

Özgün makale (Original article)

Fındık bakteriyel yanıklık hastalığının [*Xanthomonas arboricola* pv. *corylina* (Miller et al.) Vauterin et al.] bakteriyel biyoajanlar kullanılarak mücadele imkanlarının araştırılması*

Jose Luis Rodriguez GUTIERREZ¹, Recep KOTAN¹

Evaluation of the biological control of bacterial blight with [*Xanthomonas arboricola* pv. *corylina* (Miller et al.) Vauterin et al.] in hazelnut plantations by using bacterial biocontrol agents

Abstract: *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina* [(Miller et al.) Vauterin et al.], causal agent of the bacterial blight of hazelnut, causes significant losses in the cultivation of hazelnuts in Türkiye and abroad. The cultural measures and the chemical control methods against this pathogen are insufficient. In this study, 314 different bacterial strains were tested for their potential antibacterial activity against the pathogen in Petri dish experiments, and 47 strains were found to be effective. The most effective five bacterial strains were further tested against the growth of the pathogen in broth medium. *Bacillus* sp. K-15b, *Bacillus megaterium* KBA-10, *Bacillus cereus* K-15d and *Bacillus cereus* K-3a strains showed high antibacterial activity against the disease agent. The level of suppression of the disease caused by these strains was also evaluated on two year old hazelnut saplings. These bacterial strains reduced the disease occurrence caused by the pathogen by 73.3%, 73.3%, 80% and 80%, respectively.

Keywords: *Bacillus* sp., biological control, hazelnut, bacterial blight, *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina*

Öz: Fındık bakteriyel yanıklık hastalığına neden *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina* [(Miller et al.) Vauterin et al.] Dünyada olduğu gibi Türkiye’de de fındık yetiştiriciliğinde önemli kayıplara neden olmaktadır. Bu patojene karşı; yapılan kültürel önlemler ve kimyasal mücadele yöntemleri yetersizdir. Bu çalışmada; patojene karşı antibakteriyel aktivitesi için test edilen toplam 314 potansiyel biyoajan bakteri izolatının 47’sinin Petri denemelerinde etkili olduğu tespit edilmiştir. En etkili 5 biyoajan bakteri izolatı sıvı besi ortamında patojen bakteri izolatının gelişimine etkisinin belirlenmesi için test edilmiştir. *Bacillus* sp. K-15b, *Bacillus megaterium* KBA-10, *Bacillus cereus* K-3a ve *Bacillus cereus* K-15d izolatları

¹ Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Erzurum, Türkiye

* Bu çalışma birinci yazarın tez çalışmasından üretilmiştir (This study was produced from the thesis of the first author).

Sorumlu yazar (Corresponding author): rkotan@atauni.edu.tr

ORCID ID (Yazar sırasıyla): 0000-0001-5039-3744, 0000-0001-6493-8936

Alınış (Received): 21 Ekim 2022

Kabul ediliş (Accepted): 20 Ocak 2023

hastalık gelişimine etkisi için test edilmiştir. Bakteri izolatları sırası ile %73.3, %73.3, %80 ve %80 oranında patojenden kaynaklı zararı engellediği belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: *Bacillus* sp., bakteriyel yanıklık hastalığı, biyolojik mücadele, fındık, *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina*

Giriş

Dünya fındık üretiminin yaklaşık %69'unu gerçekleştiren Türkiye'yi sırasıyla İtalya ve Gürcistan takip etmektedir (FAO 2018). Fındıkta teknik ve kültürel uygulamalardaki yetersizlikler yanında zararlılar ve hastalıklar da verim ve kalite kaybına sebep olmaktadır. Fındık bakteriyel yanıklık hastalığının etmeni *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina* (Miller et al. 1949) Vauterin et al. 1995 gerek dünyada gerekse de ülkemizde zaman zaman önemli kayıplara yol açabilmektedir. Patojen ilk olarak Amerika Birleşik Devletleri'nde (Bars 1913), Türkiye'de ise 1971-1972 yıllarda Karadeniz Bölgesi fındık bahçelerinde rapor edilmiştir (Alay et al. 1973).

Patojen stomalardan veya yaralardan bitki içerisine giriş yapabilmekte, dışı çiçeklere polenler yoluyla yayılabilmekte, yıldan yıla sadece kanserli dokular vasıtasıyla geçebilmektedir (Karahan et al. 2013; Karahan 2018). Patojen genç dal ve sürgün gövdeleri üzerinde kansere sebep olurken, ağacın daha kalın dalları ve gövdesi üzerinde de lezyonlar oluşturmaktadır. Lezyonlar genellikle 1-4 yaş arası ağaçların gövdelerini kuşatarak onların ölmesine neden olmakta ve gövde enfeksiyonu hastalığın oldukça ciddi bir safhasını oluşturabilmektedir. Lezyonlar genellikle kabukla sınırlı kalmaktadır fakat ksilem dokusunda bazen zarar görülebilmektedir (Miller et al. 1949; Pulawska et al. 2010; Karahan 2018). Sürgün enfeksiyonu ekonomik olarak oldukça önemlidir, çünkü ölen sürgünlerin birçoğunu potansiyel meyve dalları oluşturmaktadır (Lamichhane & Varvaro 2014). Meyvelerdeki hastalık oluşturan lezyonlar, kahverengi veya siyah yüzeysel yağlı lekeler şeklinde olmakta fakat enfeksiyon zamanla ilerleyince bu lekeler çökük bir hal almaktadır. (Karahan 2018).

Bakteriyel yanıklık hastalığının enfeksiyon şiddeti, yanlış kültürel mücadelenin ve iklim koşullarının neden olduğu stres ile yüksek oranda ilişkilidir. Özellikle ilkbahar donu, kuraklık ve kış budaması gibi stres faktörleri bitkilerde hastalık şiddetini artırmaktadır (Moore et al. 1974). Etmenin bulaştığı bitki parçalarını yok ederek, budama aletlerini dezenfekte ederek, bakırlı preparatlar sprey ederek ve dirençli çeşitler kullanılarak hastalık kısmen kontrol edilebilmektedir (EPPO 2004). Ancak ticari olarak kurulan bahçelerde uzun yıllar boyunca yoğun bakır uygulanması sonucunda, toprakta bakır birikmesi olmuş ve bunun sonucunda olumsuz çevresel etkiler ortaya çıkmıştır.

Son yıllarda kimyasalların kullanımını sınırlandırmak için çok sayıda biyolojik mücadele çalışması yapılarak değişik hastalıkların kontrolünde alternatif yeni yöntemler ve ticari ürünler geliştirilmiştir. *Xanthomonas* cinsine dahil bitki patojeni bakteri türlerine karşı da çok sayıda biyolojik mücadele çalışması vardır (Kotan 1998; Kotan & Şahin 2002; Salah et al. 2007; Khodakaramian et al. 2008; Karagöz & Kotan 2010; Nashwa 2011; Li et al. 2012; Lopes et al. 2012; Chavan et al. 2016; Apet et al. 2018; Sangiogo et al. 2018; Sarkar et al. 2018). Ancak, yapmış olduğumuz

literatür taramasına göre; bugüne kadar *X. arboricola* pv. *corylina*'ya karşı biyolojik mücadele konusunda çalışma yapılmamıştır.

Bu çalışma kapsamında; farklı konukçulardan izole edilmiş bölüm kültür koleksiyonunda bulunan çoğunluğu *Bacillus* (182 izolat) cinsine dahil toplam 314 potansiyel biyoajan bakteri izolatının fındık bakteriyel yanıklık hastalığına karşı biyolojik mücadelede kullanılabilirliği araştırılmıştır.

Materyal ve Yöntem

Çalışmada kullanılan patojen ve potansiyel biyoajan bakteri izolatları ve bitki çeşidi

Patojen bakteri izolatı olarak Giresun'da fındık bahçelerinden izole edilen toplam 6 *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina* izolatı içerisinde virülensliği en yüksek olarak tespit edilen FDN-4 izolatı kullanılmıştır. Patojen bakteri izolatlarının tanısı *Xanthomonas* grubu bakterilerin parlak sarı renkli koloni özellikleri dikkate alınarak Petri ortamından seçilen sarı renkli koloni yapısına sahip izolatların koloni özellikleri, bazı biyokimyasal testleri, HR testi ve patojenite testleri yapılarak doğrulanmıştır. Patojen bakteri izolatları daha sonraki testlerde kullanılmak üzere stok kültürleri yapılarak -20°C'de muhafaza edilmiştir.

Potansiyel biyoajan bakteri izolatı olarak ise daha önce yapılmış olan farklı araştırmalarda yabancı ve kültür bitkilerinin toprak altı veya toprak üstü aksamlarından izole edilen çoğunluğu *Bacillus* (182 izolat) cinsine dahil toplam 314 bakteri izolatı kullanılmıştır (Çizelge 1). Bu izolatların tanısı yağ asidi metil esterlerine göre Microbial Identification Systemde (MIS) yapılmış ve Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü Mikroorganizma Kültür Koleksiyonunda muhafaza edilmektedir (Kotan 1998; Kotan 2002; Karagöz & Kotan 2010). Toplam 314 potansiyel biyoajan bakteri patojene karşı Petri denemelerinde, buradan seçilen 5 izolat sıvı besi yerinde antibakteriyel etkisi için test edilmiş ve buradan seçilen 4 izolat ise *in vivo* çalışmalarında kullanılmıştır. Her bir bakterinin Nutrient Agar (NA) besiyerinde geliştirilen 48 saatlik saf kültüründen bir öze dolusu alınarak, içerisinde 900 µl %30'luk glycerol ve 900 µl LB Broth (1 L dH₂O'ya 10 g tryptone, 10 g NaCl ve 5 g yeast extract ilave edilerek hazırlanmıştır) bulunan Cryogen tüplere aktarılarak etiketlenmiş ve karıştırıcıda karıştırılarak daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere -80°C'de muhafaza edilmiştir. Patojenite, virulanslık ve biyolojik mücadele *in vivo* çalışmalarında ise bölgede en yaygın olarak dikimi yapılan Giresun Yağlısı çeşidinin 2 yaşındaki fındık fidanları kullanılmıştır.

Çizelge 1. Çalışmada kullanılan potansiyel biyoajan bakteri cinsleri ve izolat sayıları
Table 1. Potential bacterial genus bioagent against bacterial blight in hazelnut and the number of strains used in the study

No	Bakteri cinsi	TİS	No	Bakteri cinsi	TİS	No	Bakteri cinsi	TİS
1	<i>Bacillus</i> sp.	182	13	<i>Kocuria</i> sp.	3	25	<i>Brochotrix</i> sp.	1
2	<i>Brevibacillus</i> sp.	25	14	<i>Microbacterium</i> sp.	3	26	<i>Erwinia</i> sp.	1
3	<i>Paenibacillus</i> sp.	14	15	<i>Rhizobium</i> sp.	4	27	<i>Flavobacterium</i> sp.	1
4	<i>Chryseobacterium</i> sp.	12	16	<i>Aeromonas</i> sp.	2	28	<i>Grimontia</i> sp.	1
5	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	8	17	<i>Corynebacterium</i> sp.	2	29	<i>Janthinobacterium</i> sp.	1
6	<i>Artrobacter</i> sp.	7	18	<i>Curtobacterium</i> sp.	2	30	<i>Lysobacter</i> sp.	1
7	<i>Paucimonas</i> sp.	6	19	<i>Micrococcus</i> sp.	2	31	<i>Nisseria</i> sp.	1
8	<i>Pseudomonas</i> sp.	5	20	<i>Paracoccus</i> sp.	2	32	<i>Ralstonia</i> sp.	1
9	<i>Vibrio</i> sp.	5	21	<i>Photobadus</i> sp.	2	33	<i>Sphingobacterium</i> sp.	1
10	<i>Xanthomonas</i> sp.	3	22	<i>Serratia</i> sp.	2	34	<i>Sposarcina</i> sp.	1
11	<i>Citrobacter</i> sp.	3	23	<i>Variovorax</i> sp.	2	35	<i>Virgibacillus</i> sp.	1
12	<i>Enterbacter</i> sp.	3	24	<i>Acidovorax</i> sp.	1	36	<i>Weksella</i> sp.	1
Toplam izolat sayısı								314

TİS: Test edilen bakteri izolat sayıları

Patojen bakteri izolatlarının biyokimyasal testleri

Hastalıklı fındık bitkilerinden izole edilen toplam 19 potansiyel patojen bakteri izolatının içerisinde seçilen parlak sarı dairesel koloniler oluşturanlar toplam 6 bakteri izolatı Potasyum Hidroksit (KOH) (Sands 1990), Yeast Dekstroz Kalsiyum Karbonat Agarda (YDCA) mukoid gelişim (Lelliot & Stead 1987), nişastanın hidrolizi (Lelliot & Stead 1987), %2 ve %5 NaCl Nutrient Agar'da gelişme (Schaad et al. 2001), tütün (*Nicotiana tabacum*) ve domates (*Solanum lycopersicum*) bitkisinde aşırı duyarlılık (HR) (Klement & Goodman 1967) ve vürünlük testine tabi tutulmuştur (Prokic' et al. 2012).

Potansiyel biyoajan bakterilerin biyokimyasal testlerle bazı özelliklerinin belirlenmesi

Katı besiyeri testlerinde etkili olan toplam 47 izolatları potasyum hidroksit testi (KOH) (Sands 1990), azot fiksasyonu testi (Brown et al. 1962), fosfatı çözebilme testi (Cisneros et al. 2017) ve levan testine tabi tutulmuştur (Klement et al. 1990).

Potansiyel biyoajan bakteri izolatlarının katı besiyeri üzerinde hastalık etmenine karşı *in vitro* antibakteriyel etkinliği

Potansiyel biyoajan bakteri izolatları önce katı besi ortamında en virulent patojen izolata karşı test edilmiştir. Dondurulmuş patojen ve potansiyel biyoajan bakteri kültürleri NA besi ortamı içeren Petrilere üç fazlı çizgi ekim yapılmıştır, 27°C'de inkubasyona bırakılarak 48 saatlik taze kültürleri elde edilmiştir. Patojen kültürlerinden steril swap ile alınarak TSA katı besiyeri yüzeyine çizilmiştir. Yine steril swap ile alınan potansiyel biyoajanlar ise petrinin (çap 8.5cm) tam ortasından çizgi ekimle çizilmiştir. Petriler parafilm ile sarılarak 27°C'de 5 gün süreyle inkubasyona bırakılmıştır. Bu sürenin sonunda antibiyosis etki gösterenler için oluşan inhibisyon zonları ve hiperparazitik etkilerinin değerlendirilmesinde ise biyoajan bakteri kolonilerinin Petri yüzeyindeki yayılımı ölçülerek kaydedilmiştir (Kotan 2002). Bu işlem her potansiyel biyoajan bakteri için 3 kez tekrar edilmiştir.

Potansiyel biyoajan bakteri izolatlarının sıvı besiyerinde hastalık etmenine karşı *in vitro* antibakteriyel etkinliği

Katı besiyeri testlerinde en etkili olan 5 biyoajan bakteri izolatı patojene karşı sıvı besiyerinde test edilmiştir. TSB’de geliştirilen 48 saatlik taze bakteri kültürleri steril su ile süspansiyon edilerek elde edilen 10^8 kob/mL yoğunluğunda bakteri süspansiyonları elde edilmiştir. Patojen ve potansiyel biyoajanların 10 ml miktarı 180 ml TSB’a aktarılarak iyice karıştırılmış ve hemen 1 ml örnek alınıp seri dilüsyonları hazırlanarak patojen ve biyoajan bakterilerin ml’deki koloni oluşturan bakteri sayıları elde edilmiştir. İnkübasyona bırakılan bu sıvı kültürlerde 5 gün aralıklarla sayımlar aynı şekilde tekrarlanmıştır. Sayımlarda koloni renklerindeki farklılıklardan faydalanılarak patojen sayısı ve potansiyel biyoajan bakteri sayısı hesaplanmıştır.

Potansiyel biyoajanların fındık bitkisinde *in vivo* hastalık gelişimi üzerine etkinliklerinin belirlenmesi

Sıvı besiyerinde patojen bakteri gelişimini inhibe eden en etkili 4 izolat seçilerek sera koşullarında fındığın iki yıllık fidanlarının yapraklarının üzerinde hastalık gelişimi üzerine etkisini belirlemek için test edilmiştir. Bir gün önce bitkiler sulanmıştır ve yüksek nem sağlamak için plastik torbalarla kapatılmıştır. TSB’de geliştirilen 48 saatlik taze biyoajan kültürleri steril su ile süspansiyon edilerek elde edilen 10^8 kob/mL yoğunluğunda bakteri süspansiyonları elde edilmiştir. Yapraklar hazırlanan bu solüsyonlara batırılıp 3 dakika bekletilmiştir. Biyoajan bakterilerin yapraklara iyice kolonizasyonun sağlamak için ayrı ayrı her bir yaprak plastik poşet içerisine alınarak poşet dip kısmından bağlanmıştır. Biyoajan bakteri uygulamasını takiben 48 saat sonra daha önceden benzer şekilde TSB’de geliştirilen 48 saatlik taze patojen bakteri kültürü steril su ile süspansiyon edilerek elde edilen 10^8 kob/mL yoğunluğunda süspansiyon tüm yapraklara sprey edilmiştir. Bakterilerin yapraklara iyice kolonizasyonun sağlamak için ayrı ayrı her bir yaprak plastik poşet içerisine alınarak poşet dip kısmından bağlanmış ve gerekli bilgiler yazılmıştır. Negatif kontrol uygulamasında sadece steril distil su ve pozitif kontrol uygulamasında ise sadece patojen uygulaması yapılmıştır. Her bir uygulama toplam 6 yaprakta tekrar edilmiştir. Deneme kurulduktan 35 gün sonra yapraklar üzerinde oluşan lezyonlar değerlendirilmiştir.

Oluşan lezyonların derecesini değerlendirme için Ulusal & Aksoy, (2017) oluşturduğu 0-5 skalası kullanılmıştır. Skalaya göre; **0:** Yaprakta hiçbir hastalık belirtisi yok; **1:** Yaprakların %1 ile 20’sinde lezyon var; **2:** Yaprakların %21 ile 40’ında lezyon var; **3:** Yaprakların %41 ile 60’ında lezyon var; **4:** Yaprakların %61 ile 80’inde lezyon var; **5:** Yaprakların %81 ile 100’ünde lezyon var. Uygulamaların etkinliği aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

Uygulamaların etkinliği (%) = (Pozitif kontrol – Uygulama/ Pozitif kontrol) × 100

Sonuçların analizi

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

Bulgular ve Tartışma

Patojen izolatların bazı biyokimyasal ve HR test sonuçları

Hastalıklı fındık bitkilerinden izole edilen toplam 19 potansiyel patojen bakteri izolatı arasından parlak mukoid sarı renkteki kolonilerden seçilen toplam 6 bakteri izolatı ile ilgili bazı biyokimyasal test sonuçları Çizelge 2’de verilmiştir. Bu sonuçlara göre; YDCA besiyerinde parlak mukoid sarı koloni şeklinde gelişme gösteren tüm izolatların KOH testi sonuçları pozitif çıkmıştır. Nişastanın hidroliz testinde FDN-4, FDN-5 ve FDN-12 izolatları pozitif, geri kalan izolatlar ise negatif sonuç vermiştir. %2 ve %5’lik NaCl besiyerinde bütün izolatlar gelişmiştir. HR testlerinde tüm izolatlar domates bitkisinde pozitif, tütün bitkisinde ise FDN-4 ve FDN-12 izolatları dışındaki tüm izolatlar negatif sonuç vermiştir.

Çizelge 2. Çalışmada kullanılan patojen izolatların bazı biyokimyasal ve HR test sonuçları

Table 2. Some biochemical and HR test results of pathogenic strains used in the study

İzolatlar	YDCA’da mukoid gelişme	KOH	Nişastanın hidrolizi	NaCl’de gelişme		HR testi	
				2%	5%	Tütün	Domates
FDN-4	+	+	+	+	+	+	+
FDN-5	+	+	+	+	+	-	+
FDN-6	+	+	-	+	+	-	+
FDN-7	+	+	-	+	+	-	+
FDN-12	+	+	+	+	+	+	+
FDN-15	+	+	-	+	+	-	+

+: Pozitif reaksiyon, -: Negatif reaksiyon

Patojenite ve virülenslik test sonuçları

HR test sonuçlarına göre hem tütünde hem de domateste pozitif reaksiyon gösteren FDN-4 ve FDN-12 izolatları fındık fidanlarında yapraklarda patojenite ve virülenslik testlerine tabi tutulmuştur. Bu testler ile ilgili sonuçlar Çizelge 3’de verilmiştir. Her iki izolatın da patojenite test sonucu pozitif çıkmıştır. FDN-4 izolatı 24 saat sonra, FDN-12 izolatı ise 48 saat sonra yapraklarda nekrotik doku oluşumuna sebep olmuştur. Nekrotik lekenin çapı FDN-4’de 18 mm ve FDN-12’de ise 7 mm olarak ölçülmüştür. Kontrol uygulamasında her hangi bir nekrotik doku oluşumu görülmemiştir. FDN-4 izolatının yapraklarda oluşturduğu ilk lezyon görülme süresi daha kısa ve 15. günde lezyon çapı daha büyük olduğu için *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarında bu izolat kullanılmıştır. FDN-4 izolatının virülenslik testleri ile ilgili görseller Şekil 1’de verilmiştir.

Çizelge 3. Patojen bakteri izolatlarının patojenite ve virülenslik test sonuçları
Table 3. Pathogenicity and virulence test results of pathogenic bacterial strains

Bakteri izolatı	Patojenite testi	Virülenslik testi	
		İlk lezyonların görüldüğü zaman	15. günde lezyon çapı (mm)
FDN-4	+	24. saat	18
FDN-12	+	48. saat	7
Kontrol (sH ₂ O)	-	-	0

+: Pozitif reaksiyon, -: Negatif reaksiyon



Şekil 1. *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina* FDN- 4 izolatının virülenslik test sonuçlarından

Figure 1. Virulence test results for the *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina* FDN-4 strain on hazelnut leaves

Potansiyel biyoajan bakteri izolatlarının katı besiyerinde hastalık etmenine karşı *in vitro* antibakteriyel etkinliği

Katı besiyerinde toplam 314 potansiyel biyoajan bakteri izolatı patojene karşı test edilmiştir. Potansiyel biyoajan bakteri cinslerinin, toplam test edilen (TİS), etkili olan (EİS), hiperparazitik (HEG) veya antibiyosis (AEG) etki gösteren izolat sayıları Çizelge 4’de verilmiştir. Bu sonuçlara göre; test edilen toplam 314 potansiyel biyoajan bakteri izolatından 47’si patojene karşı etkili bulunmuştur. Bu izolatlardan 46’sı hiperparazitik etki gösterirken, geriye kalan 1 izolat ise antibiyosis etki göstermiştir. Toplam etkili olan izolatların %72’sinin *Bacillus* cinsine ait olduğu görülmüştür. İkinci ve üçüncü sırada ise *Brevibacillus* (3 izolat) ve *Stthenotrophomonas* (2 izolat) cinsleri yer almıştır.

Çizelge 4. Petri denemelerinde potansiyel biyoajan bakteri cinslerinin patojene karşı etkinlikleri

Table 4. The activity of bacterial genera as potential biocontrol agents against the hazelnut pathogen, bacterial blight, in Petri dish experiments

Sıra	Biyoajan Bakteri Cinsleri	TİS	EİS	HEG	AEG
1	<i>Bacillus</i> sp.	182	34	34	0
2	<i>Brevibacillus</i> sp.	25	3	3	0
3	<i>Paenibacillus</i> sp.	14	1	1	0
4	<i>Chryseobacterium</i> sp.	12	1	1	0
5	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	8	2	2	0
6	<i>Artrobacter</i> sp.	7	1	1	0
7	<i>Paucimonas</i> sp.	6	1	1	0
8	<i>Pseudomonas</i> sp.	5	0	0	0
9	<i>Vibrio</i> sp.	5	1	1	0
10	<i>Rhizobium</i> sp.	4	0	0	0
11	<i>Citrobacter</i> sp.	3	0	0	0
12	<i>Enterbacter</i> sp.	3	0	0	0
13	<i>Kocuria</i> sp.	3	0	0	0
14	<i>Microbacterium</i> sp.	3	0	0	0
15	<i>Pantoea</i> sp.	3	0	0	0
16	<i>Xanthomonas</i> sp.	3	0	0	0
17	<i>Corynebacterium</i> sp.	2	1	1	0
18	<i>Curtobacterium</i> sp.	2	0	0	0
19	<i>Micrococcus</i> sp.	2	1	0	1
20	<i>Paracoccus</i> sp.	2	0	0	0
21	<i>Photobadus</i> sp.	2	0	0	0
22	<i>Serratia</i> sp.	2	0	0	0
23	<i>Variovorax</i> sp.	2	0	0	0
24	<i>Aeromonas</i> sp.	2	0	0	0
25	<i>Acidovorax</i> sp.	1	0	0	0
26	<i>Erwinia</i> sp.	1	0	0	0
27	<i>Flavobacterium</i> sp.	1	0	0	0
28	<i>Grimontia</i> sp.	1	0	0	0
29	<i>Janthinobacterium</i> sp.	1	0	0	0
30	<i>Lysobacter</i> sp.	1	0	0	0
31	<i>Nisseria</i> sp.	1	0	0	0
32	<i>Ralstonia</i> sp.	1	0	0	0
33	<i>Sphingobacterium</i> sp.	1	0	0	0
34	<i>Sposarcina</i> sp.	1	0	0	0
35	<i>Virgibacillus</i> sp.	1	1	1	0
36	<i>Weksella</i> sp.	1	0	0	0
	Toplam izolat sayıları	314	47	46	1

TİS: Toplam test edilen izolat sayısı, EİS: Etkili olan izolat sayısı, HEG: Hiperparazitik etki gösteren izolat sayısı, AEG: Antibiyosis etki gösteren izolat sayısı

Katı besiyerinde patojene karşı etkili olduğu görülen potansiyel biyoajan bakterilerin hiperparazitik veya antibiyosis etkinliğini gösteren test sonuçları ve bu izolarların bazı biyokimyasal test (KOH, fosfor çözünürlüğü, azot fiksasyonu ve levan oluşumu) sonuçları Çizelge 5’de verilmiştir. Bu sonuçlara göre; etkili olan potansiyel bioajan bakterileri 18’i *Bacillus cereus*, 11’i *Bacillus* sp, 4’ü *Bacillus megaterium*, 3’ü *Bacillus choshinensis*, 2’si *Stenotrophomonas maltophilia* ve 1’er adeti ise *Bacillus psychrosaccharolyticus*, *Chryseobacterium indoltheticum*, *Corynebacterium renale*, *Micrococcus luteus*, *Paenibacillus validus*, *Paucimonas lemoigne*, *Vibrio hollisae* ve *Virgibacillus pantothenicus* olmuştur. Hiperparazitik etki gösterenlerde test edilen bakteri izolatlarının yayılma çapı 8 ile 85 mm arasında değişmiştir. 46 izolat hiperparazitik etki gösterirken sadece 1 izolat (H-33B) antibiyosis etki göstermiştir. Yüksek etkinliğe sahip olan izolatlar; *Bacillus* sp. K-15b, *Bacillus cereus* K-3a, *Bacillus cereus* K-15d ve B-6D ve *Bacillus megaterium* KBA-10 olarak saptanmıştır. Bu izolatların etkinliği diğer izolatların etkinliğinden istatistiksel olarak da önemli çıkmıştır. Bu yüzden sıvı besiyerinde yapılan denemede biyoajan olarak bu izolatlar kullanılmıştır.

Petride test edilen potansiyel biyoajan bakteri izolatları ile ilgili yapılan bazı biyokimyasal test sonuçlarına göre; toplam 6 izolat (K-8e, K-9e, K-9d, K-9b, K-21a) KOH testinde pozitif sonucu göstererek Gram negatif bakteri olarak belirlenmiştir. Geriye kalanlar ise KOH testinde negatif sonuç göstererek Gram pozitif olarak belirlenmiştir. Fosfat çözübilme kabiliyeti açısından toplam 15 izolat (K-8e, K-5e, K-9e, K-9d, H-33B, K-5c, Yonca-3, H-14A, H-47A, K-14b, KBA-10, K-3a, B-6D ve K-15d.) pozitif, geriye kalanlar ise negatif olarak değerlendirilmiştir. Azot fiksasyonu testinde ise toplam 11 izolat (H-32A, K-8e, K-22c, K-5e, H-71A, K-9e, H-38A, H-43B, H-39A, H-33C ve H-18A) negatif sonuç verirken geri kalan 36 izolat pozitif sonuç vermiştir. Levan oluşumu testinde hiçbir izolat pozitif sonuç göstermemiştir.

Çizelge 5. Petri denemelerinde potansiyel biyoajan bakteri izolatlarının patojene karşı antibakteriyel etkileri ve izolatların biyokimyasal test sonuçları
Table 5. Antibacterial effects and biochemical test results for some bacterial strains as potential biological control agents of the pathogen, bacterial blight, in Petri dishes

Hiperparazitik Etki Gösterenler				Biyokimyasal Testler			
Sıra	İzolat	MIS Tanı Sonucu	Yayıma Çapı (mm)*	KOH	F	A	L
1	K-9e	<i>Arthrobacter globiformis</i>	10,0 ± 1,0 ab	+	+	-	-
2	K-9A	<i>Bacillus cereus</i>	14,7 ± 2,5 a-c	-	-	+	-
3	K-14b	<i>Bacillus cereus</i>	37,0 ± 11,4 j-n	-	+	+	-
4	K-3a	<i>Bacillus cereus</i>	57,3 ± 6,4 r	-	+	+	-
5	K-15d	<i>Bacillus cereus</i>	70,0 ± 10,0 s	-	+	+	-
6	H-80A	<i>Bacillus cereus</i>	16,0 ± 1,0 a-d	-	-	+	-
7	H-68A	<i>Bacillus cereus</i>	18,3 ± 3,2 a-g	-	-	+	-
8	H-39A	<i>Bacillus cereus</i>	20,3 ± 1,5 a-i	-	-	-	-
9	H-62A	<i>Bacillus cereus</i>	21,3 ± 3,2 a-i	-	-	+	-
10	H-72A	<i>Bacillus cereus</i>	26,3 ± 1,2 c-j	-	-	+	-
11	K-16b	<i>Bacillus cereus</i>	28,7 ± 6,4 d-k	-	-	+	-
12	H-14A	<i>Bacillus cereus</i>	30,3 ± 1,2 g-l	-	+	+	-
13	K-8c	<i>Bacillus cereus</i>	31,3 ± 4,0 h-m	-	-	+	-
14	H-52C	<i>Bacillus cereus</i>	33,0 ± 1,7 i-n	-	-	+	-
15	K-13d	<i>Bacillus cereus</i>	35,3 ± 4,7 j-n	-	-	+	-
16	H-18A	<i>Bacillus cereus</i>	40,7 ± 4,7 l-o	-	-	-	-
17	K-21b	<i>Bacillus cereus</i>	41,7 ± 12,7 l-p	-	+	+	-
18	H-70B	<i>Bacillus cereus</i>	45,0 ± 6,2 n-q	-	-	+	-
19	K-17c	<i>Bacillus cereus</i>	51,3 ± 15,0 o-r	-	-	+	-
20	KBA-10	<i>Bacillus megaterium</i>	54,3 ± 5,1 r	-	+	+	-
21	B-6D	<i>Bacillus megaterium</i>	60,0 ± 6,6 r-s	-	+	+	-
22	K-5e	<i>Bacillus megaterium</i>	9,3 ± 2,1 ab	-	+	-	-
23	K-5c	<i>Bacillus saccharolyticus</i>	11,3 ± 2,3 ab	-	+	+	-
24	H-22A	<i>Bacillus sp.</i>	53,3 ± 5,1 p-r	-	-	+	-
25	H-32A	<i>Bacillus sp.</i>	8,0 ± 1,0 a	-	-	-	-
26	K-9d	<i>Bacillus sp.</i>	10,7 ± 1,2 ab	+	+	+	-
27	H-38A	<i>Bacillus sp.</i>	11,3 ± 2,1 ab	-	-	-	-
28	H-93C	<i>Bacillus sp.</i>	15,3 ± 0,6 a-c	-	-	+	-
29	Yonca-3	<i>Bacillus sp.</i>	17,3 ± 1,2 a-f	-	+	+	-
30	H-93A	<i>Bacillus sp.</i>	29,7 ± 3,5 e-l	-	-	+	-
31	H-33C	<i>Bacillus sp.</i>	30,0 ± 1,7 f-l	-	-	-	-
32	H-47A	<i>Bacillus sp.</i>	31,3 ± 7,6 h-m	-	+	+	-
33	H-32B	<i>Bacillus sp.</i>	35,7 ± 7,4 j-n	-	-	+	-
34	H-68B	<i>Bacillus sp.</i>	40,0 ± 3,0 l-o	-	-	+	-
35	H-87A	<i>Bacillus sp.</i>	43,7 ± 10,0 m-q	-	-	+	-
36	K-15b	<i>Bacillus sp.</i>	85,0 ± 0,0 t	-	-	+	-
37	K-22c	<i>Brevibacillus choshinensis</i>	9,3 ± 1,5 ab	-	-	-	-
38	H-78A	<i>Brevibacillus choshinensis</i>	16,7 ± 3,2 a-d	-	-	+	-
39	H-48B	<i>Brevibacillus choshinensis</i>	19,3 ± 3,1 a-h	-	-	+	-
40	K-8e	<i>Chryseobacterium indoltheticum</i>	9,0 ± 1,7 ab	+	+	-	-
41	H-90B	<i>Corynebacterium renale</i>	15,3 ± 1,5 a-c	-	-	+	-
42	H-71A	<i>Paenibacillus validus</i>	10,0 ± 1,7 ab	-	-	-	-
43	K-9b	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	17,0 ± 2,0 a-e	+	-	+	-
44	K-21a	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	22,0 ± 1,7 b-i	+	-	+	-
45	H-59B	<i>Vibrio hollisae</i>	12,3 ± 0,6 ab	+	-	+	-
46	H-43B	<i>Virgibacillus pantothenicus</i>	13,0 ± 1,0 ab	-	-	-	-
Antibiyosis Etki Gösterenler				Biyokimyasal Testler			
Sıra	İzolat	MIS Tanı Sonucu	Zon Çapı (mm)	KOH	F	A	L
1	H-33B	<i>Micrococcus luteus</i>	11,0 ± 2,0	-	+	+	-

*Aynı sütun içerisinde aynı harfler ile gösterilen uygulamalar arasında fark önemli istatistik olarak önemli bulunmamıştır (Duncan çoklu karşılaştırma testi, p≤0.01), +: Pozitif reaksiyon, -: Negatif reaksiyon, KOH: Potasyum hidroksit testi, F: fosfat çözünürlük testi, A: Azot fizaksiyonu testi ve L: levan oluşumu testi

Potansiyel biyoajan bakteri izolatlarının sıvı besiyerinde hastalık etmenine karşı *in vitro* antibakteriyel etkinliği

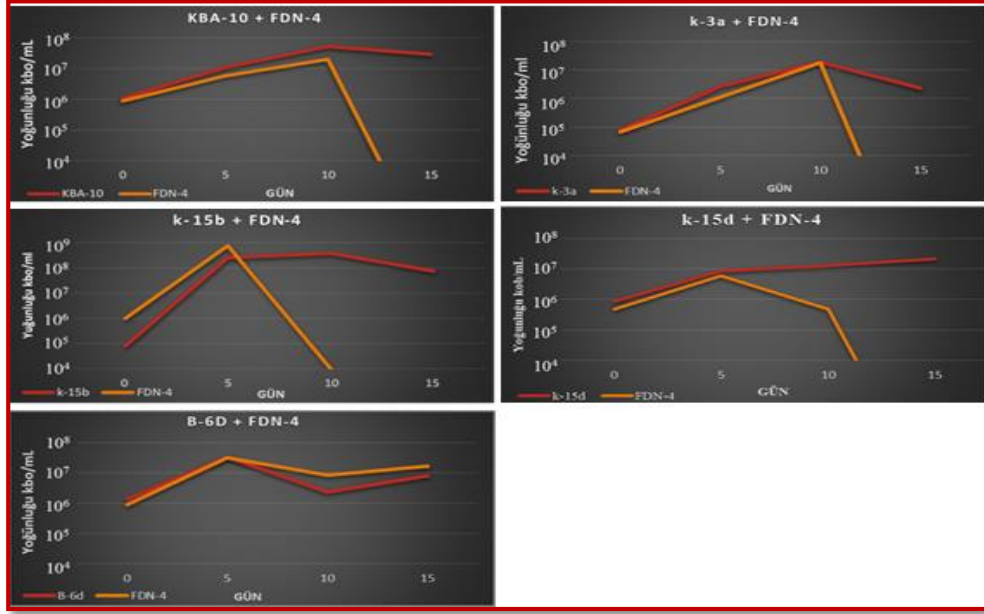
Katı besiyerinde yapılan testlerde yüksek etkiyi gösteren izolatlar; *Bacillus* sp. K-15b, *B. cereus* K-3a, *B. cereus* K-15d ve B-6D ve *B. megaterium* KBA-10 biyoajan bakterisi patojen karşı sıvı besiyerinde test edilmiş ve biyoajanların patojen bakterinin koloni oluşturan bakteri sayısı üzerine etkinliği ile ilgili sonuçlar Çizelge 6'da verilmiştir. Bu sonuçlara göre, başlangıçtaki bütün uygulamalarda hem patojen hem de potansiyel biyoajan bakteriler eşit yoğunlukta ayarlanmıştır. Beşinci günde bütün uygulamalarda hem patojenin hem de potansiyel biyoajanın gelişimi devam etmiştir. Onuncu günde 1, 2, 3, ve 4. uygulamalarda önemli bir değişim olmazken, 3. uygulamada (FDN-4 + K-15b) patojen yoğunluğunda (1×10^4 kob/mL) önemli bir düşüş görülmüştür. On beşinci günde ise 1, 2, 3 ve 4. uygulamalarda patojenin gelişimi tamamen durmuştur. 5. uygulamada ise patojenin gelişimi devam etmiştir.

Çizelge 6. Sıvı besiyerinde patojen ve biyoajan bakteri koloni sayıları

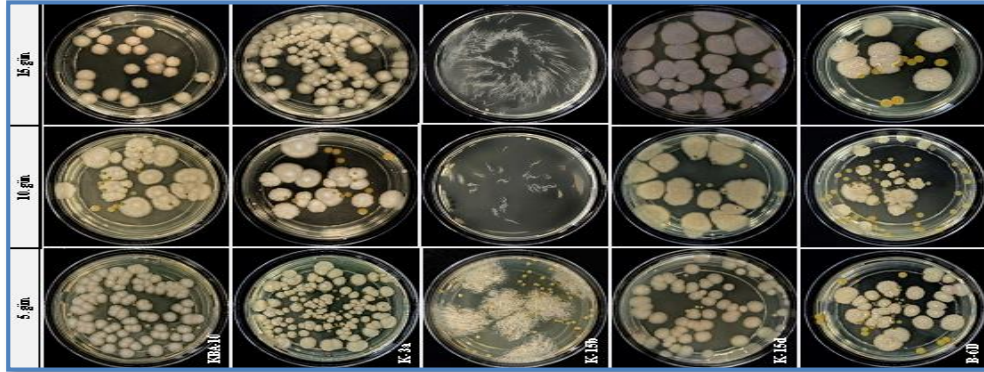
Table 6. Pathogen (bacterial blight) and bioagent bacterial colony counts in broth medium

Uygulamalar	Biyोजan/Patojen	Toplam bakteri sayıları (kob/mL)			
		0. gün	5. gün	10. gün	15. gün
1	KBA-10	10×10^6	11×10^6	52×10^7	29×10^6
	FDN-4	10×10^6	6×10^6	20×10^7	0
2	K-3a	78×10^4	27×10^6	24×10^7	23×10^6
	FDN-4	66×10^4	11×10^6	22×10^7	0
3	K-15b	80×10^4	3×10^8	4×10^8	75×10^6
	FDN-4	98×10^4	8×10^8	1×10^4	0
4	K-15d	40×10^5	42×10^6	65×10^6	1×10^8
	FDN-4	25×10^5	29×10^6	20×10^5	0
5	B-6D	11×10^5	33×10^6	20×10^5	8×10^6
	FDN-4	9×10^5	33×10^6	90×10^5	17×10^6

Bu sonuçlar daha iyi anlaşılması açısından Şekil 2'de grafik olarak ve beşinci, onuncu ve on beşinci günde yapılan sayımlara ait görseller ise Şekil 3'de verilmiştir. Bu denemede, KBA-10, K-3a, k,15b ve K-15d potansiyel bakteri izolatlarının patojen bakterinin gelişmesini 15. günde tamamen engellediği için bu izolatlar *in vivo* denemesinde kullanılmıştır.



Şekil 2. Sıvı besiyerinde patojen ve biyoajan bakteri koloni sayıları
Figure 2. Pathogen (bacterial blight) and bioagent bacterial colony counts in broth medium



Şekil 3. Sıvı besiyerinden yapılan sayımlara ait Petri denemelerindeki görseller
Figure 3. Images of Petri dish trials of bacterial blight bioagent bacterial colony counts in broth medium

Potansiyel biyoajanların fındık bitkisinde *in vivo* hastalık gelişimi üzerine etkinliklerinin belirlenmesi

Sıvı besiyerinde etkili olan 4 bakteri izolatı (*Bacillus* sp. K-15b, *B. cereus* K-3a, *B. cereus* K-15d ve *B. megaterium* KBA-10) fındık fidanlarında yapılan *in vivo* denemelerde hastalık gelişimi üzerine etkisinin test edilmesi için kullanılmıştır. Deneme kurulduktan 36 gün sonra sonuçlar değerlendirilmiş ve bu sonuçlara ait veriler Çizelge 7’de verilmiştir. Bu sonuçlara göre; negatif kontrol olarak kullanılan

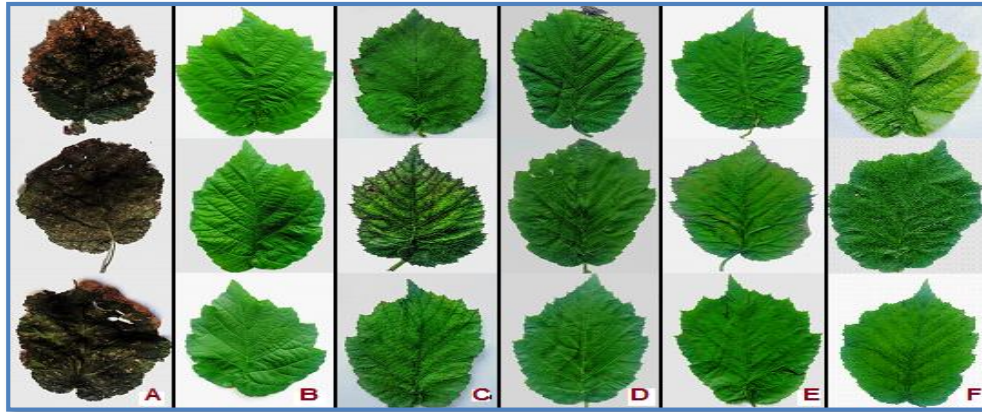
sadece saf su uygulaması yapılan yapraklarda herhangi lezyon oluşmamıştır. Sadece patojen uygulaması yapılan pozitif kontrol uygulamasında ise oluşan lezyonlar yaprağın tüm yüzeyini kaplamıştır. Hastalık skalasına göre yapılan değerlendirmede; biyoajan bakteri uygulaması yapılan yapraklarda hastalık lezyonlarının ortalama skala değeri 1 ile 1,3 arasında değişirken; sadece patojen uygulamasında (pozitif kontrol) bu değer 5 ve negatif kontrol uygulamasında ise 0 olarak değerlendirilmiştir. Biyoajanların hastalık etmeninin gelişiminin engellenmesi üzerine olan etkinliği istatistiki olarak da önemli bulunmuştur. Uygulamalarda *Bacillus* sp. K-15b, *B. cereus* K-3a, *B. cereus* K-15d ve *B. megaterium* KBA-10 izolatlarının yapraklardaki hastalık lezyonlarını sırasıyla %80, %80, %73,3 ve %73,3 oranında azalttığı görülmüştür. Deneme sonuçlarına ait görsel Şekil 4’de verilmiştir.

Çizelge 7. Biyoajan bakteri izolatlarının fındık fidanlarında hastalık şiddeti üzerine etkisi

Table 7. The effect of bioagent bacterial isolates on disease severity in hazelnut seedlings

Uygulamalar	Hastalık skalası*	Hastalık şiddeti üzerine etkinlik oranı (%)
Pozitif kontrol	5,0 ± 0,00 c	0,0
Negatif kontrol	0,0 ± 0,00 a	100,0
k15-d	1,0 ± 0,00 b	80,0
K-3a	1,0 ± 0,58 b	80,0
K-15b	1,3 ± 0,00 b	73,3
KBA-10	1,3 ± 0,58 b	73,3

* Aynı sütun içerisinde aynı harfle gösterilen uygulamalar arasındaki fark önemli değildir (Duncan çoklu karşılaştırma testi, $p \leq 0,01$).



Şekil 4. Biyoajan bakteri izolatlarının fındık fidanlarında hastalık şiddeti üzerine etkisinden (A: Pozitif kontrol, B: Negatif Kontrol, C: KBA-10+FND-4, D: K-3a +FND-4, E: K-15b +FND-4 ve F: K-15d+FND-4)

Figure 4. The effects of potential bioagent bacterial strains on bacterial blight severity on hazelnut seedling leaves (A: Positive control, B: Negative Control, C: KBA-10+FND-4, D: K-3a +FND-4, E: K-15b +FND-4 and F: K-15d+FND-4)

Bulgular ve Tartışma

Bu çalışmada kullanılan *X. arboricola* pv. *corylina* patojen bakteri izolatlarının tanısında; koloni morfolojisi, bazı biyokimyasal testler (KOH, YDCA'da gelişme, %2 ve %5 NaCL'de gelişme ve nişastanın hidrolizi), tütün ve domateste HR testleri ve fındık bitkisinde patojenite testleri yapılmıştır. Bu testlerde elde edilen sonuçlar, EPPO (2004), Pulawska et al. (2010) ve Prokic' et al. (2012)'in çalışmalarındaki sonuçlarla benzerlik göstermiştir. *Xanthomonas* cinsine ait bakterilerde domates bitkisi daha hassas olduğu için bu bitkide yapılan HR testinin daha hassas sonuçlar verdiği belirtilmektedir (Lelliot & Stead 1987). Bu çalışmada da domates bitkisinde yapılan HR testlerinde izolatlar pozitif sonuç verirken, tütün bitkisindeki testlerde sadece iki izolat (FDN-4 ve FDN-12) pozitif sonuç vermiştir.

Bu çalışmada; patojene karşı antibakteriyel aktivitesi için test edilen toplam 314 potansiyel biyoajan bakteri izolatının 47'sinin Petri denemelerinde etkili olduğu tespit edilmiştir. Bunlar içerisinde seçilen en etkili 5 biyoajan bakteri izolatı sıvı besi ortamında da patojen bakteri izolatının gelişimine etkisinin belirlenmesi için test edilmiştir. Sıvı besi ortamında patojen gelişimini engelleyen *Bacillus* sp. K-15b, *Bacillus megaterium* KBA-10, *Bacillus cereus* K-3a ve *Bacillus cereus* K-15d izolatları iki yıllık fındık fidanlarında hastalık gelişimine etkisi için test edilmiş ve sırası ile %73.3, %73.3, %80 ve %80 oranında hastalık şiddeti üzerine etkili olduğu görülmüştür. Biyoajan bakterilerin patojen bakteriye karşı etkinliğinin belirlenmesinde patojen ile biyoajan bakterilerin koloni renklerindeki farklılıktan yararlanılarak yapılacak *in vitro* sıvı besi ortamındaki zamana bağlı olarak toplam koloni sayılarının değişiminin *in vivo* testler için bakteri seçiminde önemli bir yöntem olabileceği düşünülmektedir.

Bacillus türleri fungal hastalıklara karşı çok yaygın şekilde kullanılmaktadır. Ancak bakteriyel patojenlerden *Erwinia amylovora*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas syringae* pv. *phaseoli*, *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* ve *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* gibi önemli bitki patojeni hastalık etmeninin biyolojik mücadelesinde de *Bacillus* cinsine dâhil bakteriyel biyoajanların kullanılabilmesini gösteren çok sayıda çalışmalar bulunmaktadır (Bahadou et al. 2018; Sangiogo et al. 2018; Sarkar et al. 2018; Bouaichi et al. 2019; Duman & Soylu 2019; Bozkurt & Soylu 2019). Bu çalışmada, *in vitro* denemelerinde patojene karşı 36 farklı bakteri cinsine dâhil toplam 314 bakteri izolatı kullanılmış ve etkili olan izolatların %72'sinin *Bacillus* cinsine ait olduğu görülmüştür. Bu çalışmanın sonuçları da biyoajan bakterilerin geniş bir grubunun *Bacillus* cinsinin oluşturduğunu gösteren Dünyadaki diğer çalışmalar ile uyumlu olduğunu göstermektedir.

Biyolojik mücadelede özellikle *Bacillus* türlerinin kullanımı; bu türlerin hızlı bir şekilde çoğalabilmeleri, olumsuz çevresel koşullara oldukça dayanıklı olmaları ve geniş spektrumlu kontrol yeteneği sahip olmalarından kaynaklanmaktadır. *Bacillus* türleri, bitki büyümesini teşvik eden bakteriler içerisinde ilk sıra yer almaktadır. Patojenlere karşı etki mekanizmaları incelenirse; sistemik dayanıklılığı teşvik etmekte, yer ve besin için yüksek rekabet kabiliyetine sahip olup farklı kimyasal yapıda antimikrobiyal bileşikler (lipopeptitler, antibiyotikler ve enzimler) üretebilmektedirler (Jamil et al. 2017). *Bacillus* türleri içeren çok sayıda ticari ürün

bulunmaktadır. Bu ticari ürünlere örnek olarak Companion, Subtilex, Kodiak, Rhizo-Plus ve Quantum 4000 verilebilir (Bora & Ozaktan 1998; Kotan et al. 2009).

Bu çalışmada etkili olan iki *B. cereus* izolatının farklı bitki patojenlerine karşı biyoajan özellik gösterdiğini belirten başka çalışmalar da bulunmaktadır (Savini 2016). Sistemik dayanıklılığın teşvik edilmesi biyolojik mücadelede önemli mekanizmalardan birisidir. Yapılan bir çalışmada; *B. cereus* AR156 izolatının *Arabidopsis thaliana* bitkisinde *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*' ya karşı sistemik dayanıklılığı teşvik ettiği gözlenmiştir (Niu et al. 2015). İleride yapılacak çalışmalarda bu bakteri izolatlarının fındıkta sistemik dayanıklılık mekanizması üzerine bir etkisinin olup olmadığının da ayrıca araştırılması gerekir. *B. cereus*; toprakta, bitkilerde, böceklerde ve hemen hemen her yerde bulunmaktadır. Temel olarak gıda zehirlenmesine ve göz enfeksiyonlarına neden olan bir türdür. Bu çalışmada potansiyel biyoajanların tanısı Mikrobiyal Identifikasyon Sistemi (MIS) kullanılarak yapılmıştır. Bu tanı sistemi yağ asidi metil esterlerine göre tanı yapan bir sistem olup cins düzeyinde yapılan tanıda büyük bir doğruluk oranına sahip olduğu ancak tür düzeyinde çok güvenilir tanı sonucu vermediği bilinmektedir. Bu yüzden çalışmada *in vivo* denemelere tabi tutulan ve orada etkili sonuç veren bakteri izolatları ile ilgili tanıya yönelik çalışmaların detaylandırılması gerekir. Yine ileride yapılacak toksikoloji ve ekotoksikolojik çalışmalar da bu çalışmada etkili bulunan dört farklı bakteri izolatı içerisinde hangisinin ticari formülasyon haline getirilmesi gerektiği konusunda önemli fikirler verecektir.

Bu çalışmanın *in vivo* denemesinde %73,3 oranında etki gösteren *B. megaterium* KBA-10 izolatının yapılan bir başka çalışmada; *Xanthomonas axonopodis* pv. *vitiensis*'in sebep olduğu marul yaprak lekeli hastalığını %77,7 oranında engellendiği saptanmıştır (Karagoz & Kotan 2010). Yapılan bir diğer çalışmada; bu biyoajan bakteri izolatının da içerisinde bulunduğu çoklu bakteriden oluşan bir formülasyonun domates öz nekrozuna karşı etkili olduğu belirlenmiştir (Aktaş & Kotan 2015). Bu çalışmalar *B. megaterium* KBA-10 izolatından geliştirilecek bir ticari formülasyonun oldukça geniş spektrumlu olabileceği, birçok hastalığın kontrol edilmesinde kullanılabileceğini göstermektedir.

Dünyada ve Türkiye'de *X. arboricola* türünün farklı patovaryantlarına karşı yapılan biyolojik mücadele çalışmaları bulunmaktadır. Ninot et al. (2002), tarafından yapılan bir çalışmada; ceviz bakteriyel yanıklığı hastalığına sebep olan *X. arboricola* pv. *juglandis* ile kimyasal mücadelede azaltılmış ilaç denemeleri ile standart ilaç denemelerinin etkinliği karşılaştırılmıştır. Araştırma sonucunda azaltılmış ilaçlama programlarının standart ilaç programları ile aynı ya da daha iyi sonuç verdiği belirlenmiştir. Yörük ve Mirik (2021) tarafından yapılan bir diğer çalışmada; *X. arboricola* pv. *juglandis*'e karşı potansiyel 109 biyoajan bakteri izolatının *in vitro* koşullarda etkileri araştırılmıştır. Araştırma sonucunda, 80 adet izolatın farklı ölçüde inhibasyon zonu oluşturduğu, 37 adet izolatın ise patojen gelişimini tamamen engellediği tespit edilmiştir. Erdal (2011) tarafından yapılan başka bir çalışmada; 28'i sağlıklı ceviz ağaçlarından izole edilen toplam 34 bakteriyel antagonist *X. a.* pv. *juglandis*'e karşı *in vitro* ve *in vivo* koşullarda test edilmiştir. Sağlıklı ceviz ağaçlarından izole edilen *P. fluorescens* izolatları hem ceviz meyve testinde hem de ceviz fidanlarında bu patojene karşı etkili bulunmuştur. *P. fluorescens* WH-48/1a ve *P. fluorescens* +WH-68 bakteri izolatlarından oluşan kombinasyonun bu bakterilerin

tek başına yapılan uygulamalarına oranla daha etkili olduğu saptanmıştır. Referans biyolojik preparat olarak testlenen *Pantoea vagans* izolat C9-1 (syn. *P. agglomerans* C9-1, BlightBan C9-1) ise 3 farklı ceviz çeşidine ait fidanlarda ve koparılmış ceviz meyvelerinde hastalığı engellemiştir. Bir diğer çalışmada; *X. arboricola* pv. *pruni*'ye karşı *Pseudomonas aeruginosa* tarafından üretilen metabolitlerin antibiyotik aktivitesi *in vitro* ve sera koşullarında test edilmiş ve bu patojenin mücadelesinde kullanılabilmesi saptanmıştır (Silva Vasconcellos et al. 2014). Kawaguchi et al. (2014) tarafından yapılan bir çalışmada ise; patojenik olmayan *Xanthomonas campestris* izolatlarının iki farklı süspansiyonu *X. arboricola* pv. *pruni*'ye karşı seftali ağaçlarında test edilmiştir. Her bir uygulamanın yapraklardaki leke sayısını önemli ölçüde azalttığı belirlenmiştir.

Son yıllarda fındık bakteriyel yanıklık hastalığının ülkemizde yaygınlığı ve çeşit duyarlılığı ile ilgili bazı çalışmalar yapılmıştır. Karahan et al. (2013) tarafından 2007–2010 yıllarında; Sakarya, Düzce, Zonguldak, Samsun, Ordu, Giresun ve Trabzon illerindeki fındık bahçelerinde hastalığın yaygınlığının araştırılmış ve hastalığın yaygınlığının %1.2 ile % 14.9 arasında değiştiği bildirilmiştir. Akın (2012) yaptığı bir çalışmada; toplam 16 fındık çeşidinin *X. arboricola* pv. *corylina*'ya karşı duyarlılığı araştırılmış, %17,57 oran ile İncekara çeşidinin en dayanıklı, %77,51 ile Yassı Badem çeşidinin ise en duyarlı olduğu belirlenmiştir.

Bu çalışmada *X. arboricola* pv. *corylina*'nın biyolojik mücadelesinde etkili olan bakterilerin büyük bir çoğunluğunun fosfat çözebildiği ve azot fiksasyonu yapabildiği görülmüştür. Hatta fındık bitkisinde yapılan *in vivo* denemelerde kullanılan potansiyel biyoajan bakteri izolatlarının tamamının azot fiksasyonu kabiliyetine sahip olduğu görülmüştür. PGPB'lerin etki mekanizmaları içerisinde azot fiksasyonun önemli bir yer tutmaktadır (Glick 2012; Jamil et al. 2017). Azot fiksasyonu sadece bitki kök bölgesinde olan bir olay değildir. Bitkilerin yapraklarında gelişen bazı bakterilerin de azot fiksasyonu yapabildiği ve bu bakterilerin bitki gelişimine de önemli katkılar sağlarken aynı zaman da yaprak patojenleri ile rekabete girerek bitkileri patojen saldırılarına karşı da koruyabildikleri tespit edilmiştir (Förnkrantz et al. 2008; Glick 2012). Bu çalışmada etkili olan 4 bakteri izolatının hem azot fiksasyonu özelliğine sahip olması hem de *X. arboricola* pv. *corylina*'nın kontrolünde oldukça etkili olması ileride geliştirilecek ticari bir formülasyonun hem bitki koruma hem de bitki besleme ürünü olarak fındık üretimine önemli katkılar sağlayabileceği düşünülmektedir.

Yaptığımız literatür araştırmasında ülkemizin yanısıra, dünyada *X. arboricola* pv. *corylina*'nın biyolojik mücadelesinde antagonist bakterilerin kullanıldığı bir çalışmaya rastlanılmamıştır (Lamichhane, & Varvaro 2014). Diğer yandan, taksonomik olarak bu patojene yakın olan *Xanthomonas arboricola*'nın diğer patovaryantları ile ilgili iki çalışmaya rastlanmıştır. Erdal, (2011) tarafından yapılan bir çalışmada; ceviz yanıklığına neden olan *X. arboricola* pv. *juglandis*'in biyolojik mücadelesinde *P. fluorescens* ve *P. agglomerans*'ın bazı izolatlarının etkili olduğu tespit edilmiştir. Bir diğer çalışmada *X. arboricola* pv. *pruni*'ye karşı patojen olmayan *Xanthomonas campestris* izolatının hastalığı %69 oranında azalttığı bildirilmiştir (Kawaguchi et al. 2014). Bu çalışmanın *in vivo* denemelerinde 1 *Bacillus* sp. (K-15b), 1 *B. megaterium* (KBA-10) ve 2 *B. cereus* (K-15d, K-3a) izolatının *X. arboricola* pv. *corylina*'nın kontrolünde etkili olduğu görülmüştür. Bu

yönü ile çalışma Dünyada *X. arboricola* pv. *corylina*'nın biyolojik mücadelesinde bakterilerin kullanılabileceğini gösteren ilk çalışmadır. Ancak çalışma sonucunun uygulamaya aktarılabilmesi için formülasyon, toksikolojik ve ekotoksikolojik çalışmalara ihtiyaç vardır.

Kaynaklar

- Akın M., 2012. Türk fındık çeşitlerinin (*Corylus avellana* L.) bakteriyel yanıklık hastalığına (*Xanthomonas arboricola* pv. *corylina*) karşı tolerans telirlenmesi. Yüksek lisans tezi, Ordu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ordu. 38 s.
- Aktaş S. & R. Kotan, 2015. Domates öz nekrozuna neden olan tmenlere karşı PGPR ve biyojan bakterileri kullanılarak kontrollü koşullarında biyolojik mücadele imkanlarının araştırılması. *Türkiye Biyolojik Mücadele Dergisi*, 7(2): 89-110.
- Alay K., N. Altınyay, Ö. Hancıoğlu, F. Dünder & A. Ünal, 1973. Karadeniz Bölgesi fındıklarında dal kurumaları üzerinde araştırmalar. *Bitki Koruma Bülteni*, 13(4): 202-213.
- Apet K.T., R.C. Agale, O.S. Thakur & M.R. Tambe, 2018. Efficacy of bioagents and botanicals against *Xanthomonas axonopodis* pv. *punicae* causing bacterial blight of pomegranate. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, Special Issue (6): 1905-1909.
- Bahadou S.A., A. Quijja, A. Karfach, A. Tahiri & R. Lahlali, 2018. New potential bacterial antagonists for the biocontrol of fire blight disease (*Erwinia amylovora*) in Morocco. *Microbial Pathogenesis*, 117: 7-15.
- Bars H.P., 1913. Oregon Experiment Station Biennial Crop Pest and Horticulture Report: A new Filbert disease in Oregon. Oregon.
- Bora T. & H. Özaktan, 1998. Bitki Hastalıklarıyla Biyolojik Savaş. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, 1. Baskı, İzmir, 183 s.
- Bouaichi A., R. Benkirane, S. El-Kinany, K. Habbadi, H. Lougraimzi, S. Sadik & E. Achbani, 2019. Potential effect of antagonistic bacteria in the management of olive knot disease caused by *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*. *Journal Of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 8(4): 1035-1040.
- Bozkurt İ.A., & S. Soylu, 2019. Elma kök uru hastalığı etmeni *Rhizobium radiobacter*'e karşı epifit ve endofit bakteri izolatlarının antagonistik potansiyellerinin belirlenmesi. *Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 16: 348-361
- Brown M.E., S.K. Burlinghan & M.R. Jackson, 1962. Studies on *Azotobacter* species in soil: Comparison of media and techniques for counting *Azotobacter* in soil. *Plant and Soil*, 17(3): 309-319.
- Chavan N.P., R. Pandey, N. Nawani, R.K. Nanda, G.D. Tandon, & M.B. Khetmalas, 2016. Biocontrol potential of Actinomycetes against *Xanthomonas axonopodis* pv. *punicae*, a causative agent for oily spot disease of pomegranate. *Biocontrol Science and Technology*, 26(3): 351-372.
- Cisneros R.C.A., P.M. Sanchez de & F.J.F. Menjicar, 2017. Identification of phosphate solubilizing bacteria in a Andisol of Colombian coffee region. *Revista Colombiana de Biotecnologia*, 14 (1): 21-28.
- Duman K., & S. Soylu, 2019. Characterization of plant growth-promoting traits and antagonistic potentials of endophytic bacteria from bean plants against *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Bitki Koruma Bülteni*, 59:59-69.
- EPPO, 2004. EPPO Diagnostic protocols for regulated pests – PM 7/22. *Xanthomonas campestris* pv. *corylina*. *Bulletin OEPP/EPPO*, (34): 155-157.
- Erdal M., 2011. Batı Anadolu'da ceviz bakteriyel yanıklığı etmeni *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*'in tanısı ve entegre mücadele olanakları üzerine bir araştırma. Doktora tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir. 115 s.

- FAO., 2018. FAOSTAT: URL: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> (Erişim tarihi: 12 Şubat 2019).
- Fürnkranz M., W. Wanek, A. Richter, G. Abell, F. Rasche & A. Sessitsch, 2008. Nitrogen fixation by phyllosphere bacteria associated with higher plants and their colonizing epiphytes of a tropical lowland rainforest of Costa Rica. *The ISME Journal*, 2: 561–570.
- Glick B.R., 2012. Plant growth-promoting bacteria: Mechanisms and applications. *Scientifica*, 2012: 1-15.
- Jamil S., T. Hui & J. Mingshan, 2017. *Bacillus* species as versatile weapons for plant pathogens: a review. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 31(3): 446-459.
- Karagöz K. & R. Kotan, 2010. Bitki gelişimini teşvik eden bazı bakterilerin marulun gelişimi ve bakteriyel yaprak lekesi hastalığı üzerine etkileri. *Türkiye Biyolojik Mücadele Dergisi*, 1(2): 165-179.
- Karahan A., 2018. Fındıklarda Bakteriyel Yanıklık. Bitki Bakteri Hastalıkları. (Editör: Saygılı H., Y. Aysan, F. Şahin, S. Soylu ve M. Mirik, 2018. Bitki Bakteri Hastalıkları. Toprak Ofset Matbaacılık, Tekirdağ, ISBN: 978-6054-2655-4-1., 211-216.
- Karahan A., Ş. Altundağ, H. Duran & A.O. Kiliç, 2013. Karadeniz bölgesinde fındık bakteriyel yanıklığı (*Xanthomonas arboricola* pv. *corylina* (Miller et al.) Vauterin et al.) hastalığının yaygınlığı üzerine araştırmalar. *Bitki Koruma Bülteni*, 53(3): 159-174.
- Kawaguchi A., K. Inoue & Y. Inoue, 2014. Biological control of bacterial spot on peach by nonpathogenic *Xanthomonas campestris* strains AZ98101 and AZ98106. *Journal of General Plant Pathology*, 80: 158-163.
- Khodakaramian G., A. Heydari & G.M. Balestra, 2008. Evaluation of *Pseudomonads* bacterial isolates in biological control of citrus bacterial canker disease. *International Journal of Agricultural Research*, 3(4): 268-272.
- Klement Z. & R.N. Goodman, 1967. The hypersensitive reaction to infection by bacterial plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 5: 17-44.
- Klement Z., K. Rudolph & D.C. Sands, 1990. Methods in Phytobacteriology. Akadémiai Kiado. Budapest, 547 p.
- Kotan R. & F. Sahin, 2002. Bitki hastalıkları ile biyolojik mücadelede bakteriyel organizmaların kullanılması. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 31(1): 111-119.
- Kotan R., 1998. Domates ve biber bakteriyel leke hastalığı ile biyolojik savaşta actigard ve bazı antagonistlerin etkinliği. Yüksek lisans tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilim Dalı, Erzurum. 47 s.
- Kotan R., 2002. Doğu Anadolu Bölgesi'nde yetiştirilen yumuşak çekirdekli meyve ağaçlarından izole edilen patojen ve saprofitik bakteriyel organizmaların klasik ve moleküler metotlar ile tanısı ve biyolojik mücadele imkânlarının araştırılması. Doktora tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü. Bitki Koruma Anabilim Dalı, Erzurum. 217 s.
- Kotan R., N. Dikbas & H. Bostan, 2009. Biological control of post harvest disease caused by *Aspergillus flavus* on stored lemon fruits. *African Journal of Biotechnology*, 8(1): 209-214.
- Lamichhane J.R. & L. Varvaro, 2014. *Xanthomonas arboricola* disease of hazelnut: Current status and future perspectives for its management. *Plant Pathology*, 63(2): 243-254.
- Lelliot R.A. & D.E. Stead, 1987. Methods For the Diagnosis of Bacterial Diseases of Plants. Black Well Scientific Puplicaton, 157 p, Oxford, USA.
- Li S.B., M. Fang, R.C. Zhou & J. Huang, 2012. Characterization and evaluation of the endophyte *Bacillus* B014 as a potential biocontrol agent for the control of *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* induced blight of anthurium. *Biological Control*, 63(1): 9-16.

- Lopes L. P., A.G. Oliveira Jr, J.P. Beranger, C.G. Góis, F.C. Vasconcellos, J.A. San Martin & G. Andrade, 2012. Activity of extracellular compounds of *Pseudomonas* sp. against *Xanthomonas axonopodis* in vitro and bacterial leaf blight in eucalyptus. *Tropical Plant Pathology*, 37(4): 233-238.
- Miller P.W., P.W. Bollen & J.E. Simmons, 1949. Filbert Bacteriosis and its Control. Oregon Agricultural Experimental Station, 107p, Oregon, USA.
- Moore L.W., H.B. Lagerstedt & N. Hartmann, 1974. Stress predisposes young filbert trees to bacterial blight. *Phytopathology*, 64: 1537–1540.
- Nashwa S.M., 2011. Biological control of common blight of bean (*Phaseolus vulgaris*) caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* by using the bacterium *Rahnella aquatilis*. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 40(20): 1966-1975.
- Ninot A.A., N.C. Moragrega & E. Montesinos, 2002. Evaluation of a reduced copper spraying program to control bacterial blight of walnut. *Plant Disease*, 86(6): 583-587.
- Niu, D., J. Xia, C. Jiang, B. Qi, X. Ling, S. Lin & H. Zhao, 2015. *Bacillus cereus* AR156 primes induced systemic resistance by suppressing miR825/825* and activating defense-related genes in *Arabidopsis*. *Journal Of Integrative Plant Biology*, 58(4): 426–439.
- Prokic', A., K. Gasic', M.M. Ivanovic', N. Kuzmanovic', M. Sevic', J. Pulawska & A. Obradovic, 2012. *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina* detection and identification methods. *Journal of Plant Pathology*, 99(1): 127-133.
- Pulawska J., M. Kaluzna, A. Kolodziejska & P. Sobiczewski, 2010. Identification and characterization of *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina* causing bacterial blight of hazelnut: a new disease in Poland. *Journal of Plant Pathology*, 92(3): 803-806.
- Salah E.K., T. Marimuthu, D. Ladhakshmi & R. Velazhahan, 2007. Biological control of bacterial blight of cotton caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* with *Pseudomonas fluorescens*. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 40(4): 291-300.
- Sands D.C., 1990. Physiological criteria-determinate tests. In: Methods in Phytobacteriology. Ed: Klement, Z.; Rhudolp, K.; Sands, D. C., Academia Kiado, 104p, Budapest, Hungary.
- Sangiogo M., D.R. Pimentel, R. Moccellini, J.M. Murcia Bermudez, B.C. Obes & A.M. Bittencourt, 2018. Foliar spraying with bacterial biocontrol agents for the control of common bacterial blight of bean. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 53(10): 1101-1108.
- Sarkar D., F. Hossain, Z. Hasan, F.Z. Zannati, A. Roushan, F. Hasan & B. Sikdar, 2018. PCR amplification and sequencing Of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in citrus canker and its antagonistic control measures. *Journal of Intenational Academic Research For Multidisciplinarity*, 5(12): 1-15.
- Savini V., 2016. The Diverse Faces of *Bacillus cereus*. Academic Press, 159 p, Pescara, Italy.
- Schaad N.W., J.B. Jones & W. Chun, 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria 3rd ed. APS Press, St Paul, USA.
- Silva Vasconcellos, F., A. de Oliveira, L. Lopes-Santos, A. Oliveira Beranger, M. Torres Cely, A. Simionato, J. Pistori, F. Spago, J. de Mello, J. San Martin, C. Jesus Andrade & G. Andrade, 2014. Evaluation of antibiotic activity produced by *Pseudomonas aeruginosa* LV strain against *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*. *Agricultural Sciences*, 5: 71-76.
- Ulusal E., & H.M. Aksoy, 2017. Samsun İlinde fındık bakteriyel yanıklık etmeni *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina*'nın yaygınlık durumunun ve TİP III efektör R genlerinin belirlenmesi. Yüksek lisans tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun. 69 s.
- Vauterin L., B. Hoste, K. Kersters & J. Swings. 1995. Reclassification of *Xanthomonas*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45: 472-489.
- Yörük B. & M. Mirik, 2018. Ceviz bakteriyel etmeni *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*' e karşı antagonist bakteriyel izolatların *in vitro* koşullarda biyokontrol etkinlerinin belirlenmesi. *Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 18(3): 569-577.