma:

Faj plağı steril bir bistüri ile kesilmiş ve her plak, içinde 24 saat önce *Pcc* izolatı geliştirilmiş NB besi yeri olan tüplere konulmuştur. 24 saat boyunca 26 °C ve 150 rpm'de orbital çalkalayıcıda çalkalanmaya bırakılmıştır (Şekil 3.25). Sadece patojen (*Pcc*) inoküle edilen tüpler pozitif kontrol olarak, faj veya patojen konulmamış içinde NB besi yeri olan tüplerde negatif kontrol olarak çalışmada kullanılmıştır. 24 ve 48 saat sonra cam tüpler oluşan şeffaflık yönünden ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Süre sonunda örnekler UV-vis spektrofotometre (Perkin Elmer, Lambda 25, USA) ile 600 nm dalga boyunda okunarak absorbans değerleri belirlenmiştir.



Şekil 3.25. Steril bistüri ile kesilen faj plaklarının, içinde patojen bulunan NB besi yerindeki aktivitesi

3.5. Deneme Deseni ve İstatistik Analizler

Tüm *in vitro* denemeleri tesadüf parselleri deneme desenine göre kurulmuş olup, patojen gelişiminin engellenme oranları % oranlarına çevrilmeden SPSS istatistik programı (SPSS Statistics 17.0) kullanılarak tek yönlü ANOVA ile varyans analizi yapılmış ve izolatlar arasındaki farklılık Tukey HSD Testi ile tespit edilmiştir ($P \leq 0.05$).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. Sörvey Çalışmaları

Sörvey çalışmaları, Hatay ilinde %58 oranla havuç yetiştiriciliğinin en fazla yapıldığı Kırıkhan ilçesine bağlı beş farklı mahallede (Çataltepe, Yalangoz, Karadurmuşlu, Topboğazı ve Soğuksu) bulunan 30 tarlada, 4 adet havuç yıkama ve paketleme evinde yürütülmüştür. Sörvey yapılan bu alanların yanı sıra Hatay ilinin Reyhanlı ve Kumlu gibi diğer ilçelerinden hasat edilip Antakya sebze halinde satışa sunulan hastalık belirtisi gösteren havuç bitkilerinden de örneklemeler yapılmıştır.

Hastalığın en yüksek yaygınlık oranı %60 ile Çataltepe mahallesinde görülürken, Karadurmuşlu mahallesinde %30 ve Yalangoz mahallesinde %20 olarak tespit edilmiştir. Soğuksu ve Topboğazı mahalleleri özellikle tarlaların drenaj problemi olmaması ve yabancı otlarla mücadele iyi mücadele edildiği bakımlı işlemlerinin olmasından kaynaklı, bakteriyel hastalıkların hem yaygınlık hem de bulunma oranı diğer mahallelere göre daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Soğuksu mahallesinde hastalığın yaygınlık oranı %10 olarak belirlenirken, Topboğazı mahallesinde bu oran %7 olarak belirlenmiştir. Hastalığın enfekteli bahçelerdeki bulunma oranı Çataltepe mahallesinde %25 olarak belirlenirken Karadurmuşlu mahallesinde %10, Yalangoz mahallesinde %5, Soğuksu mahallesinde %3 ve Topboğazı mahallesinde %2 olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.1)

Çizelge 4.1. Kırıkhan ilçesinde bulunan havuç tarlalarında bakteriyel hastalıkların yaygınlık ve yoğunluk durumu

Sörvey alanı	İncelenen tarla sayısı	Yaygınlık oranı (%)	Bulunma oranı (%)
Çataltepe	6	60	25
Karadurmuşlu	6	30	10
Yalangoz	6	20	5
Soğuksu	6	10	3
Topboğazı	6	7	2

Hatay için önemli bir gelir kaynağı olan havuç bitkisinin bakteriyel hastalıklardan yoğun bir şekilde etkilenmesi üretici için gelir kaybına sebep olmakta ve üretici havuç

yetiştiriciliğinden vazgeçerek bir sonraki üretim sezonunda farklı ürün çeşidine yönelmektedir. Örnek olarak Çataltepe mahallesinde bir tarlada yoğun bakteriyel hastalıklardan dolayı bitkiler sökülüş ve toplatılmadan tarlada bırakılmıştı. Bir sonraki üretim sezonunda aynı tarla ziyaret edildiğinde buğday ekildiği tespit edilmiştir. Sörvey sonuçları incelendiğinde genel olarak hasat öncesi dönemde havaların kurak geçmesi ve sentetik ilaçların aşırı kullanımından dolayı hastalık belirtilerinin seyrek görüldüğü, ancak hasat döneminde (Aralık-Nisan) yoğun yağışlardan dolayı özellikle taban suyu yüksek ve drenajı olmayan tarlalarda bakteriyel hastalık belirtisinin daha şiddetli görüldüğü tespit edilmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Havuç bitkilerinde bakteriyel hastalık belirtileri

4.2. Patojen Bakteri İzolasyonu

Steril kurutma kağıdında kurutulduktan sonra havuç bitkilerinin yumuşak doku ve sağlıklı dokunun birleştiği noktada steril bir bistüri ile kesilmiş, steril bir özeyle bitkiden doğrudan besi ortamına çizim gerçekleştirilmiştir. Petriler 24 ± 2 °C’de 24-48 saat süreyle inkübe edilmiştir. NGA besi yerinde şeffaf-krem renkte, kenarları krater-pürüzlü şekilli bakteri kolonileri NGA besi yerine tekrar transfer edilmiştir.

Çataltepe mahallesinde hasta bitkilerden yapılan izolasyonda saflaştırılan 80 izolattan 20’sinin, Karadurmuşlu mahallesinde saflaştırılan 50 izolattan 15’inin, Yalangoz mahallesinde saflaştırılan 45 izolattan 10’unun, Soğuksu mahallesinde saflaştırılan 28 izolattan 5’inin ve Topboğazı mahallesinde saflaştırılan 15 izolattan 5’inin patojen olduğu saptanmıştır. Ayrıca paketleme evlerinde ve Antakya sebze halinden toplanan hasta bitkilerden yapılan izolasyonda saflaştırılan 40 izolattan 10’u olmak üzere çalışma kapsamında toplam 65 adet patojen izolat elde edilmiştir. Bu

izolatlar arasından sörvey alanlarını temsil edecek şekilde seçilen 6 patojen bakteri izolatının tanısı MALDI-TOF MS ile yapılmıştır.

4.3. Patojen Bakteri İzolatlarının Tanısı

4.3.1. Bakteri izolatlarının MALDI-TOF MS Yöntemiyle Tanısı

Bakterilerin tanılanmasında moleküler yöntemlerin yanı sıra MALDI-TOF/MS mikrobiyal tanılama ve teşhis için potansiyel bir araç olarak son yıllarda kullanılmaya başlanmıştır. Bitki, gıda, çevre patojeni bakterilerin teşhisinde kullanılan MALDI-TOF MS sistemi işçilik, zaman ve işçilik maliyet açısından oldukça avantajlara sahip yeni nesil tanılama sistemi olup, mikroorganizmaları adına doğru tür teşhisi ile geleneksel ve moleküler tanı yöntemlerine eşit veya daha ileri olduğu yapılan birçok çalışmalarla doğrulanmıştır (Pavlovic ve ark., 2012; Singhal ve ark. 2015; Aktan ve Soylu 2020; Soylu ve ark., 2020; Bozkurt ve ark., 2023). Ayrıca MALDI-TOF/MS'nin ayırt edici gücü ve tanılama doğruluğunun biyokimyasal testlerden üstün olduğu kanıtlandığı bildirilmiştir (Nagy ve ark. 2009).

Tüm bu çalışmalar göz önüne alındığında, havuç yumrularında yumuşak çürüklük belirtisi gösteren dokulardan yapılan patojen izolasyonlardan elde edilip saflaştırılan 65 izolattan sörvey alanlarını temsil edecek şekilde seçilen 6 farklı bakteri izolatının (EcH4, PmH11, PaH15, PcH16, PcK24 ve PaH27 kodlu izolatlar) tanılanması MALDI-TOF MS ile yapılmıştır. MALDI-TOF protein profil analizler sonuçlarına göre; PaH15 izolatu yumuşak çürüklük ve karabacak etmeni *Pectobacterium atrosepticum* olarak tanılanırken, PcH16 ve PcK24 izolatları bakteriyel yumuşak çürüklük etmeni *Pectobacterium carotovorum* subsp *carotovorum* olarak tanılanmıştır. Morfolojik olarak farklılık gösteren EcH4, PmH11 ve PaH27 izolatlarında fırsatçı yumuşak çürüklük etmeni olarak bilinen *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas marginalis* ve *Pantoea agglomerans* olarak tanılanmıştır (Çizelge 4.2).

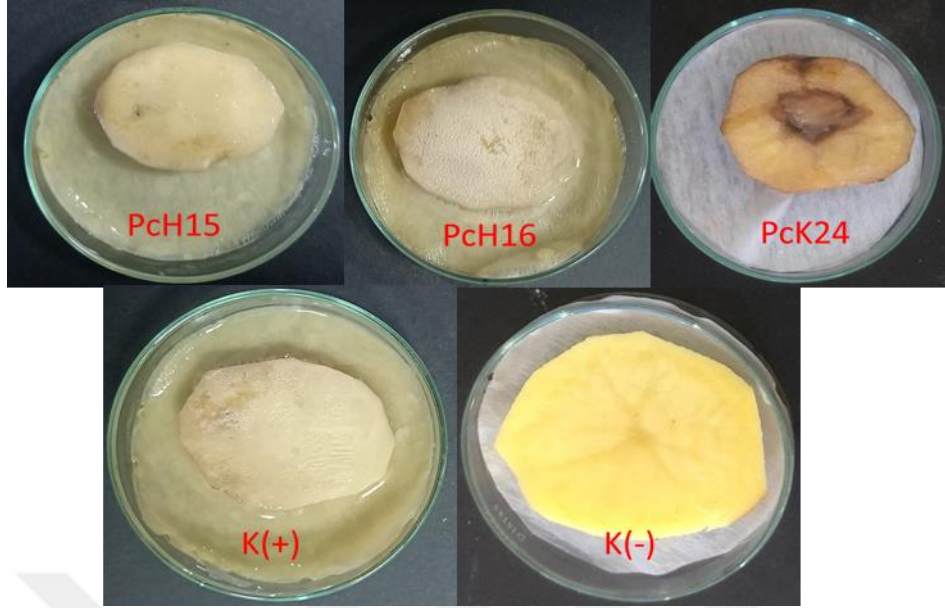
Çizelge 4.2. MALDI-TOF ile tanısı yapılan patojen izolatları ve benzerlik indeks değerleri

Bakteri türü ismi	MALDI-TOF Benzerlik İndeksi
<i>Enterobacter cloacae</i> EcH4	2.278
<i>Pseudomonas marginalis</i> PmH11	2.221
<i>Pectobacterium atrosepticum</i> PaH15	2.655
<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp <i>carotovorum</i> PcH16	2.321
<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp <i>carotovorum</i> PcK24	2.17
<i>Pantoea agglomerans</i> PaH27	2.268

Soylu ve ark. (2022) Amik ovasında havuç üretim alanlarında yaptıkları sorvey çalışmalarında bu çalışmamızı destekler nitelikte yaygın primer bakteriyel yumuşak çürüklük hastalık etmeni olarak *Pectobacterium carotovorum* subsp *carotovorum*'u belirlemişlerken, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas marginalis* ve *Pantoea agglomerans* türlerini ise sekonder öneme sahip fırsatçı yumuşak çürüklük hastalık etmeni olarak tanılamışlardır.

4.3.2. Patates Dilimleri ile Yumuşak Çürüklük Testi

Patates dilimleri ile yapılan yumuşak çürüklük testinde *Pectobacterium atrosepticum* PaH15, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* PcH16 ve PcK24 izolatları farklı şiddetlerde yumuşak çürüklük belirtilerine neden olmuşlardır (Şekil 4.2). Fırsatçı yumuşak çürüklük etmeni olan *Enterobacter cloacae* EcH4, *Pseudomonas marginalis* PmH11 ve *Pantoea agglomerans* PaH27 izolatları ise inokulasyon noktalarında hafif çürüklük belirtilerine neden olmuşlardır.

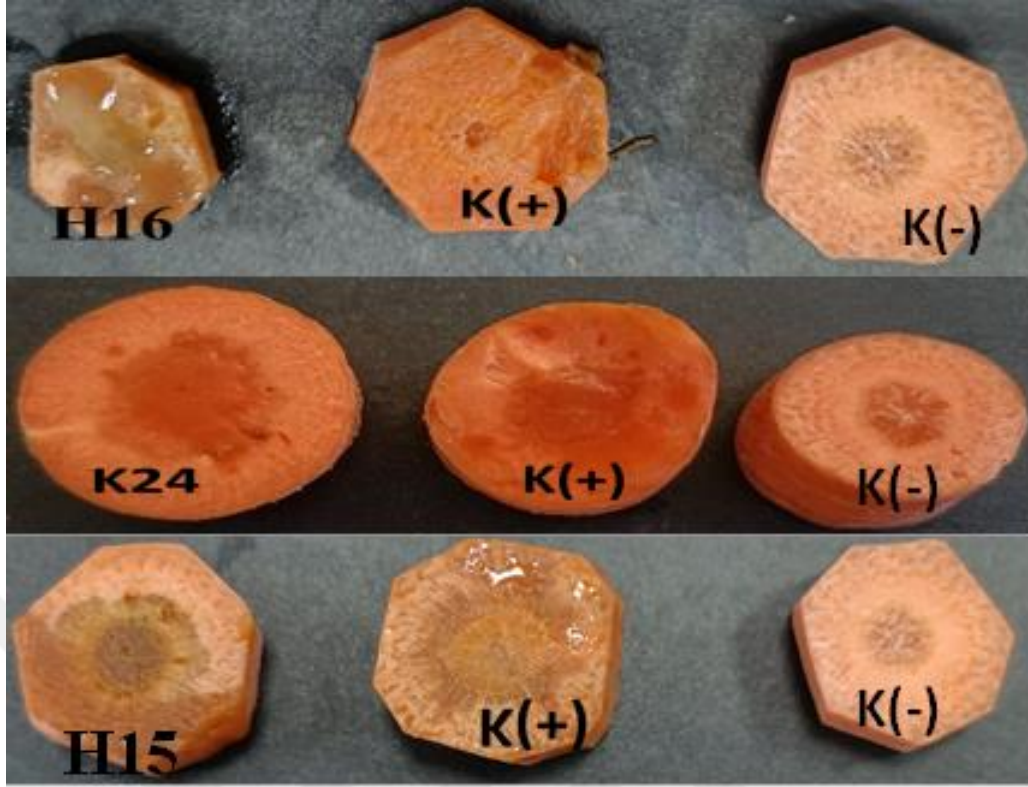


Şekil 4.2. Patates dilimleri patojenite testinde yumuşak çürüklük meydana getiren bakteri izolatları

Yapılan patates dilimi yumuşak çürüklük testi sonucunda en yoğun yumuşak çürüklük ve eksudat oluşumu *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* PcH16 izolatınının inokule edildiği patates diliminde meydana gelmişti (Şekil 4.2).

4.3.3. Havuç Dilimleri Üzerinde Patojenisite Testi

Havuç dilimleri üzerinde yapılan inokulasyonu sonucund yumuşak çürüklük belirtileri 2 gün sonra gözlemlenmiştir. Yapılan havuç dilimleri patojenist testi sonucunda *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* PcH16 izolatı *Pectobacterium atrosepticum* PaH15 ve *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* PcK24 izolatına göre daha fazla eksudat salgılanmasıyla birlikte daha yoğun bir çürüme meydana getirdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Patojen izolatların patojenite testinde havuç dilimlerinde meydana getirdiği yumuşak çürüklük. H16=Pcc, K24=Pcc, H15=Pca, K(+)= Pcc, K(-)=Distile su

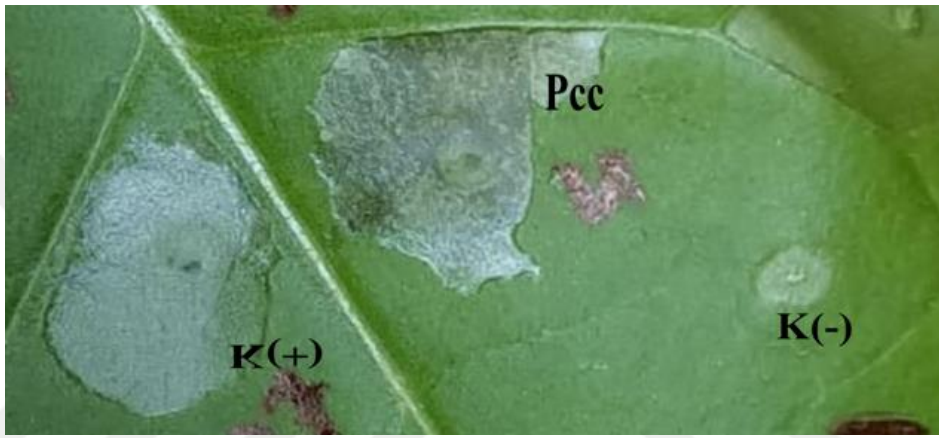
Bitki patojeni mikroorganizmaların tanı ile ilgili en önemli adımlardan biri de patojenite testleridir. Fitopatojen bakterilerin patojenisite testleri izole edildikleri konukçuyla yapıldığı gibi, alternatif konukçularla da patojenisite testler yapılabilmektedir. Son yıllarda elma kök uru etmeni *Rhizobium radiobacter* (*Agrobacterium tumefaciens*)’in patojenisitesini belirlemek için havuç dilimleri birçok çalışmada kullanılmıştır (Bozkurt ve Soylu, 2011; Geylani Yüzbaşıoğlu ve Aysan, 2021; Tekiner Aydın ve Kotan, 2022).

Bu tez çalışması kapsamında yapılan hem patates yumuşak çürüklük testinde meydana getirdiği yoğun yumuşak çürüklük hem de havuç dilimleri patojenisite testinde havuç dilimleri üzerinde diğer patojen izolatlara göre salgılamış olduğu fazla eksudat ve yoğun yumuşamadan dolayı *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* Pch16 izolatı tez çalışması kapsamında kullanılmaya karar verilmiştir. Patojenisite testinde havuç dilimlerine inokule edilen Pch16 izolatı eksudat ve yumuşak çürüklük belirtisi gösteren havuç dokularından tekrar izole edilmiş ve MALDI-TOF/MS ile tanısı

yapılmıştır. Tanılanma sonucunda *Pcc* olarak tanılanmış ve indeks değeri 2.415 olarak belirlenmiştir.

4.3.4. Tütünde Aşırı Duyarlılık Testi (HR)

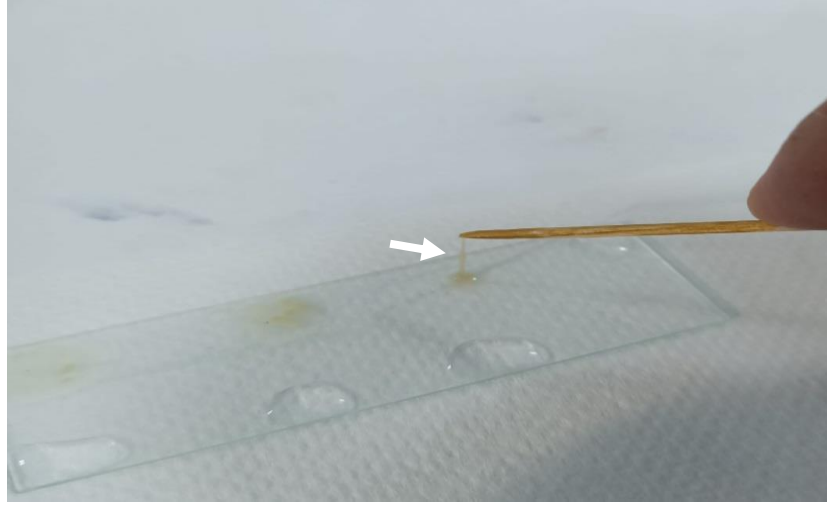
P. carotovorum subsp. *carotovorum* PcH16 izolatının 10^8 hücre/ml'lik süspansiyondan steril enjektör yardımıyla tütün yaprağının damar aralarına enjekte edilmiş, inokulasyondan 24-48 saat sonra tütün bitkisinde *Pcc* inokule edilen yerlerde çökmeler ve aşırı duyarlılık reaksiyonu gözlemlenmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Tütün HR testinde meydana gelen HR (+) ve HR negatif alanlar.

4.3.5. Potasyum Hidroksit Testi (KOH) ile Gram Reaksiyonun Belirlenmesi

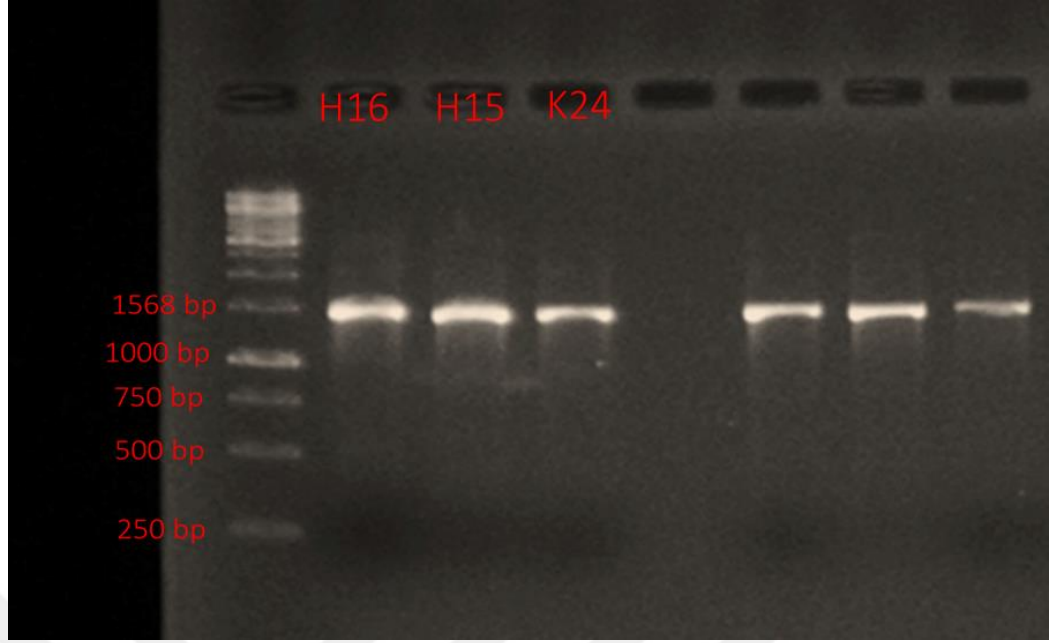
Taze hazırlanan %3'lük potasyum hidroksit solüsyonundan lam üzerine bir damla damlatıldıktan sonra 48 saatlik bakteri kültüründen steril bir kürdanla alınan bakteri, solüsyona dairesel hareketlerle karıştırılmıştır. 15-20 saniye sonra steril kürdan yukarı kaldırıldığında viskoz, yapışkanimsi bir sünmenin oluşması KOH pozitif gram negatif olarak değerlendirilmiştir. Pozitif kontrol olarak kullanılan *Bacillus subtilis*'te herhangi bir sünme meydana gelmemiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* PcH16'un Potasyum Hidroksit testi (KOH) ile Gram reaksiyonun negatif olarak belirlenmesi (ok)

4.3.6. Patojen Bakterilerin Moleküler Tanısı

Klasik tanı yöntemlerinin yanı sıra MALDI-TOF MS tanı yöntemiyle patojen olduğu belirlenen 3 farklı bakteri izolatının (*Pcc*, *Pca* ve K24) kit yardımı ile DNA izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen DNA'lar 16SrRNA genel primerler (27F ve 1492R) ile PCR çalışmalarında 1568 bp'lik bantlar elde edilmiştir (Şekil 4.6). Yapılan nükleotid sekans analiz sonuçlarına göre MALDI-TOF MS tanı yönteminde *Pectobacterium atrosepticum* olarak tespit edilen izolatta (H15) dâhil her 3 izolatın (H15,H16 ve K24) GenBankasında *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*'a ait sekanslarla eşleşmiştir.



Şekil 4.6. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* 27F, 1492R primer çifti kullanılarak yapılan moleküler tanısında agaroz jel üzerinde oluşan bantlar

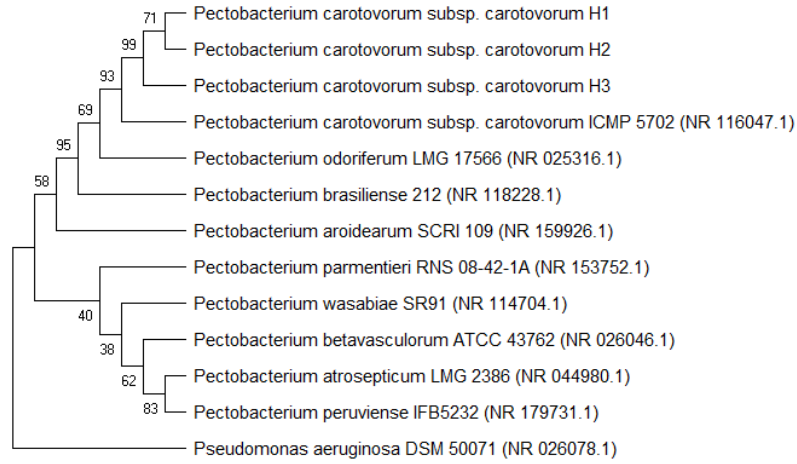
Pectobacterium carotovorum subsp. *carotovorum*'un 16SrRNA gen bölgesine ait genel primerlerden olan 27F ve 1492R primerleri kullanılarak moleküler tanısıyla ilgili birçok çalışmada benzer şekilde bantlar elde edilmiştir (Muturi ve ark., 2018; Ragavi ve ark., 2019; Lavanya ve ark., 2023).

4.3.7. Filogenetik Analizler

Elde edilen sekanslar kullanılarak NCBI BLAST analizleri yapılmış (Şekil 4.7) ve izole edilen bakterilerin GenBank' da *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* referans straini ile yüksek oranda (%98) benzerlik göstererek aynı grupta kümelenirken, kullanılan diğer *Pectobacterium* türleri kendi içlerinde *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*'dan ayrı olacak şekilde kümelenmiştir (Şekil 4.8).

Descriptions	Graphic Summary	Alignments	Taxonomy					
Sequences producing significant alignments								
Download Select columns Show 100								
select all 100 sequences selected								
GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewer								
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Acc. Len	Accession
☒ Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum strain NXN-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Pectobacterium...	1616	1616	98%	0.0	98.18%	1448	MG591823.1
☒ Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum strain APEC14-07 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Pectobacterium...	1616	1616	98%	0.0	98.08%	1432	KT222000.1
☒ Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum strain SK17 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Pectobacterium...	1616	1616	98%	0.0	98.18%	1439	KC790305.1
☒ Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum strain RY13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Pectobacterium...	1613	1613	98%	0.0	98.17%	1433	KC790291.1
☒ Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum strain RN8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Pectobacterium...	1613	1613	98%	0.0	98.17%	1440	KC790280.1
☒ Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum strain RN24 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Pectobacterium...	1609	1609	98%	0.0	98.07%	1439	KC790284.1
☒ Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum strain PN19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Pectobacterium...	1609	1609	98%	0.0	98.07%	1441	KC790263.1
☒ Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum strain RY29 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Pectobacterium...	1605	1605	97%	0.0	98.17%	1433	KC790297.1
☒ Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum strain GGH-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Pectobacterium...	1604	1604	98%	0.0	97.96%	1449	MG591822.1
☒ Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum strain GDX-5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Pectobacterium...	1602	1602	97%	0.0	98.16%	1445	MG591828.1
☒ Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum strain QHX-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Pectobacterium...	1602	1602	98%	0.0	97.96%	1447	MG591826.1

Şekil 4.7. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* türlerinin BLAST analiz sonuçları



Şekil 4.8. Neighbour-joining metodu kullanılarak farklı izolatlarının ve diğer *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* türlerinin karşılaştırılması ile oluşturulan filogenetik ağaç. dalların yanında yer alan rakamlar Bootstrap değerlerini göstermektedir

4.4. Epifit Bakterilerin İzolasyonu ve Tanısı

Bakteriyel yumuşak çürüklük etmeni ile biyolojik mücadelede kullanılan epifit bakteriler hastalığın görülmediği tarlalardan sağlıklı havuç bitkilerinin yaprak, kök ve rizosfer toprağından izole edilmiştir. İzolasyonlar sonucunda morfolojik olarak farklı olabileceği düşünülen kök ve yapraktan 144 ve rizosfer toprağından 52 adet olmak üzere toplam 196 epifit bakteri izolatu saflaştırılmıştır. Saflaştırılan bakteri izolatları ikili

kültür testine tabi tutulmuş, test sonucunda *Pcc*'ye karşı antagonistik etki gösteren 7'si yaprak, 11'i kök ve 21'i rizosfer toprağından olmak üzere toplam 39 aday antagonist bakteri izolatlarının MALD-TOF ile tanıları yapılmıştır.

MALDI-TOF tanı sonuçlarına göre cins düzeyinde ilk sırayı 24 izolat ile *Bacillus* alırken bunu sırası ile *Enterobacter* (8 izolat), *Pseudomonas* (5 izolat), *Pantoea* (1 izolat) ve *Stenotrophomonas* (1 izolat) izlemiştir.

4.5. Aday Epifit Bakteriler ile Tütünde Aşırı Duyarlılık Testi (HR)

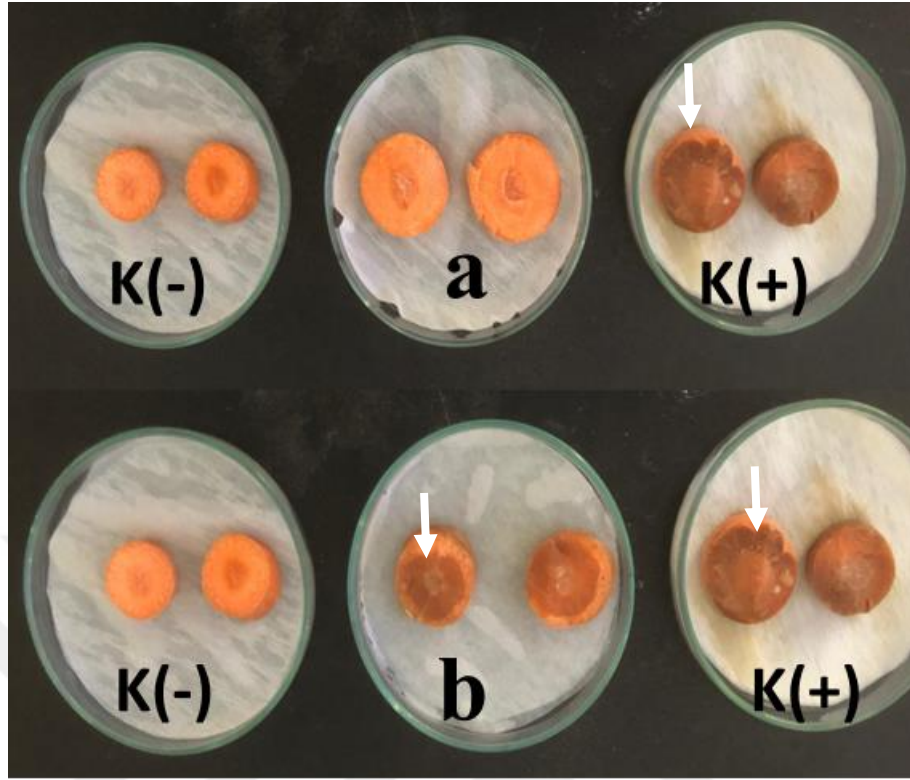
Tütün yapraklarında aşırı duyarlılık tepkimesinin belirlenmesi testinde pozitif kontrolle birlikte 9 adet izolatta tipik HR belirtileri meydana gelirken negatif kontrol ve 30 adet antagonist adayı izolatlarda inokule edildiğı alanlarda herhangi bir belirti meydana gelmemiştir (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. Tütün aşırı duyarlılık testinde (HR) epifit bakterilerin inokule edildiğı alanlarda HR (-) ve HR(+) alanlar (ok)

4.6. Aday Epifit Bakterilerin Havuç Dilimleri ile Yumuşak Çürüklük Testi

Aday epifit bakterilerin havuç dilimleri ile yumuşak çürüklük testinde havuç dilimlerine epifit bakterilerin inokulasyondan 2 gün sonra değerlendirme yapılmıştır. İnokulasyon noktasında meydana gelen yumuşama pozitif olarak kabul edilmiştir. Test sonucunda *Pcc* inokule edilen pozitif kontrol ile birlikte 11 aday epifit izolatu yumuşama meydana getirirken, 28 antagonist adayı epifit bakterilerin inokule edildiğı alanlarda ve negatif kontrol uygulamasında yumuşama meydana gelmemiştir (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. Havuç yumuşak çürüklük testinde yumuşak çürüklük meydana getirmeyen (a) ve getiren (b) epifit bakteri izolatları (ok)

4.7. Aday Antagonist Bakteri İzolatlarının Potasyum Hidroksit Testi (KOH) ile Gram Reaksiyonun Belirlenmesi

Taze hazırlanan %3'lük Potasyum Hidroksit solüsyonundan lam üzerine bir damla damlatıldıktan sonra 48 saatlik bakteri kültüründen steril bir kürdanla alınan bakteri, solüsyona dairesel hareketlerle karıştırılmıştır. 15-20 saniye sonra steril kürdan yukarı kaldırıldığında viskoz, yapışkanimsi bir sünmenin oluşması KOH pozitif gram negatif olarak değerlendirilmiştir. Pozitif kontrol olarak kullanılan *Bacillus subtilis*'te herhangi bir sünme meydana gelmemiştir (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. KOH testinde sünme gösteren (ok) ve Gram negatif olarak kabul edilen izolat

4.8. Aday Epifit Bakterilerin *In vitro* Biyokontrol Etkinin Belirlenmesine Yönelik Çalışmalar

4.8.1. Antagonistik Etkinin Belirlenmesi

Antibiyosis testleri sonucunda 7'si yaprak, 11'i kök ve 21'i rizosfer toprağından olmak üzere toplam 39 aday antagonist bakteri patojen gelişimini farklı oranlarda engellemiştir. Antibiyosis testlerinde etkili bulunan epifit bakteri izolatlarının izole edildiğı bitki kısmı, MALDI-TOF sonuçları ve gram özellikleri Çizelge 4.3'te verilmiştir.

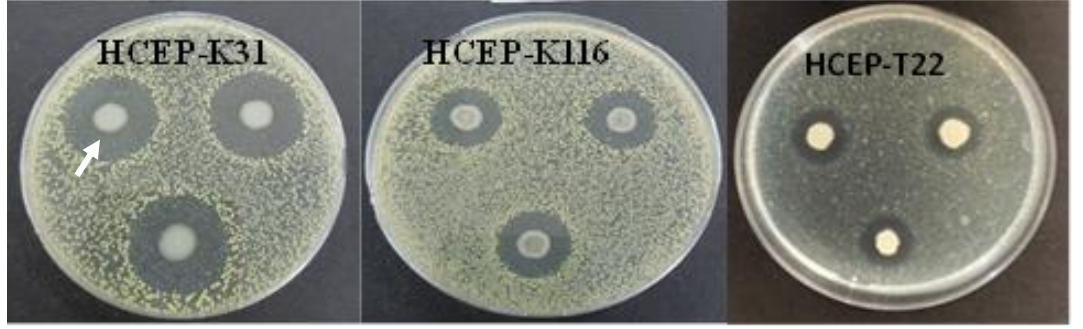
Çizelge 4.3. Antibiyosis testinde etkili bulunan epifit bakterilerin genel özellikleri ve tanı sonuçları

İzolat	İzole edildiği kısım	Gram Reaksiyonu	MALDİTOF Ben. indeksi
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> HCEP-Y42	Yaprak	+	2.091
<i>Bacillus subtilis</i> HCEP-Y43	Yaprak	+	1.828
<i>Bacillus sp</i> HCEP-Y44	Yaprak	+	1.607
<i>Bacillus cereus</i> HCEP-Y45	Yaprak	+	2.291
<i>Bacillus cereus</i> HCEP-Y46	Yaprak	+	2.221
<i>Bacillus cereus</i> HCEP-Y48	Yaprak	+	1.976
<i>Bacillus cereus</i> HCEP-Y49	Yaprak	+	1.807
<i>Enterobacter bugandensis</i> HCEP-K21	Kök	-	2.109
<i>Enterobacter cloacae</i> HCEP-K26	Kök	-	2.074
<i>Enterobacter cloacae</i> HCEP-K28	Kök	-	2.248
<i>Pantoea dispersa</i> HCEP-K31	Kök	-	1.600
<i>Enterobacter cloacae</i> HCEP-K71	Kök	-	1.870
<i>Enterobacter bugandensis</i> HCEP-K72	Kök	-	2.066
<i>Enterobacter kobei</i> HCEP-K74	Kök	-	2.016
<i>Enterobacter cloacae</i> HCEP-K75	Kök	-	2.113
<i>Pseudomonas brassicacearum</i> HCEP-K116	Kök	-	1.946
<i>Pseudomonas thivervalensis</i> HCEP-K117	Kök	-	1.974
<i>Pseudomonas thivervalensis</i> HCEP-K213	Kök	-	1.823
<i>Bacillus. sp</i> HCEP-T13	Toprak		1.711
<i>Bacillus subtilis</i> HCEP-T14	Toprak	+	1.984
<i>Bacillus subtilis</i> HCEP-T16	Toprak	+	2.083
<i>Bacillus megaterium</i> HCEP-T22	Toprak	+	2.017
<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> HCEP-T23	Toprak	+	2.105
<i>Bacillus megaterium</i> HCEP-T25	Toprak	+	2.177
<i>Bacillus megaterium</i> HCEP-T27	Toprak	+	2.118
<i>Bacillus drementensis</i> HCEP-T28	Toprak	+	1.677
<i>Bacillus koreensis</i> HCEP-T31	Toprak	-	2.178
<i>Bacillus subtilis</i> HCEP-T33	Toprak	+	1.747
<i>Bacillus mojavensis</i> HCEP-T34	Toprak	+	2.050
<i>Pseudomonas thivervalensis</i> HCEP-T49	Toprak	-	1.758
<i>Bacillus subtilis</i> HCEP-T61	Toprak	+	2.230
<i>Bacillus megaterium</i> HCEP-T62	Toprak	+	1.700
<i>Bacillus safensis</i> HCEP-T63	Toprak	+	1.640
<i>Pseudomonas umsongensis</i> HCEP-T64	Toprak	-	1.853
<i>Bacillus safensis</i> HCEP-T65	Toprak	+	1.701
<i>Bacillus megaterium</i> HCEP-T66	Toprak	+	2.140
<i>Bacillus subtilis</i> HCEP-T410	Toprak	+	1.645
<i>Bacillus cereus</i> HCEP-T461	Toprak	+	2.091
<i>Bacillus cereus</i> HCEP-T462	Toprak	+	2.088

* Bacillus, **Enterobacter, ***Pseudomonas, ****Pantoea, ***** Stenotrophomonas

Antagonistik etkinin belirlendiği antibiyosis testleri ikili karşılaştırma yöntemi ile yapılmıştır. Antagonist adayı epifit bakteriler besi yerine nokta ekimi yapıldıktan 24 saatlik inkübasyondan sonra petrilere patojen bakteri pülverize edilmiş ve inkübasyona

bırakılmıştır. İki günlük inkübasyon sürecinden sonra antagonist adayı bakterilerin patojen bakteri gelişimini engelleme oranları indeks değerlerine göre yapılmıştır (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. Antagistik etkinin belirlenmesi testlerinde aday antagonist epifit bakteri izolatlarının patojen gelişimini engellemesi sonucu oluşan engelleme bölgeleri (ok)

Aday epifit bakteri izolatları ile yapılan antibiyosis testi sonucu oluşan engelleme zonlarının çapının bakteri kolonisinin çapına bölünmesi ile indeks değerleri hesaplanmıştır. Antibiyosis testinde en yüksek antagonistik etkinlik (indeks değeri olarak) *Pantoea dispersa* HCEP-K31 (5.81) izolatında belirlenirken bunu sırasıyla *Pseudomonas brassicacearum* HCEP-K116 (5.23) ve *Bacillus megaterium* HCEP-T22 (3.79) izolatları izlemiştir (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. Aday epifit bakteri izolatların patojen bakteriye karşı *in vitro* antagonistik etkileri

Bakteri Tür İsimleri	İndeks değeri	Bakteri Tür İsimleri	İndeks değeri
<i>P. dispersa</i> *** HCEP-K31	5.81 ^j	<i>B. drentensis</i> HCEP-T28	2.00 ^{b-g}
<i>P. brassicacearum</i> **** HCEP-K116	5.23 ^j	<i>B. cereus</i> HCEP-T462	1.97 ^{b-g}
<i>B. megaterium</i> HCEP-T22	3.79 ⁱ	<i>B. subtilis</i> HCEP-Y43	1.93 ^{b-g}
<i>B. megaterium</i> HCEP-T27	3.28 ^{hi}	<i>B. cereus</i> HCEP-T461	1.92 ^{b-g}
<i>B. megaterium</i> HCEP-T62	3.28 ^{hi}	<i>B. subtilis</i> HCEP-T33	1.92 ^{b-g}
<i>P. koreensis</i> HCEP-T31	3.00 ^{ghi}	<i>B. mojavensis</i> HCEP-T34	1.87 ^{b-f}
<i>B. safensis</i> HCEP-T63	2.88 ^{f-i}	<i>E. cloacae</i> HCEP-K71	1.77 ^{b-e}
<i>E. cloacae</i> HCEP-K28	2.87 ^{e,i}	<i>E. kobei</i> HCEP-K74	1.69 ^{bcd}
<i>P. umsongensis</i> HCEP-T64	2.83 ^{e-i}	<i>E. bugandensis</i> ** HCEP-K21	1.68 ^{bcd}
<i>B. cereus</i> HCEP-Y46	2.81 ^{e,i}	<i>P. thivervalensis</i> HCEP-K213	1.59 ^{bc}
<i>B. safensis</i> HCEP-T65	2.76 ^{d-i}	<i>Bacillus. sp</i> HCEP-T13	1.58 ^{bc}
<i>E. cloacae</i> HCEP-K75	2.53 ^{c-h}	<i>B. subtilis</i> HCEP-T16	1.58 ^{bc}
<i>B. megaterium</i> HCEP-T66	2.52 ^{c-h}	<i>E. bugandensis</i> HCEP-K72	1.56 ^{bc}
<i>B. subtilis</i> HCEP-T410	2.22 ^{c-h}	<i>B. subtilis</i> HCEP-T14	1.33 ^b
<i>P. thivervalensis</i> HCEP-T49	2.13 ^{b-g}	<i>B. megaterium</i> HCEP-T25	1.30 ^b
<i>B. cereus</i> HCEP-Y49	2.13 ^{b-g}	<i>B. subtilis</i> HCEP-T61	1.26 ^b
<i>B. amyloliquefaciens</i> * HCEP-Y42	2.12 ^{b-g}	<i>Bacillus. sp</i> HCEP-Y44	1.22 ^b
<i>E. cloacae</i> HCEP-K26	2.04 ^{b-g}	<i>S. rhizophila</i> ***** HCEP-T23	1.16 ^b
<i>B. cereus</i> HCEP-Y45	2.00 ^{b-g}	<i>P. thivervalensis</i> HCEP-K117	000 ^a
<i>B. cereus</i> HCEP-Y48	2.00 ^{b-g}		

Bacillus*, *Enterobacter*, ****Pseudomonas*, *****Pantoea*, ******Stenotrophomonas*

Antagonistik etkinin belirlenmesi çalışmalarına bakıldığında genellikle *Bacillus* ve *Pseudomonas* cinsleri etki olurken, en etkili izolatın *Pantoea dispersa* olduğu tespit edilmiştir. *P. dispersa* birçok çalışmada biyokontrol ajan olarak kullanılmıştır. *P. dispersa*, *Fusarium udum*'a karşı biyolojik mücadele ajanı olarak kullanıldığı bir çalışmada *in vitro* denemelerinde *F. udum*'un büyümesini engellerken, saksı ve tarla denemelerinde kimyasal bir fungusit olan Bavistin ve antifungal bicontrol ajanı Trichoderma Monitor WP ile karşılaştırmalı denemelerde her iki preparata göre daha etkili olduğu saptanmıştır. Tohumların *P. dispersa* ile muamelesindeki tarla denemesinde. solgunluk insidansını %47 azaltırken, bu oran Bavistin'de %41 ve Trichoderma Monitor WP'de %36 olarak tespit edilmiştir (Maisuria ve ark., 2008). Zhang ve Birch (2003) yaptıkları çalışmada *P. dispersa*'nın hızlı büyüme ve ortamı asitleştirme yeteneği sayesinde şeker kamışı yaprak yanıklığı etmeni *Xanthomonas albilineans*'a karşı rekabet gücünün yüksek olduğunu saptamışlardır. Nejad-Aghdam ve ark., (2024) patates tarlasında baskın bir yabancı ot olan *Convolvulus arvensis* L. (Tarla sarmaşığı)'den izole ettikleri *Pantoea* spp. izolatı *Pcc*'ye *in vivo* uygulamasında yumru

çürümesini %58.5 oranında azalttığı, depo koşullarında hastalık insidansını %56.7 oranında azalttığı ve %52 oranında da tedavi edici olduğu tespit edilmiştir.

Pseudomonas brassicacearum ilk defa arabidopsis ve kanola bitkilerinin rizosferinden izole edilmiştir (Achouak ve ark., 2000). *Pseudomonas brassicacearum*'un *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum* ve *Phytophthora capsici* gibi önemli fungal patojenlere antifungal etki göstererek *in vitro* koşullarda fungus gelişimini inhibe ettiği saptanmıştır (Chung ve ark., 2008). *Pseudomonas brassicacearum* maydanoz yaprak leke hastalığı etmeni *P. syringae* pv. *apii*'ye karşı biyolojik mücadele ajanı olarak kullanıldığı çalışmada antibiyosis testinde 4.17 indeks değeri ile en etkili izolatlar içerisinde yer almış ve saksı denemesinde %56 oranında hastalığı engellediği saptanmıştır (Varhan ve Bozkurt 2021). Zhou ve ark., (2012) yaptıkları çalışmada *Pseudomonas brassicacearum* J12 izolatının domateslerde bakteriyel solgunluk etmeni *Ralstonia solanacearum*'un gelişimini etkili bir şekilde inhibe ettiği (30 °C'de 24.7 mm) ve sera denemelerinde hastalık gelişimini %45 oranında baskıladığı saptamışlardır.

Bir diğer etkili izolat olan *Bacillus* ise birçok fungal ve bakteriyel bitki patojenine karşı etkili olup biyolojik mücadele çalışmalarında yaygın olarak kullanılan bir bakteri türüdür (Krzyzanowska ve ark., 2012; Campos ve ark., 2010; Schwartz ve ark., 2013).

4.8.2. Epifit Bakteri İzolatlarının Indol Asetik Asit (IAA) Üretme Potansiyelinin Belirlenmesi

Bitkilerin sağlıklı ve düzenli büyümeleri için ışık, su, mineral, besin maddeleri, CO₂ ve O₂' yi düzenli almalarının yanı sıra bir takım iç faktörlerin meydana gelmesi gerekir. Bitkilerin büyüme ve gelişmeyi düzenleyen en önemli iç faktörlerden bir tanesi de hormonlardır. Bu hormonların en bilineni de IAA. IAA bitkide kök gelişimi, kök yüzey alanının genişlemesi, bitki besin elementlerin bitkiye alınması, hücre bölünmesi gibi birçok etkinliği bulunmaktadır (İmriz ve ark., 2014). Yapılan birçok çalışmada farklı türlere ait PGPR izolatları IAA ürettiği ve bu sayede dolaylı olarak hastalıklara mücadelede önemli rol oynadığı belirlenmiştir (Samuel ve Muthukkaruppan, 2011; İmriz ve ark., 2014).

Aday antagonist bakteri izolatlarının IAA üretme potansiyelleri L-tryptophane içeren LB besi yerinde belirlenmiştir. Elde edilen absorbans değerleri bilinen IAA

çözeltisi ile hazırlanan IAA konsantrasyon standart eğrisiyle karşılaştırılmak suretiyle bakteri izolatlarının IAA üretim miktarları µg/ml olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5. Epifit bakteri izolatlarının IAA üretim miktarları (µg/ml)

Bakteri Tür İsimleri	µg/ml	Bakteri Tür İsimleri	µg/ml
<i>E. cloacae</i> HCEP-K71	87.40 ^c	<i>B. subtilis</i> HCEP-Y43	61.22 ^{bc}
<i>B. subtilis</i> HCEP-T14	79.30 ^{bc}	<i>E. cloacae</i> HCEP-K26	61.15 ^{bc}
<i>B. cereus</i> HCEP-T462	75.00 ^{bc}	<i>B. mojavensis</i> HCEP-T34	60.10 ^{bc}
<i>P. thivervalensis</i> HCEP-K213	72.06 ^{bc}	<i>B. subtilis</i> HCEP-T61	59.90 ^{bc0}
<i>B. megaterium</i> HCEP-T27	71.30 ^{bc}	<i>B. drentensis</i> HCEP-T28	59.44 ^{bc}
<i>P. thivervalensis</i> HCEP-T49	68.70 ^{bc}	<i>B. cereus</i> HCEP-T461	59.02 ^{bc}
<i>P. umsongensis</i> HCEP-T64	67.20 ^{bc}	<i>B. subtilis</i> HCEP-T33	58.9 ^b
<i>P. brassicacearum</i> **** HCEP-K116	66.9 ^{bc}	<i>B. amyloliquefaciens</i> * HCEP-Y42	58.8 ^{bc}
<i>B. megaterium</i> HCEP-T62	65.44 ^{bc}	<i>E. kobei</i> HCEP-K74	58.46 ^{bc}
<i>B. megaterium</i> HCEP-T25	64.80 ^{bc}	<i>S. rhizophila</i> ***** HCEP-T23	58.00 ^{bc}
<i>E. bugandensis</i> * HCEP-K21	64.70 ^{bc}	<i>B. subtilis</i> HCEP-T16	57.70 ^{bc}
<i>B. megaterium</i> HCEP-T66	64.00 ^{bc}	<i>Bacillus. sp</i> HCEP-T13	57.14 ^{bc}
<i>B. safensis</i> HCEP-T63	63.27 ^{bc}	<i>E. bugandensis</i> HCEP-K72	56.7 ^{bc}
<i>P. dispersa</i> *** HCEP-K31	62.8 ^{bc}	<i>E. cloacae</i> HCEP-K75	56.04 ^{bc}
<i>P. koreensis</i> HCEP-T31	62.56 ^{bc}	<i>B. cereus</i> HCEP-Y45	52.0 ^{bc}
<i>P. thivervalensis</i> HCEP-K117	62.11 ^{bc}	<i>B. megaterium</i> HCEP-T22	51.45 ^{bc}
<i>E. cloacae</i> HCEP-K28	61.91 ^{bc}	<i>B. cereus</i> HCEP-Y48	45.83 ^b
<i>B. cereus</i> HCEP-Y49	61.73 ^{bc}	<i>B. cereus</i> HCEP-Y46	44.80 ^b
<i>B. subtilis</i> HCEP-T410	61.7 ^{bc}	<i>Bacillus. sp</i> HCEP-Y44	43.35 ^b
<i>B. safensis</i> HCEP-T65	61.35 ^{bc}	Kontrol	0,00 ^a

*Bacillus, **Enterobacter, ***Pseudomonas, ****Pantoea, *****Stenotrophomonas

Aday antagonist bakteri izolatları içerisinde en yüksek IAA üretimi *E. cloacea* HCEP-K71 (87.40 µg/ml) ve *Bacillus subtilis* HCEP-T14 (79.30 µg/ml) izolatları tarafından üretilmiştir (Çizelge 4.5 ve Şekil 4.13).

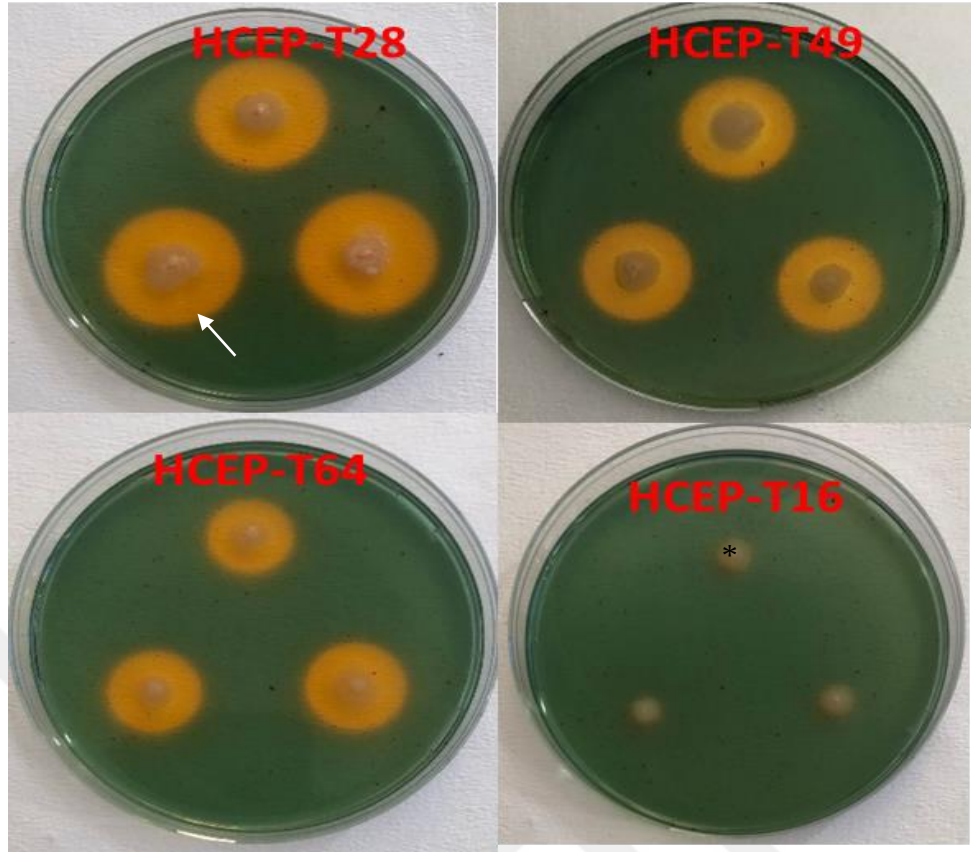


Şekil 4.13. L-tryptophan içeren LB besi yeri içerisinde IAA üretimine bağlı olarak meydana gelen renk değişimleri

Rizosfer (kök ve kök çevresi) bölgesi mikrobiyal aktivitenin en yoğun olduğu bölgelerden biridir. Bitki büyümesini teşvik eden rizobakterlerin en önemli yeteneklerden biride rizosfer veya kök dokusunda fitohormon sentezlemeleridir. Yapılan birçok çalışmada çeşitli bitkilerin kök ve kök bölgesinde izole edilen *Enterobacter* spp. ve *Bacillus* spp. izolatlarının IAA sentezlediği tespit edilmiştir (de Santi Ferrara ve ark., 2012; Ahmed ve ark., 2016; Ullah ve ark., 2017; Aktan ve Soylu, 2020).Yapılan bu tez çalışmasında da en yüksek IAA değeri *Enterobacter* ve *Bacillus* türlerinde saptanması yapılan önceki çalışmalarla paralellik göstermiştir.

4.8.3.Epifit Bakteri İzolatlarının Siderofor Üretimlerinin Belirlenmesi

Sidereför oluşumunun belirlenmesinde Chrome azurol S içerikli Blue CAS agar kullanılmıştır. CAS agar ortamına nokta ekim yapılan bakteri kolonilerinin etrafında oluşan sarı veya turuncu alanlar sidereför pozitif olarak kabul edilmiştir (Şekil 4.14). Bakteri kolonileri etrafında oluşan sarı ve turuncu alanların koloni çapına bölünmesi ile indeks (S-İndeks) değerleri hesaplanmıştır.



Şekil 4.14. Epifit bakterilerin CAS agar ortamında siderofor üretmeleri sonucu oluşan sarı-turuncu alanlar(ok) ve siderofor üretmeyen izolatlar (*)

Aday antagonist bakteri izolatlarında en yüksek siderofor üretimi *Bacillus. drentensis* HCEP-T28 (2.86) izolatında belirlenirken bunu *Pseudomonas thivervalensis* HCEP-T49 (2.84) ve *Pseudomonas umsongensis* HCEP-T64 (2.79) izolatları izlemiştir. Test edilen 7 izolatta siderofor üretimi gözlemlenmemiştir (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6. Epifit bakteri türlerinin *in vitro* siderofor üretimi indeks değerleri

Bakteri Tür İsimleri	İndeks değeri	Bakteri Tür İsimleri	İndeks değeri
<i>B. drementensis</i> HCEP-T28	2.86 ^j	<i>B. cereus</i> HCEP-Y49	1.61 ^{b-g}
<i>P. thivervalensis</i> HCEP-T49	2.84 ^j	<i>B. megaterium</i> HCEP-T62	1.60 ^{b-f}
<i>P. umsongensis</i> HCEP-T64	2.79 ^j	<i>B. cereus</i> HCEP-Y46	1.58 ^{b-f}
<i>P. brassicacearum</i> **** HCEP-K116	2.62 ^j	<i>B. subtilis</i> HCEP-Y43	1.55 ^{b-e}
<i>E. cloacae</i> HCEP-K28	2.19 ⁱ	<i>B. cereus</i> HCEP-Y45	1.55 ^{b-e}
<i>B. cereus</i> HCEP-Y48	2.13 ^{hi}	<i>E. bugandensis</i> HCEP-K72	1.48 ^{bcd}
<i>B. subtilis</i> HCEP-T61	2.10 ^{hi}	<i>P. koreensis</i> HCEP-T31	1.44 ^{bcd}
<i>E. cloacae</i> HCEP-K75	2.08 ^{ghi}	<i>B. megaterium</i> HCEP-T27	1.43 ^{bcd}
<i>B. cereus</i> HCEP-T462	2.06 ^{f-i}	<i>E. bugandensis</i> ** HCEP-K21	1.40 ^{bcd}
<i>B. mojavensis</i> HCEP-T34	2.00 ^{e-i}	<i>E. cloacae</i> HCEP-K26	1.34 ^{bc}
<i>B. amyloliquefaciens</i> * HCEP-Y42	1.86 ^{d-i}	<i>B. subtilis</i> HCEP-T410	1.34 ^{bc}
<i>B. cereus</i> HCEP-T461	1.86 ^{d-i}	<i>Bacillus. sp</i> HCEP-Y44	1.29 ^b
<i>E. cloacae</i> HCEP-K71	1.84 ^{d-i}	<i>Bacillus. sp</i> HCEP-T13	0.00 ^a
<i>S. rhizophila</i> **** HCEP-T23	1.80 ^{c-i}	<i>B. subtilis</i> HCEP-T16	0.00 ^a
<i>P. dispersa</i> *** HCEP-K31	1.79 ^{c-i}	<i>B. megaterium</i> HCEP-T22	0.00 ^a
<i>E. kobei</i> HCEP-K74	1.78 ^{c-i}	<i>B. subtilis</i> HCEP-T33	0.00 ^a
<i>P. thivervalensis</i> HCEP-K117	1.75 ^{b-i}	<i>B. safensis</i> HCEP-T63	0.00 ^a
<i>P. thivervalensis</i> HCEP-K213	1.71 ^{b-h}	<i>B. safensis</i> HCEP-T65	0.00 ^a
<i>B. subtilis</i> HCEP-T14	1.69 ^{b-h}	<i>B. megaterium</i> HCEP-T66	0.00 ^a
<i>B. megaterium</i> HCEP-T25	1.67 ^{b-h}		

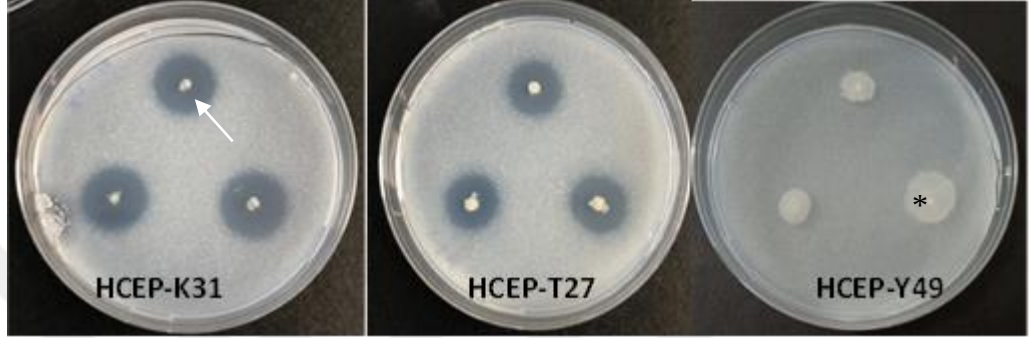
Bacillus*, *Enterobacter*, ****Pseudomonas*, *****Pantoea*, ******Stenotrophomonas*

Düşük molekül ağırlıklı bir element olan siderefor özellikle demirin sınırlı olduğu alanlarda birçok mikroorganizma ve bitki tarafından üretilmektedir (Schwyn and Neilands, 1987). Bitkiler tarafından üretilen en yaygın fitosiderefor mugineic asit olup özellikle arpa ve buğday gibi Graminea familyasındaki bitkiler demirin yetersiz olduğu durumlarda, çözölemeyen demiri kullanabilmek için fitosiderefor üretebilmektedirler. Mikrobiyal sidereforlar hem bakteriler (ferrioxamine B) hem de funguslar (ferrichrome) tarafından üretilen hydroxamate, yalnız bakteriler tarafından üretilen caecholate (enterobactin), carboxylate (rhizobactin) ve pyoverdine olmak üzere dört farklı gruba ayrılmaktadırlar (Ahmed ve Holmström, 2014).

Mikroorganizmalar tarafından üretilen sidereforlar bitkilerin demir alımını arttırarak bitki gelişimini teşvik ettiği için dolaylı olarak veya antimikrobiyal özelliklerinden dolayı ise doğrudan hastalıklarla mücadelede etkili olabilmektedir. Ayrıca demirin az olduğu alanlarda antagonist bakterilerin siderefor üretimi ile patojen mikroorganizmalar ile rekabete girmesi, doğrudan patojeni engellemese de dolaylı olarak patojen popülasyonunun azalmasına neden olabilmektedir.

4.8.4. Epifit Bakteri İzolatlarının Fosfor Çözme Potansiyellerinin Belirlenmesi

Epifit bakteri izolatlarının fosfor çözme potansiyelleri Pikovskaya Agar (PVK) besi yerinde belirlenmiştir. Nokta ekimi yapılan bakteri kolonileri etrafında fosfatın çözülmesine bağlı olarak oluşan şeffaf alanlar pozitif olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. Epifit bakterilerin PVK ortamında fosfor çözünürlüğü sonucu oluşturduğu şeffaf alanlar (ok) ve fosfor çözünürlük etkisi göstermeyen izolatlar (*)

Epifit bakteri izolatların fosfor çözünürlük testinde en yüksek fosfat çözünürlüğü *Pantoea dispersa* HCEP-K31 (5.39) izolatında gerçekleşirken bunu *Bacillus megaterium* HCEP-T27 (2.94) nolu izolat izlemiştir. Test edilen 19 izolatta ise fosfat çözünürlüğü gözlenmemiştir (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.7. Epifit bakteri izolatlarının fosfor çözünürlüğüne bağlı olarak elde edilen F- indeks değerleri

Bakteri Tür İsimleri	İndeks değeri	Bakteri Tür İsimleri	İndeks değeri
<i>P. dispersa</i> **** HCEP-K31	5.39 ^f	<i>B.amyloliquefaciens</i> * HCEP-Y42	0.00
<i>B. megaterium</i> HCEP-T27	2.94 ^e	<i>B. subtilis</i> HCEP-Y43	0.00
<i>P. koreensis</i> HCEP-T31	2.27 ^d	<i>B. cereus</i> HCEP-Y45	0.00
<i>P.brassicacearum</i> **** HCEP-K116	2.02 ^d	<i>B. subtilis</i> HCEP-T14	0.00
<i>Bacillus. sp</i> HCEP-T13	1.44 ^c	<i>B. subtilis</i> HCEP-T16	0.00
<i>P. umsongensis</i> HCEP-T64	1.47 ^c	<i>B. megaterium</i> HCEP-T22	0.00
<i>E. bugandensis</i> HCEP-K72	1.46 ^c	<i>S. rhizophila</i> ***** HCEP-T23	0.00
<i>E. kobei</i> HCEP-K74	1.42 ^{bc}	<i>B. megaterium</i> HCEP-T25	0.00
<i>B. cereus</i> HCEP-Y48	1.39 ^{bc}	<i>B. drentensis</i> HCEP-T28	0.00
<i>E. cloacae</i> HCEP-K71	1.37 ^{bc}	<i>B. subtilis</i> HCEP-T33	0.00
<i>E. cloacae</i> HCEP-K28	1.36 ^{bc}	<i>B. mojavensis</i> HCEP-T34	0.00
<i>P. thivervalensis</i> HCEP-K117	1.33 ^{bc}	<i>P. thivervalensis</i> HCEP-T49	0.00
<i>P. thivervalensis</i> HCEP-K213	1.32 ^{bc}	<i>B. subtilis</i> HCEP-T61	0.00
<i>E. cloacae</i> HCEP-K26	1.29 ^{bc}	<i>B. safensis</i> HCEP-T63	0.00
<i>E. cloacae</i> HCEP-K75	1.26 ^{bc}	<i>B. safensis</i> HCEP-T65	0.00
<i>B. cereus</i> HCEP-Y49	1.24 ^{bc}	<i>B. megaterium</i> HCEP-T66	0.00
<i>B. megaterium</i> HCEP-T62	1.17 ^{bc}	<i>B. subtilis</i> HCEP-T410	0.00
<i>Bacillus. sp</i> HCEP-Y44	1.12 ^{bc}	<i>B. cereus</i> HCEP-T461	0.00
<i>E. bugandensis</i> ** HCEP-K21	1.12 ^{bc}	<i>B. cereus</i> HCEP-T462	0.00
<i>B. cereus</i> HCEP-Y46	0.83 ^b		

Bacillus*, *Enterobacter*, ****Pseudomonas*, *****Pantoea*, ******Stenotrophomonas*

Bitkilerin sağlıklı bir şekilde büyüüp gelişmesi için gerekli olan major elementlerden bir tanesi de fosfordur. Toprağa karışan fosfor kısa zamanda toprak parçacıklarının temas yüzeyleri ile reaksiyona girerek daha az çözünür ve daha az yararlı bileşikler haline dönüşür (Karaman, 2012). Topraktaki çözünebilir fosfor konsantrasyonu 1 ppm veya daha az orandadır (Özyılmaz ve Benlioğlu, 2012). Toprakta bitki kökleriyle simbiyotik olarak yaşayan antagonist bakteriler, çözünemez durumundaki bu fosfor bileşiklerini çözerek bitkilerin yararlanabilecek forma dönüştürürler.

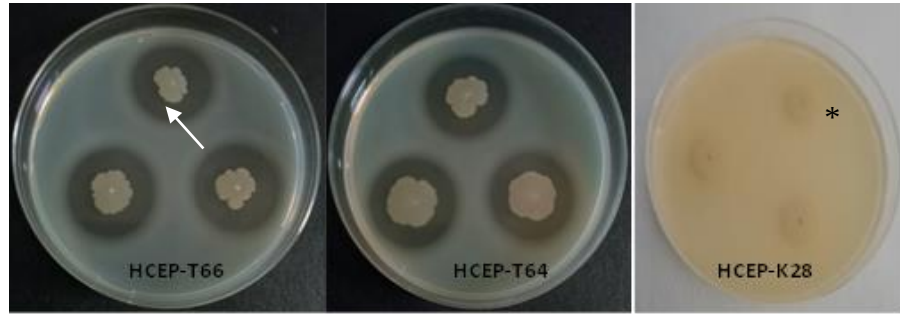
Chen ve ark. (2014) endofitlerin kırmızı toprakta fosfor (P) çözme potansiyellerini araştırmışlardır. Endofit bakteriler arasında en yüksek fosfor çözme potansiyeli *Pantoea dispersa* suşunda tespit edilmiştir. Deneme 25 güne kadar sürdürülebilmiş ve endofit *P. dispersa*'nın kırmızı asidik topraklarda çözünür P salınımı yoluyla tarımsal-mikroekolojik sistemleri optimize etmek için uygun bir aday olabileceğini tespit etmişlerdir. Ayrıca bir diğer bakteri olan *Bacillus megaterium*'un fosfat çözme

potansiyelinin çok yüksek olduğu da yapılan birçok çalışmada tespit edilmiştir (Çakmakçı ve ark., 2007; Güneş ve ark., 2013; Patel ve ark., 2016; Kyaw ve ark., 2022).

4.8.5. Epifit Bakteri İzolatlarının Proteaz Enzimi Üretme Potansiyellerinin Belirlenmesi

Bitkisel, hayvansal ve mikrobiyal kalıntıların dekompozisyonunda önemli rol oynayarak besin döngüsünü gerçekleştiren proteazlar, bu döngü vasıtasıyla bitkilerin ihtiyacı olan besin elementlerinin almasını sağlamaktadırlar (Anonim, 2019). Biyokontrol ajanı olarak kullanılan birçok epifit bakteri ürettikleri amilaz, selüloz, pektinaz ve proteinaz gibi hücre duvarını eriten enzimler sayesinde birçok bitki patojeni mikroorganizmanın gelişimini engelleyerek biyokontrol etki gösterebilmektedirler (Dinesh ve ark., 2015).

Bakteri izolatları tarafında proteaz üretimi %2 yağı alınmış süt tozu içeren LB (SMLBA) Agar besi yeri üzerlerinde belirlenmiştir. Bu besi yerinde bakteri izolatları tarafından üretilen proteazın caseini çözmesi sonucu bakteri kolonisi etrafında şeffaf bir alan meydana gelmiştir (Şekil 4.16).



Şekil 4.16. Bakteri izolatlarının proteaz enzim üretimleri sonucu bakteri kolonileri etrafında oluşan engelleme bölgeleri (ok) ve etkisiz izolatlar (*)

Proteaz üretiminde 25 epifit bakteri izolatı 1.12-3.78 indeks değerlerinde proteaz enzimi üretirken 14 izolat ise proteaz enzimi üretmemiştir. Epifit bakteri izolatlarından en yüksek proteaz üretimi *Bacillus megaterium* HCEP-T66 (3.78) izolatında belirlenirken bunu *Pseudomonas umsongensis* HCEP-T64 (3.62) nolu izolat takip etmiştir (Çizelge 4.8).

Çizelge 4.8. Epifit bakteri izolatlarının proteaz enzim üretimine bağlı olarak elde edilen Pro-İndeks değerler

Bakteri Tür İsimleri	İndeks değeri	Bakteri Tür İsimleri	İndeks değeri
<i>B. megaterium</i> HCEP-T66	3.78 ⁱ	<i>B. mojavensis</i> HCEP-T34	1.50 ^{bcd}
<i>P. umsongensis</i> HCEP-T64	3.62 ⁱ	<i>B. subtilis</i> HCEP-Y43	1.24 ^{bc}
<i>B. subtilis</i> HCEP-T33	2.79 ^h	<i>B.amyloliquefaciens</i> * HCEP-Y42	1.18 ^b
<i>B. safensis</i> HCEP-T65	2.40 ^{gh}	<i>Bacillus. sp</i> HCEP-T13	1.14 ^b
<i>P. thivervalensis</i> HCEP-T49	2.24 ^{fg}	<i>P. koreensis</i> HCEP-T31	1.12 ^b
<i>B. megaterium</i> HCEP-T25	2.26 ^{fg}	<i>Bacillus. sp</i> HCEP-Y44	0.00 ^a
<i>B. subtilis</i> HCEP-T14	2.11	<i>E. bugandensis</i> ** HCEP-K21	0.00 ^a
<i>B. cereus</i> HCEP-Y45	1.95 ^{def}	<i>E. cloacae</i> HCEP-K26	0.00 ^a
<i>B. cereus</i> HCEP-Y49	1.89 ^{def}	<i>E. cloacae</i> HCEP-K28	0.00 ^a
<i>P. dispersa</i> *** HCEP-K31	1.88 ^{def}	<i>E. cloacae</i> HCEP-K71	0.00 ^a
<i>B. megaterium</i> HCEP-T22	1.81 ^{def}	<i>E. bugandensis</i> HCEP-K72	0.00 ^a
<i>B. cereus</i> HCEP-T461	1.78 ^{de}	<i>E. kobei</i> HCEP-K74	0.00 ^a
<i>B. safensis</i> HCEP-T63	1.77 ^{de}	<i>E. cloacae</i> HCEP-K75	0.00 ^a
<i>B. cereus</i> HCEP-Y46	1.77 ^{de}	<i>P.brassicacearum</i> **** HCEP-K116	0.00 ^a
<i>B. megaterium</i> HCEP-T62	1.73 ^{de}	<i>P. thivervalensis</i> HCEP-K117	0.00 ^a
<i>B. subtilis</i> HCEP-T16	1.72 ^{de}	<i>P. thivervalensis</i> HCEP-K213	0.00 ^a
<i>B. subtilis</i> HCEP-T410	1.72 ^{de}	<i>B. drementensis</i> HCEP-T28	0.00 ^a
<i>B. cereus</i> HCEP-Y48	1.65 ^{cde}	<i>B. subtilis</i> HCEP-T61	0.00 ^a
<i>S. rhizophila</i> ***** HCEP-T23	1.54 ^{bcd}	<i>B. cereus</i> HCEP-T462	0.00 ^a
<i>B. megaterium</i> HCEP-T27	1.53 ^{bcd}		

*Bacillus, **Enterobacter, ***Pseudomonas, ****Pantoea, ***** Stenotrophomonas

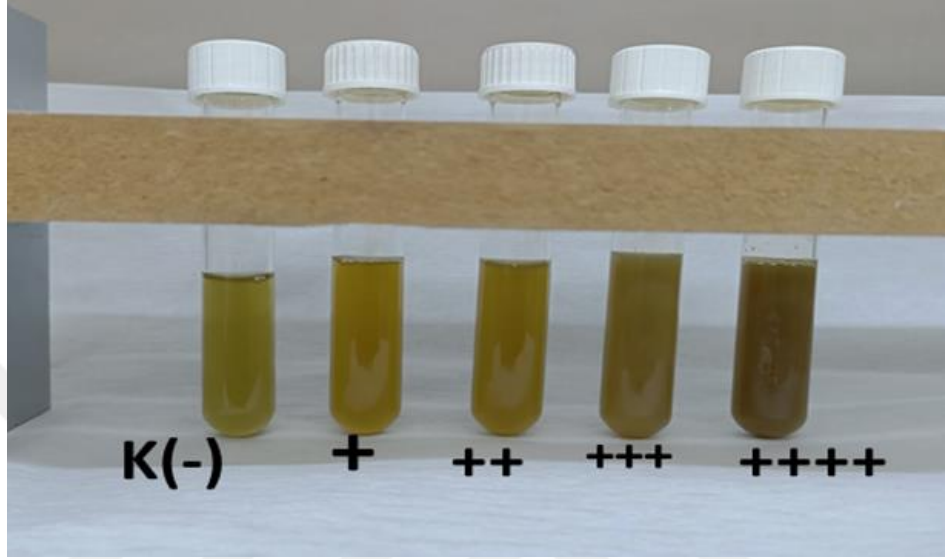
4.8.6. Epifit Bakteri İzolatlarının Amonyak (NH₃) Üretme Potansiyellerinin Belirlenmesi

Bitki gelişimi için en önemli besin elementlerinden bir tanesi de azottur. Azot atmosferde N₂ formunda bulunmaktadır. Doğadaki bu azotu (N₂) bitkiler için yararlı hale dönüştürmek için belirli mikrobiyal faaliyet gerekmektedir. *Azotobacter*, *Beijerinckia* ve *Spirillum* gibi bakteriler doğada serbest halde bulunan azotu (N₂) fikse ederek bitkilerin kullanabileceği amonyak (NH₃) formuna dönüştürürler (Karaman, 2012).

Aday bakteri izolatlarının amonyak (NH₃) oluşturma potansiyelleri peptonlu su içerisinde gelişen bakteri süspansiyonu üzerine Nessler's çözeltisi eklenmek suretiyle belirlenmiştir (Cappuccino ve Sherman, 2013). Amonyak üretimi sonucu bakteri solüsyonlarında açık sarıdan koyu sarı-kahverengine dönüşmesine göre belirlenmiştir. Değerlendirmeler tüpler içerisinde negatif kontrole göre meydana gelen renk değişimlerine göre ‘-’, ‘+’, ‘++’, ‘+++’ ve ‘++++’ olarak yapılmıştır.

Aday antagonist bakteri izolatlarının amonyak üretim testinde tüm izolatlar farklı değerlerde amonyak üretmiştir (Şekil 4.17). İzolatlar arasında *Bacillus subtilis* HCEP-

Y43, *Bacillus. sp* HCEP-Y44, *Bacillus. cereus* HCEP-Y45, *Bacillus. cereus* HCEP-Y49, *Enterobacter bugandensis* HCEP-K21, *Enterobacter cloacae* HCEP-K28 ve *Pseudomonas umsongensis* HCEP-T64 izolatları en yüksek düzeyde amonyak üretimi göstermiştir (Çizelge 4.9).



Şekil 4.17. Aday antagonist bakteri izolatları tarafından üretilen amonyak tüplerdeki peptonlu suyun rengini açık kahverenginden koyu kahverengine dönüşmesiyle belirginleşir

Çizelge 4.9. Aday Antagonist Bakteri İzolatlarının Amonyak Üretme Potansiyelleri

Bakteri Tür İsimleri	NH3	Bakteri Tür İsimleri	NH3
<i>B. subtilis</i> HCEP-Y43	++++	<i>Bacillus. sp</i> HCEP-T13	++
<i>Bacillus. sp</i> HCEP-Y44	++++	<i>B. subtilis</i> HCEP-T14	++
<i>B. cereus</i> HCEP-Y45	++++	<i>B. subtilis</i> HCEP-T16	++
<i>B. cereus</i> HCEP-Y48	++++	<i>B. megaterium</i> HCEP-T22	++
<i>B. cereus</i> HCEP-Y49	++++	<i>S. rhizophila</i> **** HCEP-T23	++
<i>E. bugandensis</i> ** HCEP-K21	++++	<i>B. megaterium</i> HCEP-T27	++
<i>E. cloacae</i> HCEP-K28	++++	<i>B. subtilis</i> HCEP-T33	++
<i>P. umsongensis</i> HCEP-T64	++++	<i>B. mojavensis</i> HCEP-T34	++
<i>B.amyloliquefaciens</i> * HCEP-Y42	+++	<i>B. subtilis</i> HCEP-T61	++
<i>B. cereus</i> HCEP-Y46	+++	<i>B. megaterium</i> HCEP-T62	++
<i>E. cloacae</i> HCEP-K26	+++	<i>P. dispersa</i> *** HCEP-K31	+
<i>P. thivervalensis</i> HCEP-K117	+++	<i>E. cloacae</i> HCEP-K71	+
<i>B. megaterium</i> HCEP-T25	+++	<i>E. cloacae</i> HCEP-K75	+
<i>P. koreensis</i> HCEP-T31	+++	<i>P.brassicacearum</i> **** HCEP-K116	+
<i>P. thivervalensis</i> HCEP-T49	+++	<i>P. thivervalensis</i> HCEP-K213	+
<i>B. megaterium</i> HCEP-T66	+++	<i>B. drementensis</i> HCEP-T28	+
<i>B. subtilis</i> HCEP-T410	+++	<i>B. safensis</i> HCEP-T63	+
<i>B. cereus</i> HCEP-T461	+++	<i>B. safensis</i> HCEP-T65	+
<i>E. bugandensis</i> HCEP-K72	++	<i>B. cereus</i> HCEP-T462	+
<i>E. kobei</i> HCEP-K74	++		

Bacillus*, *Enterobacter*, ****Pseudomonas* *****Pantoea*, ******Stenotrophomonas*

4.8.7. Aday Antagonist Bakteri İzolatlarının Hidrojen Siyanür (HCN) Üretme Potansiyellerinin Belirlenmesi

Aday bakteri izolatlarının hidrojen siyanür (HCN) oluşturma potansiyelleri Castric (1977) tarafından bildirilen yöntem ile belirlenmiştir. 0.05% picric acid + 1% sodium carbonate (Na₂CO₃) süspansiyonu ile ıslatılıp bakteri çizimi yapılan petri kapağına yapıştırılmış olan filtre kâğıdının renginin sarı renkten kahverengi veya koyu kırmızıya dönüşmesi ortamda HCN üretiminin oluştuğunu göstermektedir (Castric, 1977) (Şekil 4.18)



Şekil 4.18. Petri kabı kapağındaki filtre kâğıdı renginin sarı renkten kahverengi veya kırmızıya dönüşmesi ortamda HCN üretiminin oluştuğunu göstermektedir

Deneme sonucunda test edilen 39 izolattan sadece *Pseudomonas thivervalensis* HCEP-K117 ve *Pseudomonas koreensis* HCEP-T31 izolatları HCN üretirken geri kalan 37 izolattan hiç biri besi yerinde HCN üretmemiştir. Deneme 2 kez tekrar edilmiş sonuç aynı şekilde sadece belirtilen izolatlar HCN üretmiştir.

Çizelge 4.10. Epifit bakteri izolatlarının *in vitro* test sonuçları

MALDI-TOF MS	A indeks	IAA	S-indeks	F-indeks	Pro- indeks	Amonyak	HCN
<i>B.amyloliquefaciens</i> * HCEP-Y42	2.12 ^{b-g}	58.8 ^{bc}	1.86 ^{d-i}	0.00 ^a	1.18 ^b	+++	-
<i>B. subtilis</i> HCEP-Y43	1.93 ^{b-g}	61.22 ^{bc}	1.55 ^{b-e}	0.00 ^a	1.24 ^{bc}	++++	-
<i>Bacillus. sp</i> HCEP-Y44	1.22 ^b	43.35 ^b	1.29 ^b	1.12 ^{bc}	0.00 ^a	++++	-
<i>B. cereus</i> HCEP-Y45	2.00 ^{b-g}	52.0 ^{bc}	1.55 ^{b-e}	0.00 ^a	1.95 ^{def}	++++	-
<i>B. cereus</i> HCEP-Y46	2.81 ^{e,i}	44.80 ^b	1.58 ^{b-f}	0.83 ^b	1.77 ^{de}	+++	-
<i>B. cereus</i> HCEP-Y48	2.00 ^{b-g}	45.83 ^b	2.13 ^{hi}	1.39 ^{bc}	1.65 ^{cde}	++++	-
<i>B. cereus</i> HCEP-Y49	2.13 ^{b-g}	61.73 ^{bc}	1.61 ^{b-g}	1.24 ^{bc}	1.89 ^{def}	++++	-
<i>E. bugandensis</i> ** HCEP-K21	1.68 ^{bcd}	64.70 ^{bc}	1.40 ^{bcd}	1.12 ^{bc}	0.00 ^a	++++	-
<i>E. cloacae</i> HCEP-K26	2.04 ^{b-g}	61.15 ^{bc}	1.34 ^{bc}	1.29 ^{bc}	0.00 ^a	+++	-
<i>E. cloacae</i> HCEP-K28	2.87 ^{e,i}	61.91 ^{bc}	2.19 ⁱ	1.36 ^{bc}	0.00 ^a	++++	-
<i>P. dispersa</i> *** HCEP-K31	5.81 ^j	62.8 ^{bc}	1.79 ^{c-i}	5.39 ^f	1.88 ^{def}	+	-
<i>E. cloacae</i> HCEP-K71	1.77 ^{b-e}	87.40 ^c	1.84 ^{d-i}	1.37 ^{bc}	0.00 ^a	+	-
<i>E. bugandensis</i> HCEP-K72	1.56 ^{bc}	56.7 ^{bc}	1.48 ^{bcd}	1.46 ^c	0.00 ^a	++	-
<i>E. kobei</i> HCEP-K74	1.69 ^{bcd}	58.46 ^{bc}	1.78 ^{c-i}	1.42 ^{bc}	0.00 ^a	++	-
<i>E. cloacae</i> HCEP-K75	2.53 ^{c-h}	56.04 ^{bc}	2.08 ^{ghi}	1.26 ^{bc}	0.00 ^a	+	-
<i>P.brassicacearum</i> *** HCEP-K116*	5.23 ^j	66.9 ^{bc}	2.62 ^j	2.02 ^d	0.00 ^a	+	-
<i>P. thivervalensis</i> HCEP-K117	000 ^a	62.11 ^{bc}	1.75 ^{b-i}	1.33 ^{bc}	0.00 ^a	+++	+
<i>P. thivervalensis</i> HCEP-K213	1.59 ^{bc}	72.06 ^{bc}	1.71 ^{b-h}	1.32 ^{bc}	0.00 ^a	+	-
<i>Bacillus. sp</i> HCEP-T13	1.58 ^{bc}	57.14 ^{bc}	0.00 ^a	1.44 ^c	1.14 ^b	++	-
<i>B. subtilis</i> HCEP-T14	1.33 ^b	79.30 ^{bc}	1.69 ^{b-h}	0.00 ^a	2.11 ^{efg}	++	-
<i>B. subtilis</i> HCEP-T16	1.58 ^{bc}	57.70 ^{bc}	0.00 ^a	0.00 ^a	1.72 ^{de}	++	-
<i>B. megaterium</i> HCEP-T22	3.79 ⁱ	51.45 ^{bc}	0.00 ^a	0.00 ^a	1.81 ^{def}	++	-
<i>S. rhizophila</i> ***** HCEP-T23	1.16 ^b	58.00 ^{bc}	1.80 ^{c-i}	0.00 ^a	1.54 ^{bcd}	++	-
<i>B. megaterium</i> HCEP-T25	1.30 ^b	64.80 ^{bc}	1.67 ^{b-h}	0.00 ^a	2.26 ^{fg}	+++	-
<i>B. megaterium</i> HCEP-T27	3.28 ^{hi}	71.30 ^{bc}	1.43 ^{bcd}	2.94 ^e	1.53 ^{bcd}	++	-

Çizelge 4.10.(Devam) Epifit bakteri izoatlarının *in vitro* test sonuçları

MALDI-TOF MS	A indeks	IAA	S-indeks	F-indeks	Pro- indeks	Amonyak	HCN
<i>B. drentensis</i> HCEP-T28	2.00 ^{b-g}	59.44 ^{bc}	2.86 ^j	0.00 ^a	0.00 ^a	+	-
<i>P. koreensis</i> HCEP-T31	3.00 ^{ghi}	62.56 ^{bc}	1.44 ^{bcd}	2.27 ^d	1.12 ^b	+++	+
<i>B. subtilis</i> HCEP-T33	1.92 ^{b-g}	58.9b ^c	0.00 ^a	0.00 ^a	2.79 ^h	++	-
<i>B. mojavensis</i> HCEP-T34	1.87 ^{b-f}	60.10 ^{bc}	2.00 ^{e-i}	0.00 ^a	1.50 ^{bcd}	++	-
<i>P. thivervalensis</i> HCEP-T49	2.13 ^{b-g}	68.70 ^{bc}	2.84 ^j	0.00 ^a	2.24 ^{fg}	+++	-
<i>B. subtilis</i> HCEP-T61	1.26 ^b	59.90 ^{bc}	2.10 ^{hi}	0.00 ^a	0.00 ^a	++	--
<i>B. megaterium</i> HCEP-T62	3.28 ^{hi}	65.44 ^{bc}	1.60 ^{b-f}	1.17 ^{bc}	1.73 ^{de}	++	-
<i>B. safensis</i> HCEP-T63	2.88 ^{f-i}	63.27 ^{bc}	0.00 ^a	0.00 ^a	1.77 ^{de}	+	-
<i>P. umsongensis</i> HCEP-T64	2.83 ^{e-i}	67.20 ^{bc}	2.79 ^j	1.47 ^c	3.62 ⁱ	++++	-
<i>B. safensis</i> HCEP-T65	2.76 ^{d-i}	61.35 ^{bc}	0.00 ^a	0.00 ^a	2.40 ^{gh}	+	-
<i>B. megaterium</i> HCEP-T66	2.52 ^{c-h}	64.00 ^{bc}	0.00 ^a	0.00 ^a	3.78 ⁱ	+++	-
<i>B. subtilis</i> HCEP-T410	2.22 ^{c-h}	61.7 ^{bc}	1.34 ^{bc}	0.00 ^a	1.72 ^{de}	+++	-
<i>B. cereus</i> HCEP-T461	1.92 ^{b-g}	59.02 ^{bc}	1.86 ^{d-i}	0.00 ^a	1.78 ^{de}	+++	-
<i>B. cereus</i> HCEP-T462	1.97 ^{b-g}	75.00 ^{bc}	2.06 ^{f-i}	0.00 ^a	0.00 ^a	+	-
Kontrol		0,00 ^a					

Bacillus*, *Enterobacter*, ****Pseudomonas* *****Pantoea*, ******Stenotrophomonas*

4.9. Antagonist Bakteri İzolatlarının *in vivo* Biyokontrol Etkinliklerinin Belirlenmesi

4.9.1. Havuç Dilimi Testleri ile Aday Bakteri İzolatlarının Biyokontrol Etkinliğinin Belirlenmesi

Havuç dilimleri ile biyokontrol etkinin belirlenmesi testlerinde değerlendirmeler antagonist ve patojen inokulasyonunu takiben 2 gün sonra dilimler üzerindeki meydana gelen eksudat ve havuç dilimlerinde oluşan yumuşak çürüklük belirtileri ile yapılmıştır. Oluşan hastalık belirtileri patojen inokulasyonundan 2 gün sonra 0-4 skalasına göre değerlendirilmiş ve Thousand Heuberger* formülü ile % hastalık şiddeti belirlenmiştir. Ayrıca antagonist bakterilerin K(+)’e göre hastalığı engelleme oranları (% etki) ayrıca belirtilmiştir.

Değerlendirmeler sonucunda seçilmiş olan 13 epifit bakteri izolatından 11 izolat kontrol uygulamasına göre yumuşak çürüklüğü %8.33 ile %100 oranında engellerken, 2 izolat ise hastalığın çıkışının engellemesinde etkisi olmamıştır. Test edilen izolatlar arasında 4 izolat (*Bacillus cereus* HCEP-Y46, *Pseudomonas koreensis* HCEP-T31, *Bacillus megaterium* HCEP-T62 ve *Bacillus safensis* HCEP-T65) kontrol uygulamasına kıyasla havuç dilimleri üzerinde yumuşak çürüklük belirtisinin çıkışını %100 oranında engellemiştir (Çizelge 4.11, Şekil 4.19).

Çizelge 4.11. Havuç dilimleri inokulasyonu yönteminde tüm uygulamalarda meydana gelen epifit bakteri izolatları uygulamalarının hastalık şiddeti üzerine etkileri ve hastalık engelleme oranları

Bakteri İzolatları	% Hastalık Şiddeti	% Engelleme (Etki)
<i>Bacillus cereus</i> HCEP-Y46	0,00a	100,00
<i>Bacillus megaterium</i> HCEP-T62	0,00a	100,00
<i>Pseudomonas. koreensis</i> HCEP-T31	0,00a	100,00
<i>Bacillus safensis</i> HCEP-T65	0,00a	100,00
<i>Pseudomonas. umsongensis</i> HCEP-T64	8,33a	91,67
<i>Pantoea. dispersa</i> HCEP-K31	25,00ab	75,00
<i>Bacillus. safensis</i> HCEP-T63	25,00ab	75,00
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> HCEP-Y42	41,67b	58,33
<i>Bacillus subtilis</i> HCEP-T410	50,00b	50,00
<i>Bacillus megaterium</i> HCEP-T66	83,33c	16,67
<i>Pseudomonas brassicacearum</i> HCEP-K116	91,67c	8,33
<i>Bacillus. megaterium</i> HCEP-T27	100,00c	0,00
<i>Bacillus megaterium</i> HCEP-T22	100,00c	0,00
K (+)	100,00	0,00
K (-)	0,00a	100,00

Değerlendirme sonucunda etkili olan izolatlara bakıldığında çoğunlukla *Bacillus*, *Pseudomonas* cinslerine ait türlerin etkili olduğu görülmüştür. Son yıllarda farklı bitkilerde *in vitro* ve *in vivo* ortamlarında biyolojik mücadele için yapılan birçok çalışmada cins düzeyinde tespit edilen antagonist bakteriler yapmış olduğumuz çalışma ile benzerlik göstermektedir (Gökçe ve Kotan, 2016; Bozkurt ve Soylu, 2019; Özyılmaz, 2019; Varhan ve Bozkurt, 2021; Ghadamgahi ve ark., 2022; Panebianco ve ark. 2022; Kaya ve ark. 2023).



Şekil 4.19. Havuç dilimleri inokulasyonu yönteminde epifit bakteri izolatlarının uygulandığı havuç dilimlerinde kontrol uygulamasına göre yumuşak çürüklük oluşumunda meydana gelen azalmalar

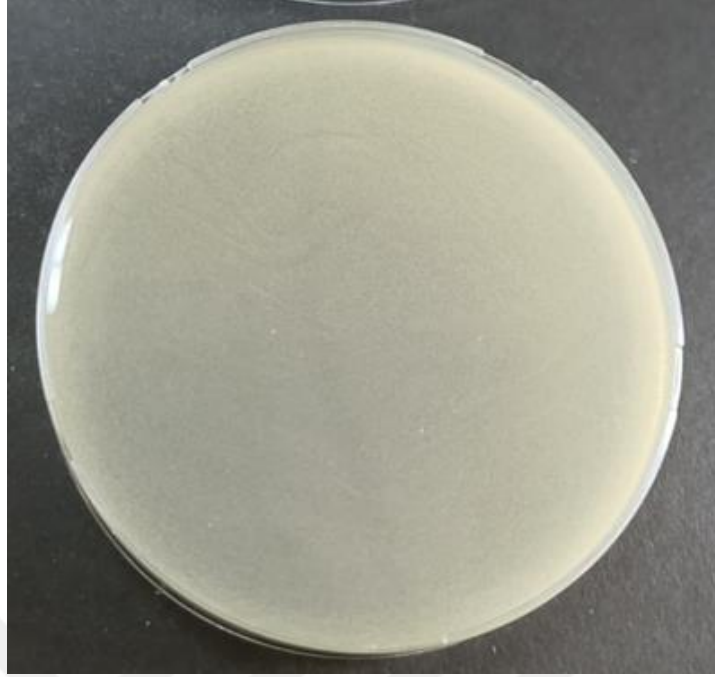
4.10. Bakteriyofaj (Faj) İzolasyonu

Sörvey kapsamında laboratuvara getirilen yumuşak çürüklük belirtisi gösteren havuç bitkileri ve yetiştirildiği topraklardan faj izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

4.10.1. Bitkiden Bakteriyofaj İzolasyonu

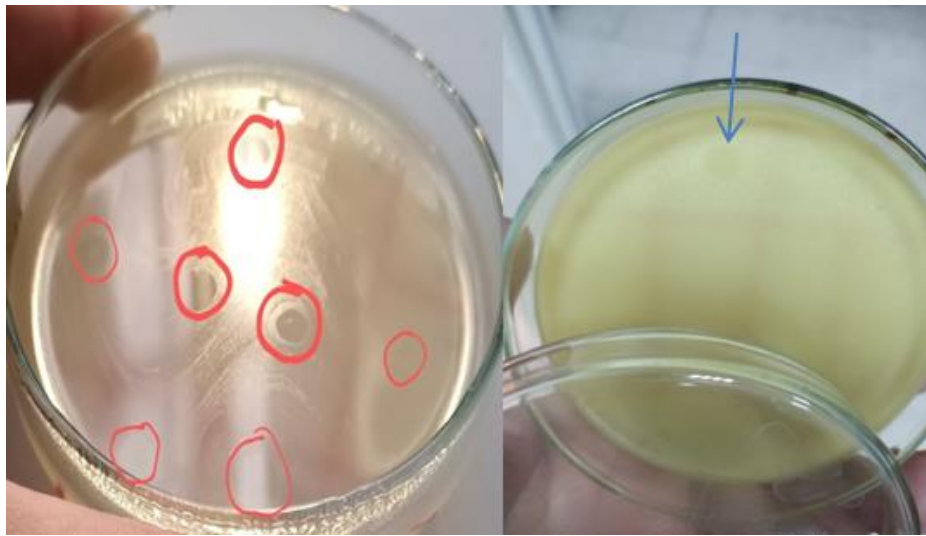
Kloroform eklenerek 4-5 saat 150 rpm’de orbital çalkalayıcıda çalkalanmaya bırakılan örneklerden iki yöntem kullanılarak faj izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

Yöntem 1. Faj+patojenin besi yeri ile petrileri çalkalamak suretiyle karıştırılarak yapılan inkübasyondan 48 saat sonra petriler faj plakları varlığı yönünden değerlendirmiştir. Değerlendirme sonucunda petrilerde herhangi bir plak (şeffaf bölge) oluşumu tespit edilememiştir.(Şekil 4.20).



Şekil 4.20. *Yöntem 1* sonucunda petrilerde faj plağı (şeffaf bölge) meydana gelmemiştir

Yöntem 2: Patojen ile karıştırılmış besi yeri kuruduktan sonra faj süspansiyonundan 10 µl alınarak **nokta** şeklinde faj ekimi gerçekleştirilmiştir. Petriler steril kabin içinde yarı açık şekilde yaklaşık 1 saat bekletilerek kurutulduktan sonra 27 °C’de 48 saat inkübe edilmiştir. 48 saat sonra petriler bakteriyofaj plaklarının varlığı yönünde değerlendirilmiş ve değerlendirme sonucunda değişik sayı ve büyüklükte faj plaklar (erime alanları) tespit edilmiştir (Şekil 4.21).



Şekil 4.21. Faj izolasyonu sonucunda oluşan erime alanları veya plakları

Her iki yöntem karşılaştırıldığında, faj+patojenin besi yeri ile çalkalanıp karıştırılarak yapılan faj izolasyonunda herhangi bir sonuç elde edilmezken, nokta ekimi şeklinde yapılan faj izolasyonunda erime alanları (faj plakları) elde edilmiştir.

4.10.2. Toprakten Bakteriyofaj İzolasyonu

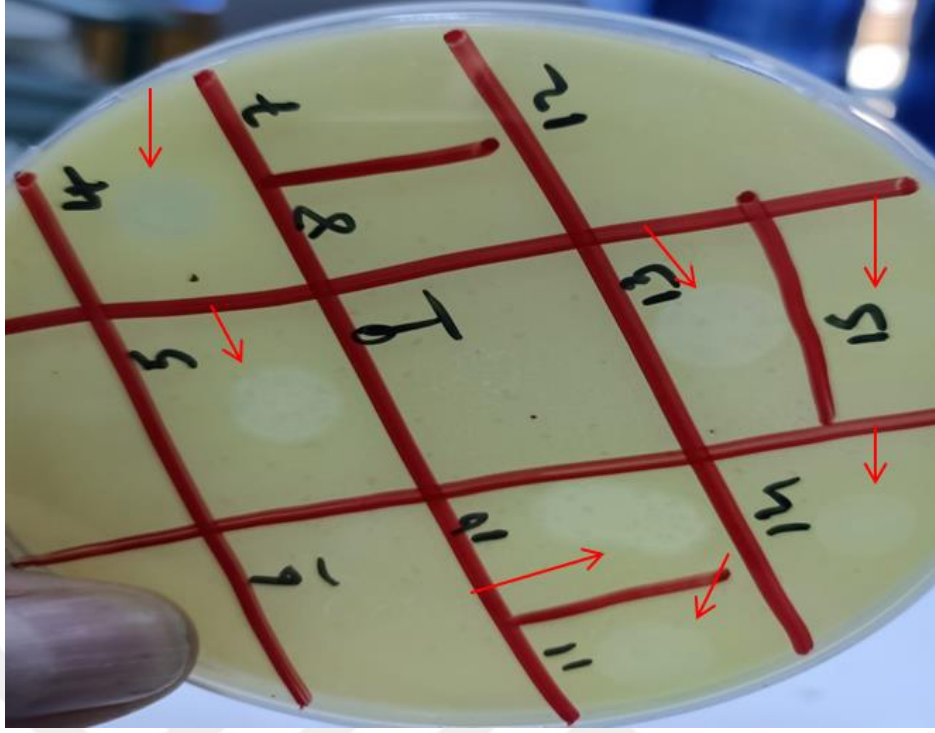
Süspansiyon filtreden geçirildikten sonra her 5 ml süspansiyon için 0.5 ml kloroform eklendikten sonra 30 dak. çalkalanmaya bırakılmıştır. Bu aşamadan sonra, faj plağı elde etmek için bitki örneğinde olduğu gibi iki farklı yöntem denenmiştir.

Yöntem 1: Faj+patojenin besi yeri ile petrilere çalkalamak suretiyle karıştırılarak yapılan inkübasyondan 48 saat sonra petrilere faj plakları varlığı yönünden değerlendirmiştir. 48 saat sonra petrilere bakteriyofaj plaklarının varlığı yönünden değerlendirme yapılmış ve değerlendirme sonucunda değişik sayı ve büyüklükte faj plakları (erime alanları) tespit edilmiştir (Şekil 4.22).



Şekil 4.22. İzolasyon sonucunda oluşan faj (erime alanları) plakları (ok

Yöntem 2: Patojen ile karıştırılmış besi yeri kuruduktan sonra faj süspansiyonunda 10 µl alınarak **nokta** şeklinde faj ekimi gerçekleştirilmiştir. Petrilere steril kabin içinde yarı açık şekilde yaklaşık 1 saat bekletilerek kurutulduktan sonra 27 °C’de 48 saat inkübe edilmiştir. 48 saat sonra petrilere bakteriyofaj plaklarının varlığı yönünde değerlendirilmiş ve değerlendirme sonucunda değişik sayı ve büyüklükte faj plakları (erime alanları) tespit edilmiştir (Şekil 4.23).



Şekil 4.23. Nokta şeklinde faj ekiminde farklı şekil ve büyüklükte faj (erime alanları) plakları (ok)

Faj+patojenin besi yeri ile çalkalanıp karıştırılarak yapılan faj izolasyonunda küçük ve düzensiz faj plakları elde edilirken, **nokta** ekimi şeklinde yapılan faj izolasyonunda erime alanları daha şeffaf ve belirgin olan, şekil açısından daha büyük ve düzenli faj plakları elde edilmiştir.

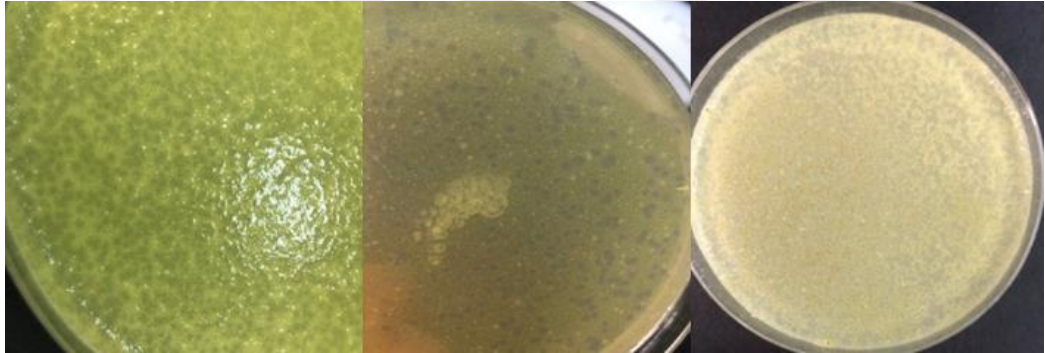
Çevrenin, doğal tarım alanlarının korunması ve sürdürülebilir tarım için kimyasal ilaçlar ve sentetik gübrelere alternatif biyolojik mücadele olanaklarının araştırılması zorunlu bir hal almaktadır. Fajlar biyolojik mücadele içinde önemli bir yer almaktadır. Bitki patojen hastalık etmenlerine karşı birçok başarılı faj çalışması yapılmıştır (Balogh ve ark., 2003; Adrianenssens ve ark., 2012; Ranjan ve ark., 2018). Gerek tarlada gerekse hasat sonrası depo koşullarında birçok üründe dünya çapında önemli ekonomik kayıplara sebep olan *Pcc* 'nin fajı birçok çalışmada izole edilip tanılanmış ve biyolojik mücadelesinde başarılı bir şekilde kullanılmıştır (Lee ve ark., 2012; Lim ve ark., 2013; Bugaeva ve ark., 2021; Kim ve ark., 2022; Naligama ve Halmillawewa, 2022).

4.11. Bakteriyofajların Saflaştırılması

İzole edilen fajların petri incelemelerinde, farklı tipte plak oluşumu gözlemlenmiş ve homojen plak elde etmek için saflaştırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Saflaştırma işlemi 2 farklı yöntem ile gerçekleştirilmiştir.

Yöntem 1: Seyreltme yöntemi ile saflaştırma

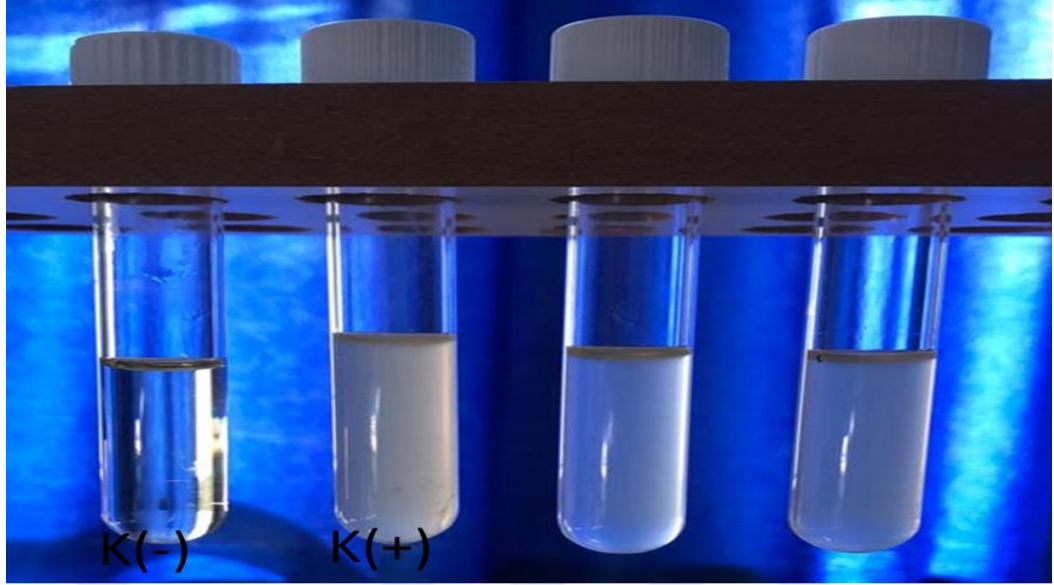
Fajların seyreltme yöntemi ile saflaştırmada; 10^{-6} 'ya kadar seyreltilen faj süspansiyonlarından 100'er mikrolitre ile 24 saatlik NB besi yerinde geliştirilen *Pcc* izolatından 100 µl alınarak boş petrilere konulmuştur. Daha sonra 45-50 °C'ye kadar ısıtılmış KB ve NA besi yerleri ayrı ayrı petrilerdeki süspansiyon üzerine dökülerek hafifçe çalkalanarak besi yerleri ve süspansiyonların karışımı sağlanmıştır. Steril kabinde yarı açık şekilde kurutulan petriler 48 saat boyunca 27 °C inkübatöre bırakılmıştır. 48 saat sonra petriler faj plakları (erime alanlar) yönünde değerlendirilmiştir. Değerlendirme sonucunda inkübasyondan 48 saat sonunda farklı sayı ve büyüklükte birçok faj plağı elde edilmiştir (Şekil 4.24)



Şekil 4.24. Seyreltme yöntemi ile saflaştırılan fajların oluşturduğu erime bölgeleri

Yöntem 2: Faj plakları kesme yöntemiyle saflaştırma

Faj plakları kesme yöntemiyle saflaştırmada; steril bistüri ile kesilen faj plakları, 24 saat önce *Pcc* izolatı geliştirilmiş NB besi yeri olan cam tüplerin içine atılmış, 24 ve 48 saat sonra cam tüpler oluşan şeffaflık yönünden değerlendirilmiştir. Süreler sonunda içinde faj+patojen olan tüpler, içinde sadece patojen olan (pozitif kontrol) tüplere göre şeffaf bir renk meydana gelmiştir (Şekil 4.24).



Şekil 4.25. Kesme yöntemi ile saflaştırılan fajların cam tüplerde meydana getirdiği şeffaf görüntü

24 ve 48 saat sonunda örnekler ayrı ayrı UV-vis spektrofotometre (Perkin Elmer, Lamda 25, USA) ile 600 nm dalga boyunda okunarak absorbans değerleri belirlenmiştir (Çizelge 4.12)

Çizelge 4.12. Saflaştırılan fajların 24 ve 48 saatlik absorbans değerleri

24 saatlik ölçüm		48 saatlik ölçüm	
Saflaştırma oranı	Absorbans değeri	Saflaştırma oranı	Absorbans değeri
10^{-3}	0.87	10^{-3}	1.31
10^{-4}	0.92	10^{-4}	1.06
10^{-5}	1.35	10^{-5}	1.49
10^{-6}	1.07	10^{-6}	1.41
Pcc (K+)	1.60	Pcc (K+)	1.71

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

“Hatay İli Havuç (*Daucus carota* L.) Üretim Alanlarında Bakteriyel Hastalık Etmenlerinin Tespiti ve *Pectobacterium carotovorum*’un Biyolojik Mücadele Olanaklarının Araştırılması” isimli bu tez çalışmasında havuç bitkisi üretim alanlarında bakteriyel hastalıkların tespiti ve en yaygın hastalık etmeni bakteri olan *Pectobacterium carotovorum*’a karşı *in vitro* koşullarda epifit bakteriler ve bakteriyofajlarla biyolojik mücadele olanakları araştırılmıştır. Bu kapsamda;

Sörvey çalışmaları, Hatay ilinde %58 oranla havuç yetiştiriciliğinin en fazla yapıldığı Kırıkhan ilçesine bağlı beş farklı mahallede (Çataltepe, Yalangoz, Karadurmuşlu, Topboğazı ve Soğuksu) bulunan 30 tarlada, 4 adet havuç yıkama ve paketlenme evinde yürütülmüştür. Sörvey yapılan bu alanların yanı sıra Hatay ilinin Reyhanlı ve Kumlu gibi diğer ilçelerinden hasat edilip Antakya sebze halinde satışa sunulan hastalık belirtisi gösteren havuç bitkilerinden de örneklemeler yapılmıştır. Yapılan sörvey çalışmaları sonucunda, havuç yumrularında yumuşak çürüklük belirtisi gösteren dokulardan yapılan patojen izolasyonlardan elde edilip saflaştırılan 65 izolattan sörvey alanlarını temsil edecek şekilde seçilen 6 farklı bakteri izolatının (EcH4, PmH11, PaH15, PcH16, PcK24 ve PaH27 kodlu izolatlar) tanımlanması MALDI-TOF MS ile yapılmıştır. MALDI-TOF protein profil analizler sonuçlarına göre; PaH15 izolatı yumuşak çürüklük ve karabacak etmeni *Pectobacterium atrosepticum* olarak tanımlanırken, PcH16 ve PcK24 izolatları bakteriyel yumuşak çürüklük etmeni *Pectobacterium carotovorum* subsp *carotovorum* olarak tanımlanmıştır. Morfolojik olarak farklılık gösteren EcH4, PmH11 ve PaH27 izolatlarında fırsatçı yumuşak çürüklük etmeni olarak bilinen *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas marginalis* ve *Pantoea agglomerans* olarak tanımlanmıştır. MALDI-TOF MS ile tanısı yapılan PaH15, PcH16 ve PcK24 izolatlarının ayrıca sekans analizleri ile moleküler tanımları yapılmıştır. Sekans analiz sonuçlarına göre her üç izolatta *Pectobacterium carotovorum* subsp *carotovorum* olarak tanımlanmıştır. Yapılan hem patates yumuşak çürüklük testinde meydana getirdiği yoğun yumuşak çürüklük hem de havuç dilimleri patojenisite testinde havuç dilimleri üzerinde diğer patojen izolatları göre salgılamış olduğu fazla eksudat ve yoğun yumuşamadan dolayı PcH16 izolatı (*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*) tez çalışması kapsamında kullanılmaya karar verilmiştir.

Pectobacterium carotovorum subsp. *carotovorum* izolatu KOH ile gram reaksiyonu Gram negatif olarak belirlenmiş ve Tütünde Aşırı Duyarlılık testinde (HR) tütün yaprağında çökmeler meydana getirmiş ve aşırı duyarlılık reaksiyonu gözlemlenmiştir.

Biyolojik mücadele ajanı epifit bakteriler hastalığın görölmediğı tarlalardan sağılıklı havuç bitkilerinin yaprak, kök ve rizosfer toprağından, morfolojik olarak farklı olabileceğı düşünölen 196 bakteri izolatu izole edilip saflaştırılmıştır. Saflaştırılan bakteri izolatları ikili költür testine tabi tutulmuş, test sonucunda *Pcc*'ye karşı antagonistik etki gösteren 7'si yaprak, 11'i kök ve 21'i rizosfer toprağından olmak üzere toplam 39 aday antagonist bakteri izolatların MALDI-TOF ile tanıları yapılmıştır.

Çalışmamızda izole edilen ve tanısı yapılan aday antagonist epifit bakterilerin *in vitro* koşullarında antagonisik etkinlikleri yanı sıra siderofor oluşturma potansiyeli, fosfor çözme potansiyeli, IAA üretme potansiyeli, proteaz enzim üretme potansiyeli, amonyak (NH₃) üretme potansiyeli, Hidrojen Siyanür (HCN) üretme potansiyellerinin belirlenmesi gibi etki mekanizmaları incelenmiştir. Epifit bakterilerin antagonistik etkilerine göre *in vitro* antibiyosis testlerinde 39 epifit bakteri patojen gelişimini farklı oranlarda engellemiştir. Antibiyosis testinde en yüksek indeks değeri *Pantoea dispersa* HCEP-K31 (4.85) izolatında belirlenirken bunu sırasıyla *Pseudomonas brassicacearum* HCEP-K116 (4.52) ve *Bacillus megaterium* HCEP-T22 (3.79) izolatları izlemiştir. Bitkilerin büyüme ve gelişmeyi düzenleyen en önemli hormonlardan biri de IAA üretimidir. Aday antagonist bakteri izolatları içerisinde en yüksek IAA üretimi 1.28 nm absorbans değeri ile *Enterobactercloacea* HCEP-K71 ve 1.16 nm absorbans değeri ile *Bacillus subtilis* HCEP-T14 izolatlarında belirlenmiştir. Aday antagonist bakteri izolatlarında en yüksek siderofor üretimi *Bacillus drentensis* HCEP-T28 (2.86) izolatında belirlenirken bunu *Pseudomonas thivervalensis* HCEP-T49 (2.84) ve *Pseudomonas umsongensis* HCEP-T64 (2.79) izolatları izlemiştir. Yedi izolatta siderofor üretimi gözlemlenmemiştir. Epifit bakteri izolatların fosfor çözünürlük testinde en yüksek fosfat çözünürlüğü *Pantoea dispersa* HCEP-K31 (5.39) izolatında gerçekteşirken bunu *Bacillus megaterium* HCEP-T27 (2.94) nolu izolat izlemiştir. 19 izolatta ise fosfat çözünürlüğü gözlenmemiştir. Proteaz üretiminde 25 epifit bakteri izolatu 1.12-3.78 indeks değerklerinde proteaz enzimi üretirken 14 izolat ise proteaz enzimi üretmemiştir. Epifit bakteri izolatlarından en yüksek proteaz üretimi *Bacillus*

megaterium HCEP-T66 (3.78) izolatında belirlenirken bunu *Pseudomonas umsongensis* HCEP-T64 (3.62) nolu izolat takip etmiştir. Aday antagonist bakteri izolatlarının amonyak üretim testinde tüm izolatlar farklı değerlerde amonyak üretmiştir. Aday bakteri izolatlarının hidrojen siyanür (HCN) oluşturma potansiyellerinde test edilen 39 izolattan sadece HCEP-K117 (*Pseudomonas thivervalensis*) ve HCEP-T31 (*Pseudomonas koreensis*) izolatları HCN üretirken geri kalan 37 izolattan hiç biri besi yerinde HCN üretmemiştir.

Antagonist epifit bakteriler dışında *Pcc*'ye karşı kullandığımız diğer bir biyolojik ajanda bakteriyofajlardır. Faj izolasyonu için hasat öncesi ve hasat sonrası tarlalara, havuç yıkama ve paketlenme evlerine ve Antakya sebze haline sörveyler gerçekleştirilmiştir. Yumuşak çürüklük belirtisi gösteren havuç bitkilerinden ve yetiştiği topraktan örnekler toplanmış ve faj izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

Havuç bitkilerinden faj izolasyonu iki yöntem kullanılarak gerçekleştirilmiştir.. Yöntem 1 de herhangi bir faj izolasyonu gerçekleşmezken yöntem 2 de değişik sayı ve büyüklükte faj plaklar (erime alanları) tespit edilmişti.

Havuç bitkilerinden olduğu gibi bitkinin yetiştiği topraktan da faj izolasyonu iki yöntemle belirlenmiştir. Yumuşak çürüklük belirtisi gösteren havuçların yetiştiği topraktan iki yöntem kullanılarak yapılan izolasyonda her iki yöntemde de değişik sayı ve büyüklükte faj plakları elde edilmiştir. Yöntem1 de plak sayısı çok erime alanları küçükken, yöntem 2 de (nokta ekim) plak sayısı az fakat erime alanları daha büyük, sınırları daha net olarak ortaya çıkmıştır.

İzole edilen fajların petri incelemelerinde farklı tipte plak oluşumu gözlemlenmiş ve homojen plak elde etmek için, saflaştırma işlemi 2 farklı yöntem ile gerçekleştirilmiştir. Bakteriyofajların seyreltme yöntemi ile saflaştırma da, inkübasyondan 48 saat sonunda farklı sayı ve büyüklükte birçok faj plağı elde edilmiştir. Faj plakları kesme yöntemiyle saflaştırmada ise, saflaştırma işlemlerinden 24 ve 48 saat sonra cam tüpler oluşan şeffaflık yönünden değerlendirilmiştir. Süre sonunda örnekler UV-vis spektrofotometre (Perkin Elmer, Lambda 25, USA) ile 600 nm dalga boyunda okunarak absorbans değerleri belirlenmiştir. Değerlendirme sonucunda İnkübasyondan 24 saat sonra içinde faj+patojen olan tüpler, içinde sadece patojen olan (pozitif kontrol) tüplere göre şeffaf bir renk meydana gelmiştir.

Havuç dilimleri ile biyokontrol etkinin belirlenmesi testlerinde 13 epifit bakteri izolatından 11 izolat kontrol uygulamasına göre yumuşak çürüklüğü %8.33 ile %100 oranında engellerken, 2 izolat ise hastalığı engellemeye etkisi olmamıştır. Bunlardan 4 izolat, *Bacillus cereus* HCEP-Y46, *Pseudomonas koreensis* HCEP-T31, *Bacillus megaterium* HCEP-T62 ve *Bacillus safensis* HCEP-T65 kontrol uygulamasına göre yumuşak çürüklüğü %100 oranında engellemiştir.

Sonuç olarak, bu çalışma ile ülkemizde ilk defa havuçta yumuşak çürüklük yapan *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*'a karşı biyolojik mücadele olanakları araştırılmış. Ayrıca ilk defa ülkemizde *in vitro* koşullarda *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*'a karşı etkili olan bakteriyofaj izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Hastalığın biyolojik mücadelesine yönelik çalışmalarda özellikle *Bacillus cereus* HCEP-Y46, *Pseudomonas koreensis* HCEP-T31, *Bacillus megaterium* HCEP-T62 ve *Bacillus safensis* HCEP-T65 *in vitro* testlerde yüksek düzeyde etki göstererek patojen gelişimini ve buna bağlı olarak bakteriyel yumuşak çürüklük oluşumunu yüksek oranda engellemiştir. Bu veriler ışığında, *Pcc*'ye karşı mücadelede antagonist bakteriler ile biyolojik mücadelenin etkili olabileceği tespit edilmiştir. İleriki dönemlerde yapılacak çalışmalarla izolatların ayrı ayrı veya karışım halinde arazi koşullarında denenerek etkinliklerinin belirlenmesi ve arazi koşullarında etkili olan izolatların biyoformülasyon çalışmalarına yönelinmesi bu tez çalışmasının devamındaki hedefler arasında olmalıdır.

KAYNAKLAR

- Anonim, 2017. Sürvey talimatı. <https://www.tarimorman.gov.tr/Konu/943/Survey>. (Erişim tarihi: 14.10.2021).
- Anonim, 2019. <https://atamankimya.com/sayfalar.asp?LanguageID=1&cid=3&id=9&id2=9776> (Erişim tarihi: 04.02.2024).
- Anonim, 2023. TÜİK. <https://biruni.tuik.gov.tr/medas/?kn=92&locale=tr>. (Erişim tarihi: 10.08.2023)
- Anonymous, 2024. <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL> (Acces Date:02.02.2024)
- Abd-El-Khair, H. and Haggag, K:H:E., 2007. Application of some bactericides and bioagents for controlling the soft rot disease in potato. **Research Journal of Agriculture and Biological Sciences**, 3 (5), 463-473.
- Abdelghany , W.A., Mohamedin, A.H.A., Abo-Elyousr, K.A.M. and Husein, M.A.M., 2022. Control of bacteria soft rot disease of potato caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* using different nanoparticles. **Archives of Phytopathology and Plant Protection** 55 (4), 1638-1660.
- Achouak, W., Sutra, L.,Heulin, T., Meyer, J.M., Fromin N., Degraeva, S., Christen, R. and Gardan, L., 2000. *Pseudomonas brassicacearum* sp. nov. and *Pseudomonas thivervalensis* sp. Nov., two root-associated bacteria isolated from *Brassica napu* and *Arapidopsis thaliana*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 50, 9-18.
- Adriaenssens E.M., van Vaerenbergh, J., Vandenheuvel, D., Dunon, D., Ceyssens P.J., de Proft M., Kropinski, A.M., Noben, J.P., Maes M., Lavigne R., 2012. T4-related bacteriophage LIMEstone isolates for the control of soft rot on potato caused by *Dickeya solani*. **PloS ONE** 7 (3) e33227.
- Aghdam, N.M.N., Baghaee-Ravari, S. and Shiri, A., 2023. Antimicrobial capacity of *Pseudomonas brassicacearum* strain EnPb against potato soft rot agent.**European Journal of Plant Pathology** 165, 215–231.
- Agyemang, P. A., Kabir, M..N., Kersey, C.M. and Dumenyo, C.K., 2020. The Bacterial Soft Rot Pathogens, *Pectobacterium carotovorum* and *P. atrosepticum*, Respond to Different Classes of Virulence-Inducing Host Chemical Signals. **Horticulture** 6, 13.
- Ahmed, E. and Holmström, S.J.M., 2014. Siderophores in environmental research: Roles and applications. **Microbial Biotechnology Minireview**, 7, 196–208.
- Akbaba, M., Özaktan, H., 2021. Kirazda *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*'nin Biyolojik Kontrolünde Yararlı Bakterilerin Kullanımı. **Atatürk Üniversitesi. Ziraat Fakültesi Dergisi**, 52 (2), 176-189.
- Aktan, Z.C., Soylu, S., 2020. Diyarbakır ilinde yetişen badem ağaçlarından endofit ve epifit bakteri türlerinin izolasyonu ve bitki gelişimini teşvik eden mekanizmalarının karakterizasyonu. **Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi**. 23, 641-654
- Algeblawi, A. and Adam. F., 2013. Biological control of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* by *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis* and *Bacillus thuringiensis*. **International Journal of Chemical, Environmental & Biological Sciences** 1 (5),771-774.

- Al Ghazzawi, A., Abu Ghoura, M., Al Beig, N., Jaloul, A. and Mando, J., 2012. First Report Of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* Causing Stem Rot On Greenhouse Tomatoes In Syria. **Journal of Plant Pathology**. 94 (4), S4.93-S4.93. 1/2p.
- Amarasinghe, R., Sarananda, K. H. and Somachandra, K. P., 2014. Identification of causes of carrot (*Daucus carota* L.) soft rot and control measures under commercial conditions. **Proceedings of the Peradeniya University international research sessions, Sri Lanka**. 18, 173.
- Aysan, Y., Yıldız, N., Yonucu, Ü., Gül Çınar G., Yücel, Ö., Yıldız, F. ve Çetinkaya, Y., 2002. Doğu Akdeniz Bölgesi Domates Seralarında Gövde Öz Nekrozuna Neden Olan Bakteriyel Etmenlerinin Saptanması, Epidemiyolojileri ve Entegre Mücadelesi Üzerine Araştırmalar. **TOGTAG-TARP- Proje No:2346**
- Aysan, Y., Karatas, A. ve Cinar, O., 2003. Biological control of bacterial stem rot caused by *Erwinia chrysanthemi* on tomato. **Crop Protection**, 22(6), 807-902.
- Aysan, Y., Mirik, M. ve Çetinkaya-Yıldız, R., 2009. Süs Bitkilerinde Bakteriyel Hastalık Etmenlerinin Tanısı, Fenotipik, Genotipik Karakterizasyonunu Ve Önemli Bakteriyel Etmenlerin Hızlı Tanı Yöntemlerinin Geliştirilmesi Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu (The Scientific And Technical Research Council Of Turkey) Tarım, Ormancılık ve Veterinerlik Araştırma Grubu (Agriculture, Forestry And Veterinary Research Grant Group) **Proje No: 106 O 333**.
- Aysan, Y., ve Çemen, A. 2016. Bitki hastalıklarının mikroskopik panzehri <https://www.tarlasera.com/makale-9803> (Erişim 20.08.2023).
- Azaiez, S., Slimene, I.B., Karkoucha, I., Essida, R., Jallouli, S., Djebali, N., Elkahoui, S., Limam, F. and Tabben, O., 2018. Biological control of the soft rot bacterium *Pectobacterium carotovorum* by *Bacillus amyloliquefaciens* strain Ar10 producing glycolipid-like compounds. **Microbiological Research**, 217, 23-33.
- Bacanlı, M., Başaran, N. and Başaran, A.A., 2017. Lycopene; Is it Beneficial to Human Health as an Antioxidant? **Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences**. 14 (3), 311-318.
- Baghaee- Ravari, S., Rahimian, H., Shams-Bakhsh, M., Lopez-Solanilla, E., Antúnez-Lamas M. and Rodríguez-Palenzuela, P., 2010. Characterization of *Pectobacterium* species from Iran using biochemical and molecular methods **European Journal of Plant Pathology**. 129, 413–425.
- Balogh, B., Jones, J. B., Momol, M. T., Olson, S. M., Obradovic, A., King, P. and Jackson, L. E., 2003. Improved efficacy of newly formulated bacteriophages for management of bacterial spot on tomato. **Plant disease**, 87 (8), 949-954.
- Balogh, B., Canteros, B. I., Stall, R. E. and Jones, J. B., 2008. Control of citrus canker and citrus bacterial spot with bacteriophages. **Plant Disease**. 92 (7), 1048-
- Barras, F., Van Gijsegem, F. and Chatterjee, A.K., 1994. Extracellular enzymes and pathogenesis of soft-rot *Erwinia*. **Annu. Rev. Phytopathol.** (32), 201-234.
- Baykal, N. and Oktem, Y. E., 1978. Investigations on the isolation of the potato black leg pathogen (*Erwinia atroseptica* van Hall) and its biological and serological characteristics. **Journal of Turkish Phytopathology**. 7 (2/3), 83-90.
- Benlioğlu, K., 1991. Bolu, Nevşehir ve Niğde İllerinde Patates Üretim Alanlarında *Erwinia* spp."nin Yaygınlık Oranları, Tanılanması ve İnokulum Kaynakları Üzerinde Araştırmalar, Doktora Tezi, **Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, İzmir.

- Bora, T. ve H. Özaktan, 1998. **Bitki hastalıklarıyla biyolojik savaş**. Prizma Matbaası. İzmir. 205 s.
- Borah, P.K., Jindal, J.K. and Verma, J.P., 2000. Integrated management of bacterial leaf spot of mungbean with bacteriophages of Xav and chemicals. **Journal of Mycology and Plant Patholog**, 30 (1),19–21.
- Boulé, J., Sholberg, P.L., Lehman, S.M., O'gorman, D.T. and Svircev, A.M., 2011. Isolation and characterization of eight bacteriophages infecting *Erwinia amylovora* and their potential as biological control agents in British Columbia, Canada, *Canadian Journal of Plant Pathology*, 33:3, 308-317.
- Boyras, N., Bastas, K.K., Maden, S. and Yasar. A. 2006. Bacterial leaf and peduncle soft rot caused by *Pectobacterium carotovorum* on tulips in Konya, Turkey. **Phytoparasitica** 34 (3), 272-280.
- Bozkurt, İ.A., 2009. Fasulye bakteriyel yanıklık hastalığına (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*) karşı antagonist bakterilerle mücadele olanakları. Doktora Tezi, **Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Ens., Bitki Koruma ABD**, 152 s.
- Bozkurt, İ.A. ve Soylu, S. 2019. Elma kök uru hastalığı etmeni *Rhizobium radiobacter*'e karşı epifit ve endofit bakteri izolatlarının antagonistik potansiyellerinin belirlenmesi. **Journal of Tekirdag Agricultural Faculty** (Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi), 16 (3), 348-361.
- Bozkurt, İ.A., Soylu S., Kara, M., Doksöz, S.F., Altan, B. and Çarpar, H., 2023. Molecular characterisation of stem gall disease caused by *Agrobacterium tumefaciens* (= *Agrobacterium* biovar 1) on Citrus trees as a new host, in the Eastern Mediterranean region of Turkey. **Journal of Plant Diseases and Protection**, 130, 13-21.
- Bremer, H., Ismen, H., Karel, G., Ozkan, H. ve Ozkan, M., 1947. Contribution to the knowledge of the parasitic fungi of Turkey, **Istanbul Üniversitesi. Fakültesi Mecmuası. Seri B**, 12, 307-334.
- Brenner, D.J., Fanning, G. R. and Steigerwalt, A. G., 1973. Deoxyribonucleic acid relatedness among *Erwiniae* and other *Enterobacteriaceae*: the gall, wilt and dry-necrosis organisms (Genus *Erwinia* Wonslow et al. sensu stricto). **International Journal of Systematic Bacteriology**. 24, 197-204.
- Bugaeva, E.N., Voronina, M.V., Vasiliev, D.M., Lukianova, A.A., Landyshev, N.N., Ignatov, A.N. and Miroshnikov, K.A., 2021. Use of a Specific Phage Cocktail for Soft Rot Control on Ware Potatoes: A Case. **Viruses**. 13, 1095.
- Cappucino, J.C. and Sherman, N., 2013. **Microbiology: A laboratory Manuel**, International. **Pearson Higher Ed**,
- Castric, P.A., 1977. Glycine metabolism by *Pseudomonas aeruginosa* hydrogen cyanide biosynthesis. **Journal of Bacteriology**. 130 (2), 826-831.
- Cemen, Ç., Saygil, H., Horuz. S. ve Aysan, Y., 2018. Potential of Bacteriophages to Control Bacterial Speck of Tomato (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*). **Fresenius Environmental Bulletin**. 27,9366-9373.
- Cetinkaya-Yildiz, R., Mirik, M., Aysan, Y., Kusek, M. and Sahin, F., 2004. An outbreak of bacterial stem rot of *Dieffenbachia amoena* caused by *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* in the Eastern Mediterranean region of Turkey. **Plant Disease**. 88, 310-311.
- Charkowski, A., 2006. The soft rot *Erwinia*. **Plant-Associated Bacteria**. 423-505, Netherlands.

- Charkowski, A. O., 2018. The changing face of bacterial soft rot diseases. **Annual Review of Phytopathology**. 56, 269–288.
- Chen, Y., Bo-Fan, J., Du, L., Xu, H., Hai Zhang, Q. and Qiu He, Y., 2014. The application of phosphate solubilizing endophyte *Pantoea dispersa* triggers the microbial community in red acidic soil. **Applied Soil Ecology**. 84, 235–244.
- Choi, J. E., Han, K. S. and Yu, S. J., 1989. Identification of bacteria causing soft rot disease of carrot. **Korean Journal of Plant Pathology** 5, 349–353.
- Chung, B. S., Aslam, Z., Kim, S. W., Kim, G. G., Kang, H. S., Ahn, J. W. and Ryun, Y., 2008. A bacteria endophyte, *Pseudomonas brassicacearum* YC5480, isolated from root of *Artemisia* sp. producing antifungal and phytotoxic compound. **Plant Pathol. Journal**. 24 (4), 461–468.
- Civerolo, E.L. and Kiel, H.L., 1969. Inhibition of bacterial spot of peach foliage by *Xanthomonas pruni* bacteriophage. **Phytopathology**. 59, 1966–1967.
- Coons, G. H., 1925. The transmissible lytic principle (bacteriophage) in relation to plant pathogens.
- Cui, L., Yang, C., Jin, M., Wei, L., Yang, L. and Zhou, J., 2021. Identification and biological characterization of a new pathogen that causes potato scab in Gansu Province, China. **Microbial Pathogenesis**. 161, 105276.
- Cui, W., He, P., Munir, S., He, P., He, Y., Li, X., Yang, L., Wang, B., Wu, Y. and He, P., 2019. Biocontrol of Soft Rot of Chinese Cabbage Using an Endophytic Bacterial Strain. **Frontiers in microbiology**. 10, 1471.
- Çabuk, T.Ş., 2014. Ankara İli Havuç (*Daucus carota* L. subsp. *sativus*) Üretim Alanlarında Verimi ve Kaliteyi Olumsuz Yönde Etkileyen Sistemik Hastalıkların Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. **Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalı Tekirdağ**. 48 syf.
- Çakmakçı, R., Erat, M., Erdoğan, Ü. and Dönmez, F., 2007. The influence of plant growth promoting rhizobacteria on growth and enzyme activities in wheat and spinach plants. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**. 170, 288–295.
- Dadaşoğlu, F. ve Kotan, R., 2014. Artvin, Erzincan, Erzurum ve Iğdır İllerinde Bazı Meyve ve Sebzelerde Yumuşak Çürüklüğe Sebep Olan Bakterilerin Klasik Ve Moleküler Yöntemler ile Karakterizasyonu. **Türkiye V. Bitki Koruma Kongresi**, 3-5 Şubat 2014, Antalya.
- Davis, R.M. and Raid, R.N., 2002. Crown, Root and Wilt Diseases Compendium of Umbelliferous **Crop Diseases**: 25–40.
- Davidsson, P.R., Kariola, T., Niemi, O. and Palva, E.T., 2013. Pathogenicity of and plant immunity to soft rot pectobacteria. **Frontiers in plant science**. 4 48399.
- de Haan, E. G., Dekker-Nooren, T. C. E. M. and van den Bovenkamp, G. W., Speksnijder, A. G. C. L., van der Zouwen, P. S., and van der Wolf, J. M. 2008. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* can cause potato blackleg in temperate climates. **European Journal of Plant Pathology**. 122, 561–569.
- Dimas, M.S., Sergio, A.O., Cristian, N.D., Daniel, T.O., Manuel, L.M., Rodolfo, T.A. and Samuel, R.A., 2018. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* causes soft rot and death of *Neobuxbaumia tetetzo* in Zapotitlan Salinas Valley, Puebla, Mexico. **Plant Disease**. 103, 398–403.
- Dinesh, R., Anandaraj, M., Kumar, A., Bini, Y. K., Subila, K. P. and Aravind, R., 2015. Isolation, characterization, and evaluation of multi-trait plant growth promoting rhizobacteria for their growth promoting and disease suppressing effects on ginger. **Microbiological Research**. 173: 34–43.

- Doolotkeldieva, T., Bobusheva, S., Suleymankisi, A., 2016. Biological control of *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* by *Streptomyces* species. **Advances in Microbiology**. 6 (2),104.
- El-habbak, M.H. and Refaat, M.H., 2019. Molecular detection of the causative agent of the potato soft rot, *Pectobacterium carotovorum*, in Egypt and essential oils as a potential safe tool for its management. **Egyptian Journal of Biological Pest Control** 29:1.
- El-Hendawy, H.H. and Abo-Elyousr, K.A.M., 2016. Combination of different antagonistic bacteria to control of potato blackleg disease caused by *Pectobacterium atrosepticum* under greenhouse and field conditions. **International Journal of Phytopathology**. 5 (1), 35-43.
- Elphinestone.J.G. and John G., 2010. Soft Rot and Blackleg of Potato. **Technical Information Bulletin** 21 Aug 1987: 1–8. Web. 26 Oct.
- Endersen, L., O'Mahony, J., Hill, C., Ross, R. P., McAuliffe, O., and Coffey, A., 2014. Phage therapy in the food industry. Annual review of food science and technology, 5, 327-349.
- Etminani, F. and Harighi, B., 2018. Isolation and Identification of endophytic bacteria with plant growth promoting activity and biocontrol potential from wild Pistachio trees. **The plant pathology journal**. 34 (3), 208–217.
- Filiz Doksöz, S., 2020. Hatay İlinde Zeytin Dal Kanseri (*Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*) Hastalığının Tespiti Ve Biyolojik Mücadele Olanaklarının Araştırılması Doktora Tezi **Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü** 96 sayfa.
- Filiz Doksöz, S., and Bozkurt, İ.A., 2022. Biological control of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* causing the olive knot disease with epiphytic and endophytic bacteria. **Journal of Plant Pathology**. (104), 65–78.
- Frampton, R.A., Pitman,A.R., and Peter C. and Fineran, P. C., 2012. Advances in Bacteriophage-Mediated Control of Plant Pathogens. **International Journal of Microbiology**. 2012,
- Francis, F. J., 1985. Pigments and other colorants.**Food chemistry**. 545-584.
- Fujiwara, A., Fujisawa, M., Hamasaki, R., Kawasaki, T., Fujie, M., and Yamada, T., 2011. Biocontrol of *Ralstonia solanacearum* by treatment with lytic bacteriophages. **Applied and Environmental Microbiology**. 77 (12), 4155–4162.
- Fürnkranz, M., Müller, H. and Berg, G., 2009. Characterization of plant growth promoting bacteria from crops in Bolivia. **Journal of Plant Diseases and Protectio**. 116 (4), 149-154.
- Gao, B., Wang, R.Y., Chen, S.L., Ma, J. and Li, X.H., 2016. First report of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* and *P. carotovorum* subsp. *odoriferum* causing bacterial soft rot of sweetpotato in China. **Plant Disease**. 100, 1776.
- Garcia, P., Martinez, B., Obeso, J. M. and Rodriguez, A., 2008. Bacteriophages and their application in food safety. **Letters in applied microbiology**. 47 (6), 479-485.
- Gerayeli, N., Baghaee-Ravari, S. and Tarighi, S., 2018. Evaluation of the antagonistic potential of *Bacillus* strains against *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* and their role in the induction of resistance to potato soft rot

- Geylani Yüzbaşıoğlu, E. ve Aysan, Y., 2021 .Farklı Konukçu Bitkilerden İzole Edilen *Agrobacterium tumefaciens* İzolatlarının Fenotipik ve Genotipik Karakterizasyonu. **Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi**. 18 (2), 247-259.
- Ghadamgahi, F., Tarighi, S., Taheri, P., Saripella, G.V., Anzalane, A., Kalyandurg, P.B., Catara, V., Ortiz, R. and Vetukuri, R.R., 2022. Plant growth promoting activity of *Pseudomonas aeruginosa* FG106 and its ability to act as a biocontrol agent against potato, tomato and taro pathogens. **Biology** 11 (1), 140.
- Gill, J. and Abedon, S.T., 2003. Bacteriophage Ecology and Plants. **APSnet**.
- Gill, J.J., Svircev, A.M., R. Smith R. and A. J. Castle, J., 2003. Bacteriophages of *Erwinia amylovora*, **Applied and Environmental Microbiology**, 69 (4), 2133.
- Glickmann, E. and Dessaux, Y., 1995. A Critical Examination of the Specificity of the Salkowski Reagent for Indolic Compounds Produced by Phytopathogenic Bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**. 61 (2), 793-796.
- Gökçe, A.Y. ve Kotan, R., 2016. Buğday kök çürüklüğüne neden olan *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.)’ya karşı PGPR ve biyoajan bakterileri kullanılarak kontrollü koşullarda biyolojik mücadele imkanlarının araştırılması **Bitki Koruma Bülteni**. 5 (1), 49-75.
- Gracia-Garza, J.A., Blom, T.J., Brown, W. and Allen, W., 2002. Pre- and post-plant applications of copper-based compounds to control *Erwinia* soft rot of *Calla lilies*. **Canadian Journal of Plant Pathology**. 24 (3), 274-280.
- Gundogdu, M. and Karaca, I., 1981. Confirming the factors and the ration of bacterial diseases of potatoes in Izmir and its surroundings and investigation on the reactions of important potato varieties of the region. **Journal of Turkish Phytopathology**, 10 (2/3), 71-78.
- Guttman, B., Raya, R.A. and Kutter. E., 2005. Basic Phage Biology. In Bacteriophages Biology and Applications, E Kutter, A Sulakvelidze (eds), pp. 29-67, **CRC Press, USA**
- Güneş, A., Turan, M., Güllüce, M. and Şahin, F., 2013. Effects of Different Bacteria Application on Solubility of Rock Phosphate. **Toprak Su Dergisi**, 2 (1), 53-61.
- Hadas, R., Kritzman, G., Gefen, T. and Manulis, S., 2001 Detection, quantification and characterization of *Erwinia carotovora* sp. *carotovora* contaminating pepper seeds. **Plant Pathology** 50 (1), 117-123.
- Hallmann, J., Quadt, H.A., Rodrguez, R. and Kloepper, J.W., 1998. Interactions between Meloidogyne incognita and endophytic bacteria in cottonand cucumber. **Soil Biology and Biochemistry**. 30,925-937.
- Hardoim, P. R., van Overbeek, L. S. and Elsas, J. D. V., 2008. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. **Trends in Microbiology**, 16 (10), 463-471.
- Hauben, L., Moore, E.R.B., Vauterinl, L., Steenackers, M., Mergaert1, J., Verdonck, L., and Jean Swings, J., 1998. Phylogenetic Position of Phytopathogens within the *Enterobacteriaceae* **Systematic and applied microbio.gy** 21, 384-397.
- Helias, V., Andrivon, D. and Jouan, B. 2000. Internal colonization pathways of potato plantsby *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. **Plant Pathology**, 49, 33-42.
- Holliday, P., 1989. A dictionary of plant pathology. **Cambridge University Press**, No: 2: Cambridge.

- Ignoffo, C.M. and Garcia, C., 1994. Antioxidant and oxidative enzyme effects on the inactivation of inclusion bodies of the heliothis baculovirus by simulated sunlight-UV. **Environmental entomology**, 23 (4), 1025-1029
- Ishimaru, C.A. and Loper, J. E. 1992. High-affinity iron uptake systems present in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* include the hydroxamate siderophore aerobactin. **Journal of Bacteriology** 174 (9), 2993-3003.
- Issazadeh, K., Rad, S.K., Zarrabi, S. and Rahimibashar, M.R., 2012. Antagonism of *Bacillus* species against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. **African Journal of Microbiology Research**. 6 (7):1615–1620.
- İmriz, G., Özdemir, F., Topal, İ., Ercan, B., Taş, M.N., Yakışır, E. ve Okur, O., 2014. Bitkisel üretimde bitki gelişimini teşvik eden rizobakteri (PGPR)'ler ve etki mekanizmaları. **Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi**. 12 (2), 1-19.
- Jess, S., Kildea, S., Moody, A., Rennick, G., Murchie, A.K. and Cooke, L.R., 2014. European union policy on pesticides: Implications for agriculture in Ireland. **Pest management science**. 70 (11), 1646-1654.
- Jones, J. B., Jackson, L. E., Balogh, B., Obradovic, A., Iriarte, F. B. and Momol, M.T., 2007. Bacteriophages for Plant Disease Control. **Annual Review of Phytopathology**. 45, 245-262.
- Jones, L. R., 1901. A soft rot of carrot and other vegetables caused by *Bacillus carotovorus*, **Vermont Agriculture Experiment Station Annual Report**, 13, 299-332.
- Kamysz, W., Krolicka, A., Bogucka, K., Ossowski, T., J. Lukasiak, J. and Lojkowska, E., 2005. Antibacterial Activity of Synthetic Peptides Against Plant Pathogenic *Pectobacterium* Species. **Journal of Phytopathology** 153 (6), 313-317.
- Kang, H. W., Kwon, S. W. and Go, S. J., 2003. PCR-based specific and sensitive detection of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* by primers generated from a URP- PCR fingerprinting-derived polymorphic band, **Plant Pathology**. 52 (2), 127-133.
- Karaman, M.R., 2012. Bitki Besleme Belemenin Temel İlkeleri. **Bitki Besleme**. 1066s, Ankara.
- Karel, G. ve O. Karahan., 1962. Anadolu Patateslerinde Erken Kuruma Ve Yumru Çürümelerine Sebep Olan Amiller. **Tarım Bakanlığı, Ankara Zirai Mücadele Araştırma Enstitüsü**. Yayın No:42, 26s
- Kasım, R. ve Kasım, M.U., 2019. Renkli Meyve ve Sebzelerin Bileşimi ve İnsan Sağlığı Açısından Önemi. 8. **International Vocational Schools Symposium**. 11-12 June Sinop S:31-39.
- Kaya, H., Aktepe, B.P., ve Aysan, Y., 2023 Domates Bakteriye Solgunluk Hastalığının Kimyasal ve Biyolojik Mücadele Olanaklarının Araştırılması. **Çukurova Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi**. 38 (1), 133-146.
- Kazemi, B., Alymanesh, M. R. and Beigi, S., 2022. 'Isolation of rhizospheric *Pantoea* and *Pseudomonas* bacteria and evaluation of their biocontrol ability against *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* causes of tubers and vegetables rot', **Journal of Vegetables Sciences**,
- Kettani-Halabi, M., Terta, M., Amdan, M., El Fahime, E.M., Bouteau, F. and Ennaji. M.M., 2013. An easy, simple inexpensive test for the specific detection of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* based on sequence analysis of the *pmrA* gene. **BMC Microbiology**. 13:1.

- Kim, H., Kim, M., Jee, S.N., Heu, S. and Ryu S., 2022. Development of a Bacteriophage Cocktail against *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* and Its Effects on *Pectobacterium* Virulence. **ASM Journals/ Applied and Environmental Microbiology**. 88, 19.
- Kloepper, J. W. and Schroth, M. N., 1981. Relationship of in vitro antibiosis of plant growth promoting rhizobacteria to plant growth and the displacement of root microflora. **Phytopathology**, 71, 1020-1024.
- Kumar, A., Pundhir, V.S. and Gupta, K.C., 1991. The role of phenols in potato tuber resistance against soft rot by *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. **Potato Research**. 34 (1), 9-16.
- Küçükdoğan, Y., Bayrak, R., Esmer, E. ve Başaran, P., 2021. Gıda Teknolojilerinde İnovatif Bir Yaklaşım Olarak “Bakteriyofajlar”. **Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi**, 27, 6-16.
- Lang, J.M., Gent, D.H. and Schwartz, H.F., 2007. “Management of *Xanthomonas* leaf blight of onion with bacteriophages and a plant activator, **Plant Disease**. 91, (7), 871–878.
- Lavanya, S., Muthulakshmi, P., Johnson, I., Poorniammal, R., and Usha Nandhini Devi, H. 2023 Morpho-molecular Characterization of Carrot Soft Rot Incitant, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* **International Journal of Environment and Climate Change**. 10 (13), 659-669.
- Crosby, T., 2006. Carrot purple leaf: A new spiroplasmal disease associated with carrots in Washington State. **Plant Disease**. 90, 989-993.
- Lee, J. H., Shin, H., J, Malhotra, S., Kumar, M., Ryu, S. and Heu, S., 2012. Complete Genome Sequence of Phytopathogenic *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* Bacteriophage PP1. **Journal of Virology**. 86 (16), 8899-8990.
- Leiminger, J., Frank, M., Wenk, C., Poschenrieder, G., Kellermann, A. and Schwarzfischer, A., 2013. Distribution and characterization of *Streptomyces* species causing potato common scab in Germany. **Plant Pathology**. 62 (3), 611-623.
- Lelliott, R. A. and Stead, D. E., 1987. Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. **In: Blackwell Scientific Publications, Oxford**, 216pp
- Lelliott, R. A. and Dickey, R. S.: Genus VII. *Erwinia* Winslow, Broadhurst, Buchanan, Krumwiede, Rogers and Smith 1920, p. 469-476. In: Bergey's manual of systematic bacteriology, vol. 1, (N. R. KRIEG and J. G. HOLT, eds.), Baltimore, Williams and Wilkins 1984.
- Lim, J. A., Jee, S., Lee, D. H., Roh, E., Jung, K., Oh, C. and Heu, S., 2013. Biocontrol of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* using bacteriophage PP1. **J Microbiol Biotechnol**. 23 (8), 1147-1153.
- Lim, J.A., Shin, H., Lee, D.H., Han, S.W., Lee, J.H., Ryu, S and Heu, S., 2014. Complete genome sequence of the *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* virulent bacteriophage PM1 **Archives of Virology**. 159, 2185–2187.
- Lin, D. M., Koskella, B. and Lin, H. C., 2017. Phage therapy: An alternative to antibiotics in the age of multi-drug resistance. **World journal of gastrointestinal pharmacology and therapeutics**, 8(3), 162.
- Lui, R.H., 2013. Health-Promoting Component of Fruit And Vegetables in the Diet. **American Society for Nutrition**. 4, 384-392.
- Ma, B., Hibbing, M. E., Kim, H.-S., Reedy, R. M., Yedidia, I., Breuer, J., Breuer, J., Glasner, J. D., Perna, N. T. and Kelman, A., 2007. Host range and molecular

- phylogenies of the soft rot enterobacterial genera *Pectobacterium* and *Dickeya*. **Phytopathology**. 97, 1150–1163.
- Maisuria, V.B., Gohel, V., Mehta, A.N., Patel, R.R. and Chhatpar, H.S., 2008 Biological control of Fusarium wilt of pigeonpea by *Pantoea dispersa*, a field assessment **Annals of Microbiology**. 58 (3), 411–419.
- Mallmann W.L., Hemstreet C.J., 1924. Isolation of an inhibitory substance from plants. **Journal of Agricultural Research**. 28 (6), 599–602.
- McKenna, F., El-Tarabily, K.A., Hardy, G. E. S. T. J. and Dell, B., 2001 “Novel in vivo use of a polyvalent *Streptomyces* phage to disinfect *Streptomyces scabies*-infected seed potatoes,” **Plant Pathology**. 50 (6). 666–675,
- McNeil, D.L., Romero, S., Kandula, J., Stark, C., Stewart, A. and Larsen, S., 2001. “Bacteriophages: a potential biocontrol agent against walnut blight (*Xanthomonas campestris* pv. *juglandis*),” **New Zealand Plant Protection** 54, 220–224.
- Mirik, M., Aysan, Y. ve Çınar, Ö., 2008. Biological Control of Bacterial Spot Disease of Pepper with *Bacillus* Strains **Turkish Journal of Agriculture and Forestry** 32, 381–390.
- Kyaw, E. P., Lynn, T. M., Thant, S., Aung, N. N., Oo, N. N., Win, K. K. and Yu, S. S. 2022. Identification and Characterisation of the Salt Tolerant Phosphate-Solubilising Bacterial Isolates for Enhancing Soil Fertility. **Asia-Pacific Journal of Rural Development**. 32 (1), 37–53.
- Mohammad-Nejad Aghdam, N., Baghaee-Ravari, S. and Shiri, A., 2024. Weeds Associated Bacterial Endophyte Producing Pantocin against *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* **Journal of Agricultural Science and Technology**. 25 (5), 1443–1454.
- Moretti, C., Fakhr, R., Cortese, C., De Vos, P., Cerri, M., Geagea, L., Cleenwerck, I. and Buonauro, R., 2016. *Pectobacterium aroidearum* and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* as causal agents of potato soft rot in Lebanon. **European Journal of Plant Pathology**. 144, 205–211.
- Muturi, P., Yu, J., Li, J., Jiang, M., Maina, A.N., Kariuki, S. and Wei, H. 2018 Isolation and characterization of pectolytic bacterial pathogens infecting potatoes in Nakuru County, Kenya. **Journal of Applied Microbiology**. 124 (6), 1580–1588.
- Muturi, P., Yu, J., Maina, A.N., Kariuki, S., Francis B. Mwaura, F.B. and Wei, H.W. 2019 Bacteriophages Isolated in China for the Control of *Pectobacterium carotovorum* Causing Potato Soft Rot in Kenya **Virologica Sinica** 34:287–294.
- Nagy, E., Maier, T., Terhes, G. and Kostrzewa, M., 2009. Species identification of clinical isolates of Bacteroides by matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **Clinical Microbiology and Infection**. 15 (8), 796–802.
- Naligama, K.N. and Halmillawewa, A.P., 2022a. *Pectobacterium* spp. isolated from rotting carrots obtained from markets in Gampaha district, Sri Lanka exhibit the potential of having broad host ranges. **European Journal of Plant Pathology**. 163, 841–852.
- Naligama, K.N. and Halmillawewa, A.P. 2022b *Pectobacterium carotovorum* Phage vB_PcaM_P7_Pc Is a New Member of the Genus Certevirus **ASM Journals /Microbiology Spectrum**. 10 (6).
- Nejad Aghdam, N.M., Baghaee-Ravari, S. and A. Shiri, A., 2024. Weeds Associated Bacterial Endophyte Producing Pantocin against *Pectobacterium carotovorum*

- subsp. *carotovorum*. **Journal of Agricultural Science and Technology** 25 (5),1443-1454.
- Nigam, A., Gupta, D. and Sharma, A., 2014. Treatment of infectious disease: beyond antibiotics. **Microbiological research**. 169 (9-10),643-651.
- Obradovic, A., Jones, J.B., Momol, M.T., Balogh, B. and Olson, S.M., 2004. "Management of tomato bacterial spot in the field by foliar applications of bacteriophages and SAR inducers, **Plant Disease**, 88 (7), 736–740.
- Onkendi, E. M., & Moleleki, L. N. (2014). Characterization of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* and *brasiliense* from diseased potatoes in Kenya. **European Journal of Plant Pathology**, 139, 557–566.
- Ötleş, S. ve Atılı, Y., 1997. Karotenoidlerin İnsan Sağlığı Açısından Önemi. **Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi**. 3 (1), 249-254.
- Öztürk, A., 1997. Sulama Suyu Tuzluluğu ve Tabansuyu Derinliğinin Havuç Bitkisinin Bazı Özelliklerine Etkisi **Tarım Bilimleri Dergisi**, 3 (1), 54-58.
- Öztürk, M., 2017. Orta Karadeniz Bölgesinde Patateste Sorun Olan *Pectobacterium* ve *Dickeya* spp. Bakteriyel Etmenleri Üzerine Araştırmalar. **Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalı Doktora Tezi** 150 Syf.
- Öztürk, M. ve Soylu, S., 2022 Yozgat İli Beyaz Baş Lahana Üretim Alanlarında Bakteriyel Yumuşak Çürüklük Hastalığına Neden Olan *Pectobacterium* İzolatlarının Tanılanması. **Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi**. 25 (3), 495-503.
- Özyılmaz, Ö. ve Benlioğlu, K., 2012. Fosfat çözen bakterilerin pamuk bitkisinin gelişimine ve *Verticillium* solgunluğuna etkileri. **Türkiye Biyolojik Mücadele Dergisi**. 3 (1), 47-62.
- Özyılmaz, Ü., 2019 Biberde Phytophthora Yanıklığına Karşı Antagonist Bakterilerle Biyolojik Mücadele **Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi** 29 (4), 652-661.
- Panebianco, S., Lombardo, M. F., Anzalone, A., Musumarra, A., Pellegriti, M. G., Catara, V. and Cirvilleri, G., 2022. Epiphytic and endophytic microorganisms associated to different cultivar of tomato fruits in greenhouse environment and characterization of beneficial bacterial strains for the control of post-harvest tomato pathogens. **International Journal of Food Microbiology**. 379 (52)
- Patel, G., Singh, S., Sunit Kumar Saxena, S.K. and Kaur, K.J., 2016. Isolation, Biochemical Characterization and Production of Biofertilizer from *Bacillus megaterium*. **International Journal Life. Science Scienti. Resarcer**, 2(6): 749-752.
- Pavlovic, M, Konrad, R, Iwobi, A.N., Sing, A., Busch, U. and Huber, I., 2012. A dual approach employing MALDITOF MS and real-time PCR for fast species identification within the *Enterobacter cloacae* complex. **FEMS Microbiology Letters** 328, 45-53.
- Perombelon, M. and Kelman, A., 1980. Ecology of the Soft Rot Erwinia. **Annual Review of Phytopathology**. 18, 361-387.
- Perombelon, M.C.M. and Hyman, L.J. 1989. Survival of soft rot coliforms, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* and *E. carotovora* subsp. *atroseptica* in soil in Scotland. **Journal of Applied Bacteriology**. 66 (2), 95-106.
- Ragavi, G., Muthamilan, M., Nakkeeran, S., Kumaravadivel, N., Sivakumar, U. and Suganthi, A., 2019 Molecular Detection of the Causative Agent of Soft Rot

- (*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*) in Banana (*Musa* sp.) **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**. 8 (11), 1854-1868.
- Ranjani, P., Gowthami, Y., Gnanamanickam, S. S. and Palani, P., 2018. Bacteriophages: A new weapon for the control of bacterial blight disease in rice caused by *Xanthomonas oryzae*. **Microbiology and Biotechnology Letters**. 46 (4), 346-59.
- Ravensdale, M., Blom, T.J., Gracia-Garza, J.A., Svircev, A.M. and Smith, R.J., 2007. Bacteriophages and the control of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. **Canadian Journal of Plant Pathology** 29 (2), 121-130.
- Rubatzky, V.E., Quiros, C.F. and Simon, P.W. 1999. Carrots and related vegetable Umbelliferae . **CAB Publishing Company**, 294p.
- Saygılı, H. ve Erkan, S., 1985. Bakteriyofajların İzolasyonu ve Saflaştırılması. In: Domateslerde Bakteriyel Hastalık Etmenlerinin Bakteriyofajlarının İzole Edilmesi ve Tanılamada Kullanılması Üzerine Araştırmalar 9-11. Bornova, İzmir 1985.
- Safadi, B., 2008. Characterization and distribution of *Daucus* species in Syria. **Biologia**, Schaad, N. W., Jones, J. B. and Lacy, G. H., 2001. Gram negative bacteria, *Pseudomonas*. (Schaad, N. W., Jones, J. B., & Chun, W., Editör). In: **In: Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria**. APS Press. St. Paul, No: 3, 84-117, Minnesota. 63 (2), 177-182.
- Samuel, S. and Muthukkaruppan, S.M., 2011. Characterization of plant growth promoting rhizobacteria and fungi associated with rice, mangrove and effluent contaminated soil. **Current Botany** 2 (3), 22-25.
- de Santi Ferrara, F.I., Oliveira, Z.M., Gonzales, H.H.S., Floh, E.I.S. and Barbosa, H.R., 2012. Endophytic and rhizospheric enterobacteria isolated from sugar cane have different potentials for producing plant growth-promoting substances. **Plant Soil**. 353 (1-2), 409–417.
- Schaad, N. W., Jones, J. B., Lacy, G. H., 2001. Gram negative bacteria, *Pseudomonas*. (Schaad, N. W., Jones, J. B., & Chun, W., Editör). In: **In: Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria**. APS Press. St. Paul, No: 3: 84-117, Minnesota.
- Schnabel, E.L. and Jones, A.L., 2001 “Isolation and characterization of five *Erwinia amylovora* bacteriophages and assessment of phage resistance in strains of *Erwinia amylovora*,” **Applied and Environmental Microbiology**, 67 (1), 59–64.
- Schulz, B. and Boyle, C., 2006. What are endophytes? (Schulz, B., Boyle, C., & N., T., Editör). In: *Microbial Root Endophytes*. Springer-Verlag, No: 1-13, Berlin.
- Schwyn, B. and Neilands, J.B., 1997, Universal chemical assay for detection and determination of siderophores, **Analytical biochemistry**. 160 (1), 46-56.
- Sertkaya, G., 2014. Hatay ili havuç alanlarında fitoplazmaların araştırılması. **Türkiye V. Bitki Koruma Kongresi**, 3-5 Şubat, Antalya.
- Singhal, N., Kumar, M., Kanaujia P.K. and Viridi, J.S., 2015. MALDI-TOF MS spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. **Frontiers in Microbiology** 6, 791.
- Soykut, A. E.ve Tunail, N., 2009. Süt Endüstrisinde Sorun Yaratan Termofilik Fajlar. **Gıda** 34 (2), 107-113
- Soylu, E.M., Soylu, S., Kara, M. ve Kurt, Ş., 2020. Sebzelerde sorun olan önemli bitki fungal hastalık etmenlerine karşı vermikomposttan izole edilen mikrobiyomların

- in vitro antagonistik etkilerinin belirlenmesi. **KSÜ Tarım ve Doğa Dergisi**. 23 (1), 7-18.
- Soylu, S., Kara, M., Uysal, A., Kurt, Ş., Soylu, E.M., Üremiş, İ., Sertkaya, E., Bozkurt, İ. A. ve Öztürk, M., 2022. Amik Ovası Havuç Ekim Alanlarında Sorun Olan Fungal ve Bakteriyel Hastalık Etmenlerin Belirlenmesi **KSÜ Tarım ve Doğa Derg** 25 (6),1326-1340.
- Stonier, T., McSharry, J. and . Speitel, T., 1967. *Agrobacterium tumefaciens* Conn. IV. Bacteriophage PB21 and its inhibitory effect on tumor induction, **Journal of Virology**, 1 (2), 268–273.
- Sülü, S.M., Bozkurt, İ.A. ve Soylu, S., 2016. Bitki büyüme düzenleyici ve biyolojik mücadele etmeni olarak bakteriyel endofitler. **Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi**, 21 (1), 103-111.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. and Kumar, S. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular biology and evolution**. 30 (12), 2725-2729.,
- Tanaka Negishi, H. and Maeda, H., 1990. Control of tobacco bacterial wilt by an avirulent strain of *Pseudomonas solanacearum* M4S and its bacteriophage. **Annals of the Phytopathological Society of Japan**. 56 (2), 243–246.
- Tee, E.S., 1992. Carotenoids and Retinoids in Human Nutrition. Critical Reviews in **Food Science and Nutrition**. 31 (1/2),103-163.
- Tekiner, N. ve Kotan, R., 2022. Pathogenicity of Different *Rhizobium radiobacter* (*Agrobacterium tumefaciens*) Isolates and Their Identification with Conventional Methods . **Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi** , 25 (1), 149-157.
- Thomas R.C., 1935. A bacteriophage in relation to Stewart's disease of corn. **Phytopathology**. 25, 371–72.
- Toth, I.K., Bell, K.S., Holeva, M.C. and Birch, P.R., 2003. Soft rot erwiniae: from genes to genomes. **Molecular Plant Pathology** 4,(1). 17–30
- Toth, I. K., Hyman, L. J. and Wood, J. R. 1999. A one step PCR-based method for the detection of economically important soft rot *Erwinia* species on micropropagated potato plants. **Journal of Applied Microbiology**, 87 (1), 158-166.
- Turkensteen, L.J. ve M. Eraslan 1985. Erzurum ve diğer bölgelerde tohumluk yemeklik patateslerde görülen mikoplazma hastalığı ve savaşımlı. **Ege Bölğ Zirai Araştırma Enstitüsü Yayınları**, no. 68 İzmir. 10 s.
- TÜİK. 2022. Sebzelerde yeterlilik derecesi. <https://biruni.tuik.gov.tr/medas/?kn=92&locale=tr>. Erişim tarihi: 10.08.2023.
- Tülek, S. ve Canpolat, S., 2016. Bazı Fungisitlerin Havuçta Külleme (*Erysiphe heraclei* D.C.) Hastalığına Etkileri. **Bitki Koruma Bülteni**. 56 (4), 349–358.
- Ullah, A., Mushtaq, H., Fahad, S.H, Shah, A., Chaudhary, H. J. and Hakima, 2017. Plant growth promoting potential of bacterial endophytes in novel association with *Olea ferruginea* and *Withania coagulans*. **Microbiology**, 86 (1), 119-127.
- Ustaçelebi, Ş, Okuyan, M. ve Odabaşioğlu, N., 1968. T4 R mutant bakteriyofajları ile serolojik deneyler ve normal insan serumlarının faj enfeksiyonunda stimulan etkisi. **Mikrobiyoloji Bülteni**. 4, 131-141.
- Üremiş, İ., Soylu, S., Kurt, Ş., Soylu, E.M. ve Sertkaya E., 2020. Hatay İli Havuç Ekim Alanlarında Bulunan Yabancı Ot Türleri, Yaygınlıkları, Yoğunlukları ve

- Durumlarının Değerlendirilmesi. **Journal of Tekirdag Agricultural Faculty (jotaf)**. 17 (2), 211-228.
- Varhan, R. ve Bozkurt, İ. A., 2021. Maydanoz bakteriyel yaprak leke hastalığı (*Pseudomonas syringae* pv. *apii*) ile biyolojik mücadelede antagonist bakterilerin kullanım olanaklarının araştırılması. **Mustafa Kemal Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi**, 26 (3), 649-660.
- Vasinauskiene, M., Radusiene, J., Zitikaite, I. and Surviliene, E., Res. 2006. Antibacterial activities of essential oils from aromatic and medicinal plants against growth of phytopathogenic bacteria. **Agronomy Research (Special issue)**. 4, 437-440.
- Vessey, J.K., 2003. Plant Growth Promoting Rhizobacteria as Biofertilizers. **Plant and Soil**, 255, 571-586.
- Viswanath, H.S., Rather, R. A., Bhat, K.A. and Peerzada S.H., 2020. Management of post-harvest bacterial soft rot of potato caused by *Pectobacterium carotovorum* using bacterial bio-agents. **The Pharma Innovation Journal** 9 (4), 31-35
- Waldee, E.L., 1945. Comparative studies of some peritrichous phytopathogenic bacteria. Iowa State Coll. **Journal. Science**. 19, 435-484
- Wang, L., Gu, H. and Lu, X., 2012. Rapid low-cost detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase genes by internally controlled real-time PCR. **Journal Microbiol Methods**. 91 (3), 361-363.
- Winslow, C. E. A., Broadhurst, J., Buchanan, R. E., Krumwiede, C. Jr., Rogers, L. A., Smith G. H.: 1920. The families and genera of the bacteria. Final report of the Committee of the Society of American Bacteriologists on characterization and classification of bacterial types. **Journal. Bacterial**. 5, 191-229
- Yaman Aydoğan, D. ve Hadımlı, H.H., 2016. Bakteriyofaj Tedavisi **Etlik Vet Mikrobiyol Dergisi**, 27 (1), 38-47.
- Zhang, W., Luo, Q., Zhang, Y., Fan, X., Ye, T., Mishra, S., Bhatt, P., Zhang, L. and Chen, S., 2020. Quorum Quenching in a Novel *Acinetobacter* sp. XN-10 Bacterial Strain against *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. **Microorganisms**. 8 (8), 11 00.
- Zhang L. and Birch R.G., 2003 Mechanisms of biocontrol by *Pantoea dispersa* of sugar cane leaf scald disease caused by *Xanthomonas albilineans*. **Journal of Applied Microbiology**. 82 (4), 448-482.
- Zhao, Y., 2014. Genomics of *Erwinia amylovora* and related *Erwinia* species associated with Pome fruit trees. In: Gross, D., Lichens-Park, A., & Kole, C. (eds) **Genomics of PlantAssociated Bacteria** (pp. 1-36).
- Zhou, T.T., Chen, D., Li, C.Y., Sun, Q., Liu, F., Shen, Q. and Shen, B., 2012. Isolation and characterization of *Pseudomonas brassicacearum* J12 as an antagonist against *Ralstonia solanacearum* an identification of its anti microbial components. **Microbiological Research**, 167 (7), 388-394.

ÖZGEÇMİŞ

Yazar, ilkokulu Yanıkçay Köyü İlkoku, ortaokul ve liseyi Devrek'te tamamladı. 2004 yılında Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Yüksekokulu Sağlık Memurluğu Bölümünü kazandı. Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi'nden 2008 yılında mezun oldu. 2009 yılında Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Hastanesi'nde hemşire olarak göreve başladı. 2012 yılında Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü'nü kazandı. Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi'nden 2016 yılında mezun oldu, aynı yıl Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Bölümü Fitopatoloji Anabilim Dalında yüksek lisans öğrenimine başladı. Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Bölümü Fitopatoloji Anabilim Dalından 2019 yılında Yüksek Lisans derecesiyle mezun oldu. 2019 yılında Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Bölümü Fitopatoloji Anabilim dalında doktora eğitimine başladı Halen Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Hastanesi'nde hemşire olarak görev yapmaktadır.

EKLER

EK 1 Bakterilerin İzolatlarının Geliştirilmesinde ve Etki Mekanizmalarının Belirlenmesinde Kullanılan Besi Yerleri

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

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

2. Nutrient Agar (NA) (Merck, Darmstadt, Germany. Katalog No:1109899)

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

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

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

4. Modifiye edilmiş Blue CAS Agar (Schwynn ve Neilands, 1987)

Chrome azurol S (CAS)	60.5 mg/L
FeCl ₃ Solusyonu (1 mM FeCl ₃ 6H ₂ O+10 mM HCl)	10 ml/L
HDTMA (hexadecyltrimethylammonium bromide)	72.9 mg/L
Pseudomonas agar F Base (KB) Agar (Merck, Kat. No: 110989)	35 g/L
Glyserol	10 ml/L

Not 1: otoklav sonrası katılaşma sorunu var ise 4 g/L Agar ilave edilebilir.

Not 2: Pseudomonas agar F Base (King B Agar) yerine aşağıdaki karışım kullanılabilir.

Pepton	20 g/L
MsSO ₄ 7H ₂ O	1.5 g/L
K ₂ HPO ₄	1.5 g/L
Glycerol	10 ml/L
Agar	20 g/L

5. **Pikovskaya's Agar (PVK**

Glikoz	20 g/L
Ca ₃ (PO ₄) ₂	5 g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5 g/L
KCl	0.2 g/L
MgSO ₄	0.25 g/L
Yeast Extract	0.5 g/L
Agar	20 g/L