

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI
2020-YL-034

**PAMUKTA ÇÖKERTEN HASTALIĞI ETMENİ
Rhizoctonia solani'ye KARŞI ANTAGONİST
BAKTERİLER İLE BİYOLOJİK MÜCADELE**

Hasan Hüseyin BAYIRLI

Tez Danışmanı:

Dr. Öğr. Üyesi: Ümit ÖZYILMAZ

AYDIN

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Bitki Koruma Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Hasan Hüseyin BAYIRLI tarafından hazırlanan “Pamukta Çökerten Hastalığı Etmeni *Rhizoctonia solani*’ye Karşı Antagonist Bakteriler ile Biyolojik Mücadele” başlıklı tez, 30 Haziran 2020 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

Ünvanı, Adı Soyadı	Kurumu	İmzası
Başkan : Dr. Öğr. Üyesi Ümit ÖZYILMAZ	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Ziraat Fakültesi	
Üye : Prof. Dr. Hatice ÖZAKTAN	EGE Üniversitesi, Ziraat Fakültesi	
Üye : Prof. Dr. Ayhan YILDIZ	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Ziraat Fakültesi	

Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu yüksek lisans tezi, Enstitü Yönetim Kurulunun sayılı kararıyla tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Gönül AYDIN

Enstitü Müdürü

T.C.

AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Bu tezde sunulan tüm bilgi ve sonuçların, bilimsel yöntemlerle yürütülen gerçek deney ve gözlemler çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce, sonuç ve bilgilere bilimsel etik kuralların gereği olarak eksiksiz şekilde uygun atıf yaptığımı ve kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

12 Haziran 2020

İmza

Hasan Hüseyin BAYIRLI

ÖZET

PAMUKTA ÇÖKERTEN HASTALIĞI ETMENİ *Rhizoctonia solani*'ye KARŞI ANTAGONİST BAKTERİLER İLE BİYOLOJİK MÜCADELE

Hasan Hüseyin BAYIRLI

Yüksek Lisans Tezi, Bitki Koruma Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi: Ümit ÖZYILMAZ

2020, 77 sayfa

Rhizoctonia solani kaynaklı çökerten hastalığı pamuklarda çıkış öncesi ve sonrası önemli bitki kayıplarına neden olmaktadır. Bu çalışmada, pamuk tohumlarına kaplanan antagonist bakterilerin hastalığa karşı biyolojik etkinliği araştırılmıştır. Bu amaçla ilk önce sağlıklı pamuk bitkilerinin köklerinden antagonist bakteriler izole edilmiş ve 16s rRNA sekans analizleriyle tanılanmaya çalışılmıştır. Daha sonra bu bakterilerin antagonistik etkileri petride ikili kültür testleri ile araştırılmıştır. Etkili bulunan bakteriler pamuk tohumlarına karboksimetil selüloz ile tohuma tutturulmuş ve ardından tohumlar kil ile pelletlenmiştir. Tohumlar polimer tohum boyası ile kaplanmış ve saksılardaki %1 inokulumlu topraklara ekilmiştir. Uygulamaların etkileri çıkış öncesi ve sonrası çöken bitkiler sayılarak belirlenmiştir. Sağlıklı pamuk bitkilerinin kök bölgesinden yapılan izolasyon çalışmaları sonucunda 117 bakteri izolatu elde edilmiş ve bunlardan 17 tanesinin ikili kültür testleri sonunda %40 ve üzerinde hastalığa karşı antagonist etkisi olduğu bulunmuştur. Yapılan tanılama sonucunda bakterilerin 9 tanesinin floresan *Pseudomonas*, diğerlerinin ise *Bacillus* spp. olduğu belirlenmiştir. Saksı denemelerinde uygulama yapılmamış kontrol bitkilerinin tamamı ölüerken, ilaçlı kontrolde (Dynasty CST 125 FS) bitkilerin %78'i, S6-5 izolatında %25'i ve A1-4'de ise %23'i (İkisi de *P. fluorescens*) sağlıklı olduğu gözlenmiştir. Çalışmamız sonucunda antagonistlerin kaplama yöntemi ile tohumlara uygulanmasının, toprak kaynaklı patojenlere karşı biyolojik savaşta ümit var sonuçlar verebileceği belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Pamuk, Çökerten, Biyolojik mücadele, Antagonist bakteri, *Rhizoctonia solani*, 16s rRNA

ABSTRACT

BIOLOGICAL CONTROL OF COTTON DAMPING-OFF CAUSED BY *Rhizoctonia solani* WITH ANTAGONIST BACTERIA

Hasan Hüseyin BAYIRLI

M.Sc. Thesis, Department of Plant Protection

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Ümit ÖZYILMAZ

2020, 77 pages

Rhizoctonia solani damping-off causes significant pre and post-emergence plant losses in cotton. In this study, the biological effectiveness of antagonist bacteria coated on cotton seeds against the disease was investigated. For this purpose, antagonist bacteria were isolated from the roots of healthy cotton plants and identified by 16s rRNA sequence analysis. Antagonistic effects of these bacteria were investigated by dual culture tests in petri dishes. Effective bacteria were attached to cotton seeds with carboxymethylcellulose, and seeds were pelleted with clay. Seeds were coated with seed polymer and sown in 1% pre-inoculated soils in pots. The effects of the treatments were determined by counting the plants that collapsed pre and post-emergence. As a result of isolation studies from the rhizosphere of healthy cotton plants, 117 bacterial isolates were obtained, and 17 of them were found to have antagonistic effects against the disease at least 40% with dual culture tests. According to identification results, 9 of the bacteria were fluorescent *Pseudomonas* and others were *Bacillus* spp. In the biological control pot trial, while all the non-treated control plants died, 78% of the plants treated with fungicide (Dynasty CST 125 FS), 25% in S6-5 isolate, and 23% in A1-4 (both *P. fluorescens*) were healthy. As a result of the study, it has been determined that the treatment of antagonists to the seeds by an appropriate coating method can provide promising results in biological control against soil-borne pathogens.

Key Words: Cotton, Damping-off, Biological control, Antagonist bacteria, *Rhizoctonia solani*, 16s rRNA

ÖNSÖZ

Bu çalışma Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Fitobakteriyoloji laboratuvarı ve iklim odalarında yürütülmüş, ADÜ-BAP ZRF-19030 sayılı proje ile desteklenmiştir.

Yüksek lisans eğitimim boyunca desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, bilimsel çalışmalar dışında hayata dair bakış açısı ile zorlukların üstesinden nasıl gelebileceğimi bir ağabey gibi öğreten tez danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Ümit ÖZYILMAZ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Söke arazi çalışmalarında desteğini esirgemeyen örnek toplamamda yardımcı olan Zir. Yük. Müh. Murat Önder Akpınar'a teşekkürü borç bilirim.

Laboratuvar ve tez çalışmalarım kapsamında desteklerini eksik etmeyen değerli arkadaşlarım; Anıl Altuğ PEK ve özellikle Betül KARA'ya teşekkür ederim.

Son olarak hayatım boyunca daima yanımda olan, sabırla desteklerini hiç esirgemeyen aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Hasan Hüseyin BAYIRLI

İÇİNDEKİLER

ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
ÖNSÖZ	xi
KISALTMALAR DİZİNİ	xv
ŞEKİLLER DİZİNİ	xvii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xix
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	12
3. MATERYAL VE YÖNTEM	16
3.1. Materyal	16
3.2. Yöntem	16
3.2.1. Çalışmalarda Kullanılacak Hastalık Etmeninin Elde Edilmesi	16
3.2.2. Antagonist Bakterilerin İzolasyonu	18
3.2.3. Bakterilerin Antagonist Etkinliğinin İkili Kültür Testleri ile Saptanması	20
3.2.4. Antagonist Bakteriler için Ön Eleme Testleri	20
3.2.5. Antagonist Bakteriler için Ön Tanılama Testleri	22
3.2.6. Tohum Kaplama Çalışmaları	24
3.2.7. Saksı Denemelerinde Kullanılacak Uygun Patojen İnokulum Miktarının Belirlenmesi	29
3.2.8. Antagonist Bakterilerin 16s rRNA Sekans Analizi ile Tanılanması	29
3.2.9. Antagonist Bakterilerin Saksı Koşullarında Denenmesi	30

4. BULGULAR	32
4.1. Çalışmalarda Kullanılacak Hastalık Etmeninin Elde Edilmesi	32
4.2. Antagonist Bakterilerin İzolasyonu	35
4.3. Bakterilerin Antagonist Etkinliğinin İkili Kültür Testleri ile Saptanması..	39
4.4. Antagonist Bakteriler için Ön Eleme Testleri	41
4.5. Antagonist Bakteriler için Ön Tanılama Testleri.....	43
4.6. Tohum Kaplama Çalışmaları.....	47
4.6.1. Kaplama Malzemelerinin Pamuk Tohumu Çimlenme Gücüne Etkileri	47
4.6.2. Polimer Boyanın Tohuma Uygulama Şeklinin Belirlenmesi	48
4.6.3. Boyanın Antagonist Bakteri Canlılığına Etkisi	49
4.6.4. Karboksimetil Selülozun Tohumda Bakteri Tutunumuna Etkisi.....	50
4.6.5. Karboksimetil selülozun Tohum Çimlenmesi Üzerine Etkisi	50
4.6.6. Tohuma Farklı Yöntemlerle Antagonist Uygulamalarının Bakterinin Canlılığı Üzerine Etkileri.....	51
4.7. Saksı Denemelerinde Kullanılacak Uygun Patojen İnokulum Miktarının Belirlenmesi.....	53
4.8. Antagonist Bakterilerin 16s rRNA Sekans Analizi ile Tanılanması.....	54
4.9. Antagonist Bakterilerin Saksı Koşullarında Denenmesi	56
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	59
KAYNAKLAR.....	69
ÖZGEÇMİŞ.....	77

KISALTMALAR DİZİNİ

FAO : Food and Agriculture Organization of the United Nations

TÜİK : Türkiye İstatistik Kurumu

GAP : Güneydoğu Anadolu Projesi

KB : King B Agar

NA : Nutrient Agar

PDA : Potato Dextrose Agar

CFU : Colony-forming Unit

NSA : Nutrient Sucrose Agar

CMC : Karboksimetil Selüloz (Carboxymethyl Cellulose)

UV : Ultra viyole

NCBI : National Center for Biotechnology Information

NCPPB : National Collection of Plant Pathogenic Bacteria

SCRI : Scottish Crop Research Institute

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Fide kök çürüklüğü hastalığının pamuk fidelerinde oluşturduğu belirtiler	7
Şekil 3.1. <i>Rhizoctonia solani</i> izolasyonu için alınan toprak örneklerinin harita üzerindeki konumları	18
Şekil 3.2. Laboratuvara getirilen pamuk bitkisi kök örneklerinden antagonist bakteri izolasyonu	19
Şekil 3.3. Bitki köklerinden elde edilen süspansiyon serisinin KB besi yerine ekilmesi	19
Şekil 3.4. Bakteri süspansiyonlarının tütün bitkisine inoküle edilmesi	21
Şekil 3.5. Tohum kaplamada kullanılan cihaz	25
Şekil 3.6. Antagonist bakteri uygulanmış tohumlar	31
Şekil 4.1. Hastalık belirtisi gösteren bitki, örneklerin toplandığı bir araziden genel görünüş	32
Şekil 4.2. Sağlıklı bitkiler, çöken bitkiler	33
Şekil 4.3. Kök ve kök boğazlarındaki hastalık belirtileri	33
Şekil 4.4. DG2 izolatının 2 günlük PDA kültürü ve mikroskopik görünümü	34
Şekil 4.5. DG2 izolatının 6 günlük kepek kültürü	34
Şekil 4.6. Antagonist bakterileri izolasyonu için gezilen araziler	36
Şekil 4.7. Antagonist bakterileri izolasyonu için çıkılan arazilerden görünüm	37
Şekil 4.8. 10^{-3} ve 10^{-4} seyreltme serilerinden gelişen 4 günlük bakteri kolonileri	37
Şekil 4.9. Ultraviyole ışık altında bakteri kolonilerinin görünümü	38
Şekil 4.10. Engelleme zonlarının görünümü	40
Şekil 4.11. Tütün aşırı duyarlılık testi sonucu	42
Şekil 4.12. Isı testi sonucu NA besi yerinde uygulamadan 48 saat sonra bakteri kolonileri	42

Şekil 4.13. Patates yumuşak çürüklük testi	43
Şekil 4.14. İki antagonist bakterinin Gram boyama sonucu mikroskop görüntüsü	44
Şekil 4.15. Floresan negatif ve floresan pozitif bakteri izolatlarının UV ışık altındaki görünümü.....	45
Şekil 4.16. Nitrat indirgeme testi.....	45
Şekil 4.17. O/F testi	46
Şekil 4.18. Arjinin testi.....	46
Şekil 4.19. Levan testi sonucu	47
Şekil 4.20. Kaplama işlemi sonrası tohumların görünüşleri	47
Şekil 4.21. Boya kaplama maddesinin 2 farklı yöntemle tohuma uygulanması.....	48
Şekil 4.22. King B besi yerine ekimi yapılan süspansiyonlardan 24 saat sonra gelişen bakteri kolonileri	51
Şekil 4.23. Günlere ve uygulamalara göre tohumlardaki bakteri sayısı değişimi ...	52
Şekil 4.24. İnokule edilmiş, toprakla karıştırılmaya hazır kepek kültürü.....	53
Şekil 4.25. Farklı inokulum miktarlarında çıkış öncesi/sonrası çöken bitkiler ve sağlıklı bitki oranlarının dağılımı	54
Şekil 4.26. 27F/1492R primer çifti ile yapılan PCR sonucunda izolatlara ait yaklaşık 1.400 bç büyüklüğündeki ürünlerin agaroz jeldeki fotoğrafı ..	55
Şekil 4.27. Ekimden 5 gün sonra bitkilerdeki görünüm	56
Şekil 4.28. Saksıda biyolojik etkinlik denemesi çıkış öncesi/sonrası çöken bitkiler ve sağlıklı bitki oranlarının dağılımı	57

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. 2018 yılı pamuk ekim alanları	2
Çizelge 1.2. 2018–2019 yılı dünya pamuk üretimi	3
Çizelge 1.3. 2015–2019 yılları Türkiye pamuk üretimi	3
Çizelge 1.4. Yoğun pamuk üretimi yapılan iller	4
Çizelge 1.5. 2019 yılı Aydın ilçeleri pamuk üretim miktarı	5
Çizelge 3.1. <i>Rhizoctonia solani</i> izolasyonu için değerlendirilen toprak örneklerinin kodları ve alındıkları lokasyonlar	17
Çizelge 4.1. DG2 izolatına ait patojenisite testi sonucu	34
Çizelge 4.2. Antagonist bakterileri izolasyonu için toplanan bitkiler	35
Çizelge 4.3. Bir gram bitki kökünde bulunan bakteri koloni sayısı	38
Çizelge 4.4. Antagonistlerin engelleme oranları	39
Çizelge 4.5. Antagonist bakterilerin ön eleme testleri sonuçları	41
Çizelge 4.6. Elde edilen antagonist bakterilerin gram boyama ve biyokimyasal test sonuçları	44
Çizelge 4.7. Kaplama malzemesinin pamuk tohumu çimlenme gücüne etkisi	48
Çizelge 4.8. Farklı boyama yöntemi ile kaplanan tohumlarda bitki çıkışları	49
Çizelge 4.9. Tohum kaplama boyasının bakteri canlılığı üzerine etkileri	49
Çizelge 4.10. Karboksimetil Selülozun tohuma bakteri tutunumuna etkisi	50
Çizelge 4.11. Karboksimetil Selülozun pamuk tohumlarında çimlenmeye etkisi	50
Çizelge 4.12. Tohum bakterizasyonu uygulamalarından sonra zamana bağlı olarak tohumlardaki bakteri popülasyonundaki değişim	52

Çizelge 4.13. Uygun patojen inokulum miktarı belirleme testleri sonucu53

Çizelge 4.14. Antagonist bakteri sekanslarına ait muhtemel eşleşen tür isimleri....55

Çizelge 4.15 Saksı denemesi sonuçları.....57



1. GİRİŞ

İnsanlığın geçmişinden günümüze kuşkusuz giyinme ihtiyacı hep var olmuş, bu ihtiyacı giderebilmek amacıyla çeşitli lifler kullanılmıştır. Doğal, bitkisel liflerin insan yaşamına dahil olması çok eskiye dayanmakta ve en çok kullanılanı ise pamuk lifleridir. “Beyaz altın” olarak da bilinen pamuk liflerinin dokuma ve tekstil sanayinde kullanımıyla ilgili ilk kanıtlar; bugün Pakistan’da yer alan Mohenjo Daro’da yapılan kazı çalışmalarında, M.Ö. 2700’lü yıllara dek uzanan kalıntılara rastlanmıştır. Bu bulgular yaklaşık 5 bin yıldır dünyada pamuk tarımının yapıldığını göstermektedir (Çopur, 2018).

Pamuk, *Malvales* takımı, *Malvaceae* familyasına ait olup, bilinen pek çok çeşidi olmasına karşın, sadece dördü kültür türüdür. Pamuk ekim alanlarında bu dört türden sadece *Gossypium hirsutum* ve *Gossypium barbadense* olmak üzere ikisi yaygın olarak yetiştirilmektedir. Küresel olarak yetiştirilen pamuğun en yaygın kültür türü *Gossypium hirsutum* olmakta ve üretimin %97’sini temsil etmektedir (Küçük, 2015). Pamuk, çalı şeklinde tek yıllık sıcak iklim bitkisi olup, 37°C Kuzey ve 32°C Güney enlemleri arasında tarımı yapılmaktadır. Toplam üretimin %90’ı kuzey yarım kürede olup, dünyada işlenen tarım arazilerinin %2,5’inde pamuk tarımının yapıldığı görülmektedir (Başal ve Sezener, 2012). Ayrıca pamuk tarımı, dünyada sulanabilir arazilerin yaklaşık %10’una tekabül eden ortalama 34 milyon hektar alanda yapılmaktadır (Garcia ve De Alencar Nääs, 2014).

Pamuk bitkisi; lifinin doğal oluşu, diğer liflere oranla ısı gördüğünde sağlam kalışı, statik elektriği az iletmesi ve hijyenik özellik taşıma avantajları ile dünya elyaf üretiminin yaklaşık %35’ini karşılamaktadır (Dinler, 2007; Küçük, 2015). Pamuk lifleri ile tekstil sanayisi dışında, tohumunda yaklaşık %20 yağ oranı ile margarin ham maddesi olarak yağ sanayinde kullanılmaktadır. Pamuk yağı oleik–linoleik yağ asit grubu yağlar içerisinde yer almakta ve içerdiği en önemli doymuş yağ asiti %17–29 oranında palmitik asittir. Bu özellik pamuk yağına palmiye yağından sonra en fazla palmitik asit ihtiva eden yağ özelliğini kazandırmaktadır (Özbek, 2011). Pamuk tohumu içerdiği %22–26 protein oranı ile küspesinden hayvan yemi olarak yararlanılarak, besicilikte kullanılabilir. Bunun dışında kâğıt ve selüloz sanayinde de hammadde olarak kullanılmaktadır (Mert, 2007).

Pamuk, dünyada gelişmekte olan ülkelerde kırsal kesimin refah seviyesine katkı sağlayan milyonlarca çiftçi için geçim kaynağıdır. Ayrıca pamuk, tekstil üretimi, zirai girdiler, üretim ve işleme ile ilişkili endüstri vasıtasıyla 18. yüzyıldan beri sanayileşme sürecinde rol oynayarak ek istihdam yaratmaktadır. Bu özellikleri sebebi ile pamuk, ülkelerin sanayi ve tarımına pozitif etki göstererek ekonomilerine katkıları ile stratejik bir avantaj sağlamaktadır (Küçük ve Issı, 2019). Pamuğun bu denli değerli bir kültür bitkisi oluşu nedeniyle, dünya üzerinde yaklaşık 80 kadar ülkede yetiştirildiği görülmektedir (Çopur, 2018).

FAO (Food and Agriculture Organization) 2018–2019 yılı dünya pamuk üretim alanı verilerine bakıldığında, 32.420.353 hektar alan olduğu görülmektedir. İlk sırada 12.350 bin hektar ile Hindistan yer almakta ve toplam ekim alanlarının %38'ini oluşturmaktadır. İkinci sırada %13'lük ekim alanı oranı ile ABD yer alırken, Çin (%10) üçüncü sırada takip etmektedir. Çizelge 1.1'de, 2018 yılı önemli pamuk üreticileri Hindistan, ABD, Çin, Pakistan, Brezilya, Özbekistan, Türkiye, Türkmenistan, Avustralya ve Burkina Faso olduğu görülmektedir. Bu 10 ülke, dünya toplam pamuk ekim alanlarının yaklaşık %80'ini oluşturmaktadır (Anonim, 2019).

Çizelge 1.1. 2018 yılı pamuk ekim alanları (Anonim, 2019).

Sıra	Ülkeler	Ekim alanı (Bin ha)
1.	Hindistan	12.350
2.	ABD	4.261
3.	Çin	3.354
4.	Pakistan	2.372
5.	Brezilya	1.150
6.	Özbekistan	1.108
7.	Türkmenistan	535
8.	Türkiye	518
9.	Avustralya	485
10.	Burkina Faso	473

Çizelge 1.1'de verilen değerler göz önüne alındığında ülkemiz pamuk üretimi bakımından önemli bir konumda yer aldığı görülmektedir. Toplam 518.000 hektar pamuk ekim alanı ile dünya pamuk üretiminde %1,6'lık pay ile 8. sırada yer almaktadır.

2018–2019 sezonu dünya pamuk üretimine baktığımızda toplam 25.823 bin ton olduğu görülmektedir. Çizelge 1.2'de yer alan dünya pamuk üretim verilerine göre

Hindistan, ABD ve Çin başı çekmekte ve sadece bu üç ülkenin dünya üretiminde %51’lik bir üretim hacmi olduğu görülmektedir. Aynı çizelgede ülkemiz üretim bakımından dünyada, Hindistan, ABD, Çin, Brezilya ve Pakistan’ın ardından dünya üretimine %3’lük bir katkı ile 6. sırada yer almaktadır (Anonim, 2020a).

Çizelge 1.2. 2018–2019 yılı dünya pamuk üretimi (Anonim, 2020a).

Sıra	Ülkeler	Üretim miktarı (Bin ton)
1.	Hindistan	5.770
2.	ABD	3.999
3.	Çin	3.500
4.	Brezilya	2.787
5.	Pakistan	1.655
6.	Türkiye	806
7.	Özbekistan	713
8.	Avustralya	479
9.	Türkmenistan	198
10.	Burkina Faso	185

Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) 2019 verilerine göre Türkiye’nin son beş yılını içeren pamuk üretimi Çizelge 1.3’de gösterilmiştir. Çizelgeyi incelediğimizde ülkemizde genel olarak 2017 ve 2018 yıllarında ekim alanı ve buna paralel olarak üretim artarken, 2019 yılı verilerine göre bir azalma söz konusu olmuştur. Yine Çizelge 1.3’te ülkemizin verim değerleri incelendiğinde, 2015 yılından itibaren bir artış söz konusuken, 2019 yılına geldiğimizde lif verimi olarak bir azalma gözlemlenmiştir (Anonim, 2020b).

Çizelge 1.3. 2015–2019 yılları Türkiye pamuk üretimi (Anonim, 2020b).

Yıl	Ekilen alanı (da)	Lif üretimi (ton)	Lif verimi (kg/da)
2015	4.340.134	738.000	170
2016	4.160.098	756.000	182
2017	5.018.534	882.000	176
2018	5.186.342	976.600	188
2019	4.778.681	814.000	170

Ülkemizde pamuk üretimi yoğun olarak Ege Bölgesi, Akdeniz Bölgesi ve Güneydoğu Anadolu bölgesinde yapılmaktadır (Anonim, 2018). Sıcaklık farklılıklarının az olduğu ve yüksek nem içeren ekolojik koşullardan dolayı; Antalya Bölgesi’nde Aksu, Çukurova Bölgesi’nde Ceyhan ve Seyhan, Güneydoğu Anadolu Bölgesi’nde Fırat ve Dicle, Ege Bölgesi’nde ise Gediz, Küçük ve Büyük

Menderes nehirleri çevresinde pamuk tarımı yoğunlaşmıştır. Genel olarak pamuk, ülkemizin güney ve batı bölgelerinde, sulama imkanının olduğu nehir yatakları çevresi veya arasında olan bölgelerde yetiştirilmektedir (Anonim, 2006; Dinler, 2007).

Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde Fırat ve Dicle havzaları ile Mezopotamya ovalarında yer alan illerimizin Güneydoğu Anadolu Projesi (GAP) ile sulamaya açılması planlanmaktadır. Proje tamamlandığında toplam 1,8 milyon hektar tarım arazisinin sulanması öngörülmektedir. 2016 yılında toplam 507.784 ha alan sulamaya açılmış bulunmaktadır. GAP projesi kapsamında Şanlıurfa-Harran Ovaları pamuk üretimi bakımından hızla artış göstererek önemli noktaya gelmiştir (Çopur, 2018). GAP bölgesindeki sulama imkanlarının artmasıyla, 1980 yılında %8 olan pamuk ekim alanları, 2010 yılına gelindiğinde %60'a yükselmiştir (Başal ve Sezener, 2012; Küçük ve Issı, 2019).

Çizelge 1.4'te yer alan TÜİK 2019 verilerini incelediğimizde, 2.087.920 dekar ekim alanı ile ilk sırada Şanlıurfa ilimiz yer almaktadır. Diyarbakır ilimiz 476.866 dekar ekim alanı ile ikinci sırada yer alırken, Aydın ilimiz 464.655 dekar alan ile üçüncü sırada yer almaktadır (Anonim, 2020c).

Çizelge 1.4. Yoğun pamuk üretimi yapılan iller (Anonim, 2020c).

İller	Ekilen Alan (da)	Üretim miktarı (ton)	Verim (kg/da)
Şanlıurfa	2.087.920	300.906	144
Diyarbakır	476.866	86.472	181
Aydın	464.655	91.161	196
Hatay	456.271	81.246	178
Adana	374.668	76.097	203

Üretim miktarı bakımından Çizelge 1.4'ü incelediğimizde 300.906 ton ile Şanlıurfa ilimiz ilk sırada gelirken, Aydın 91.161 ton ile ikinci sırada yer almaktadır. Bu üretim miktarındaki fark Aydın ilinin dekara verim değerlerinin yüksek olmasından dolayı olduğu görülmektedir.

Elyaf uzunluğu yönüyle Ege Bölgesi pamuğu GAP-Şanlıurfa pamuğu ile kıyaslandığında daha uzun lifli olduğu görülmekte ve tekstil üreticileri tarafından tercih edilmektedir (Paulson ve Sirtioğlu, 2015). Üretimde tercih edilen lif kalitesi, verim oranı ve ekim miktarlarının fazlalığı dolayısıyla binlerce insana geçim

kaynağı olması ile Aydın ilimiz Ege Bölgesi'nde pamuk üretimi bakımından önemli bir konumda yer almaktadır.

Söke ilçesi pamuk üretimi bakımından Ege Bölgesi ve Aydın için önemli bir konumda yer almaktadır. TÜİK 2019 verilerine göre, Çizelge 1.5'te yer alan Aydın ilçeleri pamuk ekim alanı ve üretim miktarları incelendiğinde, 267.518 dekar üretim alanı ve 52.513 ton üretim miktarı ile Söke ilçesi ilk sırada gelmekte ve tek başına Aydın İlinin pamuk üretiminin %58'ini karşılamaktadır. Diğer bir önemli üretim merkezi olan Koçarlı ilçesi 59.534 dekar ekim alanı ve 10.919 ton üretim miktarı ile Aydın üretiminin %12'sini oluşturmaktadır, bunu sırasıyla; Germencik (%7), Efeler (%6), Didim (%5), İncirliova (%4) ve Nazilli (%2) izlemektedir (Anonim, 2020d).

Çizelge 1.5. 2019 yılı Aydın ilçeleri pamuk üretim miktarı (Anonim, 2020d).

İlçeler	Ekim Alanı (da)	Üretim Miktarı (ton)
Söke	267.518	52.513
Koçarlı	59.534	10.919
Germencik	32.556	6.351
Efeler	29.566	5.433
Didim	27.376	6.009
İncirliova	20.180	4.356
Nazilli	13.075	2.510
Yenipazar	5.993	1.438
Köşk	3.330	673
Sultanhisar	2.753	400
Kuyucak	1.665	329
Buharkent	642	149
Çine	437	75
Bozdoğan	30	6
Karpuzlu	0	0

Pamuk üretiminde ekonomik olarak öneme sahip bazı zararlı ve hastalıklar mevcuttur. Bunlardan; kırmızı örümcek (*Tetranychus* spp.), pembe kurt (*Pectinophora gossypiella*), pamuk yaprak kurdu (*Spodoptera littoralis*), beyaz sinek (*Bemisia tabaci*), pamuk yaprak biti (*Aphis gossypii*), pamuk piresi (*Lygus* spp.) gibi zararlılar sıcaklık ve nemin etkisiyle pamukta zarar yapmaktadırlar. Bu zararlıların oluşturduğu zararı engellemek amacıyla ülkemizin çeşitli yörelerinde 8–10 kez ilaçlama yapıldığı görülmektedir. Bu zararlıların yanında, *Verticillium* ve *Fusarium* solgunlukları, pamuk köşeli yaprak leke hastalığı (*Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*) ve fide kök çürüklüğü hastalığı etmenleri

(*Rhizoctonia*, *Pythium*, *Verticillium*, *Thielaviopsis*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Aspergillus* türleri) pamuk üretiminde önemli ekonomik zarar yapmaktadır (Yılmaz, 2009).

Pamuk üretimi yapılacak arazi tavında ve toprak sıcaklığı 18°C den yüksek olmalıdır. Bu koşullar sağlanmadığında bitkide çimlenme ve fide gelişiminde problem gözlenebilir. Pamuk bitkisi için ekimden 4 ile 14 gün arası periyot kök gelişimi ve bitki için en kritik devredir (Ritchie vd., 2007). Tohum toprağa ekildikten çimlenme ve toprak yüzeyine çıkana kadar geçen süreçte birçok sorunla karşılaşır. Bu sorunlar diğer hastalık ve zararlı etmenlerinin dışında, tohumun çimlenmesi ve çimlenmeden sonraki süreçte tehdit eden en önemli etmenlerden birisi “Fide Kök Çürüklüğü” hastalıklarıdır. Bu hastalıklar bitkide kök boğazının incelenerek devrilmesi gibi yıkıcı belirtilerden dolayı halk arasında “Çökerten” ya da “Erimе” olarak da anılmaktadır (Yılmaz, 2009). Fide hastalıklarının dünya çapında pamuk üretimini etkileyen en önemli etken olduğu bilinmektedir. Örneğin ABD’de bu hastalıklardan kayıp %3,1 olduğu hesaplanırken, lif üretimindeki toplam kayıpların %27 olduğu tahmin edilmektedir. Hastalığın meydana gelişi iki farklı şekilde görülmektedir. Bunlardan ilki tohumun uyanmasıyla toprağın yüzeyine çıkmadan çökerten etmenlerinin saldırısına uğrayarak ölmesi, ikincisi ise pamuk tohumlarının çimlendikten sonra fide halindeyken ölmesidir. Bu evreler çıkış öncesi (Pre-emergence) çökerten ve çıkış sonrası (Post-emergence) çökerten olmak üzere adlandırılır. İlk belirtiler yeni oluşmuş köklerin renk değiştirerek yumuşaması ve çürümesiyle gözlemlenir. Çimlenebilmiş enfekteli bitkilerin kök boğazı ve kökleri incilir, kahverengi bir renk halini alır (Şekil 1.1) ve bitki ayakta duramaz devrilir (Akpınar, 2008; Anonim, 2017).



Şekil 1.1 Fide kök çürüklüğü hastalığının pamuk fidelerinde oluşturduğu belirtiler (Mevcut çalışma).

Hastalık sebebiyle pamuk üretimi yapılan arazide sıralarda boşluklar oluşmakta ve üreticiler bu durumu telafi edebilmek amacıyla haddinden fazla tohum kullanarak üretim maliyetlerini arttırmaktadır (Yıldız ve Benlioğlu, 2008).

Pamuklarda bu hastalığa oldukça geniş bir etmen grubu sebep olmaktadır. Bu etmenler toprak kaynaklı funguslar olup, bir veya birkaçının ekim alanında toprakta birlikte bulunmasıyla hastalık gözlenmektedir. Ülkemizde çökerten üzerine yapılan çalışmalar dikkate alındığında, en yaygın etmenin *Rhizoctonia solani* olduğu bunula birlikte; *Pythium*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Anixiopsis*, *Ulacladium*, *Colletotrichum*, *Thielaviopsis basicola*, *Sclerotium rolfsii*, ve *Macrophomina phaseoli* *Populaspota*, *Monilia*, *Sclerotinia*, *Myrothecium*, *Gliocladium* fungusları da hastalıklı bitkilerden izole edildiği bildirilmiştir (Karcılıoğlu, 1976; Saydam ve Qureshi, 1979; Hillocks, 1997; Demir vd., 1999; Akpınar, 2008).

Çökerten hastalığının zararı fide kök ve kök boğazında görülür. Bu bölgelerde kabuk dokusu renk değiştirerek devamında yerini yumuşama ve çürümeye bırakarak doku ölümleriyle sonuçlanır. Çimlenip toprak yüzeyine çıkabilmiş bitki kök boğazından gövde incilir, bitki ayakta duramaz ve devrilerek kurur. Nemin

az, sıcaklığın yüksek olduğu zamanlarda bitkiler hastalığa daha geç dönemlerde yakalanabilir, bu dönemlerde kök boğazında koyu kahverengi çöküntü şeklinde lekeler göze çarpmaktadır. Bitki için geç dönemde oluşan enfeksiyonlar ölümle sonuçlanabildiği gibi, nemin azalması ve havaların ısınması ile canlılıklarını sürdürebilmektedirler. Hastalık etmenleri kışı, bitki artıklarında ve toprakta klamidospore, konidi veya misel, sklerot halinde değişik formlarda geçirmektedirler. Hastalık için gerekli ekolojik koşullar sağlandığında, pamuk tohumlarının ekimiyle tohumları ve fideleri enfekte ederler. Hastalık etmenleri için sıcaklığın önemli etkisi var olmakla birlikte, optimum 17–23°C civarındadır (Akpınar, 2008).

Söke ovasında hastalık etmenlerinin saptanması üzerine yapılan bir çalışmada hastalık belirtisi gösteren fidelerden yapılan izolasyon çalışmaları sonucunda, *R. solani* %88, *Fusarium* spp. %3,95, *Aspergillus* spp. %1,98 ve *Pythium* spp. %1,78 oranında olduğu saptanmıştır (Nemli ve Sayar, 2002).

2006 yılında 26 hastalıklı fide örneğinden yapılan izolasyon çalışmaları sonucunda, *R. solani* %80,95, *Pythium* spp. %9,52, *Fusarium* spp. %4,76 ve *Aspergillus* spp. %4,76 oranında etmenlerin varlığı saptanmıştır. Yine aynı çalışmada 2007 yılında yapılan izolasyon çalışmaları sonucunda ise, *R. solani* %84,61, *Pythium* spp. %7,69, *Fusarium* spp. %3,84, *Macrophomina* spp. %3,84 oranında varlığı bildirilmiştir (Akpınar, 2008).

R. solani dünyada ve ülkemizde en önemli pamuk fide kök çürüklük etmenlerinden biridir. Yağışlı dönemlerde etkili, ılık–nemli topraklarda hızla gelişir. Etmenin misellerine her dönem rastlanabilir (Yılmaz, 2009). Çökerten hastalığının şiddetini arttıran faktörlerin araştırılması üzerine birçok çalışma yapılmış, tohumların çimlenmesi ve fidelerin gelişmesini engelleyen nemli serin giden yıllarda özellikle ağır topraklarda daha şiddetli olduğu görülmüştür (İyriboz, 1971). Fazla sulama, yağmurlu ve yüksek nem ihtiva eden havalar çökerten hastalığının şiddetini arttırmaktadır. Ancak *Rhizoctonia* türlerinin düşük toprak neminde de gelişebildiği bildirilmiştir (Karaca, 1984). En uygun sıcaklığın *R. solani* için 21°C olduğu ancak 18–35°C ve 35°C'nin üstünde de enfeksiyon yapabildiği saptanmıştır (Akpınar, 2008).

Ülkemizde Fide Kök Çürüklüğü hastalıklarıyla mücadelede Pamuk Entegre Mücadele Teknik Talimatlarına göre; drenajı iyi yapılmış arazilere derine ekimden

kaçılarak, çimlenme kapasitesi yüksek sertifikalı delinte tohum kullanımı önerilmektedir. Ayrıca toprak sıcaklığının 18°C ulaşmadan ekim yapılmaması, toprağın kaymak tutmasının önlenmesi ve hububat bitkileriyle ekim nöbetinin uygulanması gibi önlemler yer almaktadır (Anonim, 2017).

Kültürel önlemlerin hastalıkla mücadelede tavsiye edilmesine karşın yeterli düzeyde olmadığı, üreticilerin bu riski göze almayıp ilaçlı tohum kullanmalarına yol açmaktadır. Hastalığa karşı kimyasal mücadelede, ülkemizde ruhsat almış çeşitli etkili maddeler bulunmaktadır. Son yıllarda dünyada ve Türkiye’de genel olarak tarım alanlarında azalma söz konusu iken, üretimde bir farklılık olmayıp pestisit kullanımı sürekli artmaktadır. Bu artışın verim konusunda beklentinin çok uzağında kaldığını göstermektedir. Kontrol dışı bilinçsiz pestisit kullanımı sonucu, birçok zararlı ve hastalık etmeni direnç kazanmakta ayrıca pestisitlerin bu hastalık ve zararlılara karşı etkisiz kaldığı görülmektedir (Okumuş ve Alçinkaya, 2019).

Fide kök çürüklüğü hastalığının kimyasal mücadelesinde fungusitler çökerten etmenlerini kontrol etmede her zaman etkili değildir veya bunların etkinliği değişkendir. Bu nedenle hastalıkla kimyasal mücadelede diğer entegre mücadele yöntemleri ile birlikte kullanılması gerekmektedir (Harman, 2000). Özellikle kimyasalların insan sağlığı ve çevre üzerine olumsuz etkileri ve tohum fitotoksitesi gibi sorunlara neden olduğundan, geleneksel fungusitlere alternatif, antagonistler kullanıma alınmaya çalışılmaktadır (Burns ve Benson, 2000; Lamichhane vd., 2017). Biyolojik mücadele, kimyasal pestisitlere alternatif olmakta ve mikrobiyal çeşitlilik bu amaç için sonsuz bir kaynak oluşturmaktadır. Antagonistlerin bitki etrafında yoğun bulunması, diğer organizmaların özellikle patojen etmenlerinin baskı altına alınmasına olanak sağlamaktadır. Diğer yandan antagonistlerin çevreye adapte yetenekleri ile patojenlere karşı kimyasal pestisitlere oranla daha etkili olabileceği düşünülmektedir (Okumuş ve Alçinkaya, 2019). Pamuk çökerten etmenine karşı biyolojik mücadele olanaklarına bakıldığında bazı biyolojik ajanların dünyanın çeşitli ülkelerinde ruhsatlı ticari isimlerde pamuk kök çürüklüğüne karşı; *Burkholderia cepacia* içerikli (Deny®, Intercept®) ve *Bacillus subtilis* içerikli (Kodiak®) biyopreparatlar tavsiye edilmektedir (Gardener McSpadden ve Fravel, 2002). Aynı şekilde birçok çökerten etmenine karşı ABD ve Kanada gibi ülkelerde ruhsatlı biyolojik preparatlar bulunmaktadır. *Streptomyces griseoviridis* K61 (Mycostop ®), *Bacillus subtilis* MBI 600 (Subtilex®), *Trichoderma harzianum* Rifai (T-22®, RootShield®) içerikli

biyolojik preparatlar pamuk ve diğer birçok kültür bitkisinde *R. solani*'ye karşı denenmiştir (Kabaluk vd., 2010).

Bu konuda yapılmış çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Ancak bu çalışmalarda karşımıza çıkan olumsuz noktalar sıralanacak olursa bazı çalışmalarda antagonistlerin farklı bitkilerden izole edildiği ve pamuk bitkisi üzerinde denendiği görülmektedir. Her ne kadar *in-vitro*'da etki görülmüş olsa bile bu antagonistlerin asıl yaşam alanları pamuk bitkisi kökleri değildir. Ayrıca yaşam koşulları izole edildiği bitkiye özelleşmiş olabilir. Başka bir uygun olmayan durum ise antagonistlerin toprağa içirme yöntemi şeklinde uygulanmasıdır. Bu yöntemin büyük arazilerde uygulanması zor, maliyetli ve özel ekipman isteyeceği açıktır. Diğer çalışmalarda karşılaşılan başka bir husus ise tohum uygulamalarının tohumların bakteri süspansiyonlarına daldırılması veya bakterilerin bulamaç halinde tohuma tutturulmaya çalışılması şeklinde yapılmasından kaynaklanmaktadır. Bu uygulamalar; antagonist uygulanmış bakterili tohumların raf ömrünü kısaltmakta, ekimden önce ve sonra bakterinin tohum bölgesinden uzaklaşmasına neden olmaktadır. Antagonistlerin uygulanmasında en başarılı ve uygun yöntemin tohuma uygulama olduğu düşünülmektedir. Bunun sebebi antagonistlerin tohum çimlenmesi sırasında patojenlere karşı en hassas olduğu dönemde orada antagonistlerin varlığı ve patojene karşı etkili bir üstünlük kurması olarak düşünülebilir.

Tohum kalitesini iyileştirmek amacıyla ekim öncesi yapılan birçok uygulamadan biri tohum kaplama teknolojileridir. Bu uygulama, tohumun şekil bozukluklarının giderilerek makineli ekimine olanak sağlarken, hastalık ve zararlılara karşı koruyarak tohum çimlenme performansını arttırmaktadır (Gökçöl ve Duman, 2018). Tohum kaplama uygulamaları, pellet kaplama ve film kaplama olarak ikiye ayrılmaktadır. Pellet kaplama: Tohumların etrafına katı partikül kaplanarak uygulanan, tohumun boyutunun ayarlanması ve şekil bozukluğunun düzeltilmesi amacıyla yapılmaktadır (Bewley ve Black, 1994). Film kaplama ise tohumların şekilleri değişmeden, kaplayıcı maddelerle film tabakası halinde kaplanmasıdır. Özellikle makineli ekim gerektiren tohumların doğru materyal ve maddelerle kaplanması, bu teknolojilerin sadece ithal tohumların dışında ülkemiz tohumlarında da uygulamaya koyulmasında büyük yarar sağlayacağı düşünülmektedir (Gökçöl ve Duman, 2018). Kaplama uygulamalarında kullanılan polimere renk ilavesi ile tohumlara renk kodlaması yapılarak sınıflandırılması sağlanabilmektedir.

Ayrıca Keawkham vd., (2014) ve Carvajal vd., (2015)'in belirttiklerine göre, kaplama uygulaması yapılan tohumların raf ömrüne olumlu etkisinin olduğunu bildirmişlerdir. Ülkemizde bu konu üzerine yapılan çalışmalar oldukça yenidir. Şirketlerin tohumları sadece kimyasal ilaçlarla kapladığı ve bu konuda bilgi birikimlerinin olmadığı görülmektedir. Buna rağmen bu uygulamalara alternatif arayış içinde oldukları belirlenmiştir (Duman ve Gökçöl, 2017; Eser vd., 2009).

Antagonist bakterilerin tohuma uygulanmasında özellikle pellet şeklinde kaplamanın antagonistin korunması ve ekimden sonra yavaş yavaş çözünmesi açısından önemli olacağı kanısındayız. Bu pellet kaplamaya gerektiğinde (antagonist ile uyumlu olması durumunda) gübre ve pestisit uygulaması da birlikte yapılabilir. Bu konular göz önünde bulundurulduğunda bu çalışma: pamukta *R. solani* kaynaklı çökerten hastalığını, yöreden izole edilen ve yöre ile uyumlu antagonist bakterileri kullanarak, tohuma pellet kaplama şeklinde yapılan uygulamalarla kontrol etmeyi hedeflemiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Alagesaboopathi (1994) yaptığı bir çalışmada, pamuk çökerten etmeni *Rhizoctonia solani*'ye karşı laboratuvar ve saksı denemeleriyle antagonist *Penicillium pinophilum* etkinliğini saptamıştır. Biyolojik ajanı toprağa karıştırma ve tohum kaplama olarak iki farklı şekilde uygulamıştır. Pirinç-kum kültüründe gelişen *P. pinophilum* hastalıkla bulaşık toprakla karıştırılmış ve tohum ekiminin ardından, sağlıklı bitki sayısının kontrole göre %50 oranında arttığını saptamıştır. Diğer yöntemde ise *P. pinophilum* konidileri inek gübresi ile macun haline getirilip tohumlara uygulanmıştır. 24 saat kurumanın ardından tohumlar *R. solani* ile bulaşık saksılara ekilen kaplanmış pamuk tohumlarında fidelerin hayatta kalma oranlarını %40'tan %73'e çıktığını bildirmiştir.

Bir başka çalışmada delinte edilmiş pamuk tohumları pamuk rizosferinden elde edilen *Pseudomonas fluorescens* BL915 izolatının 5×10^8 CFU/ml bakteri süspansiyonunda 15 dakika boyunca muamele edilmiş ardından tohumlar çökerten etmeni ile bulaşık saksılara ekilmiştir. Yapılan laboratuvar ve sera denemesinin sonuçlarına göre *P. fluorescens* ürettiği pyrrolnitrin sekonder metaboliti *R. solani*'de dahil olmak üzere çökerten etmenlerini baskıladığını saptanmıştır (Hill vd., 1994).

1995 yılında Özbekistan'da yürütülen bir çalışmada, üç antagonistik bakteri (*P. fluorescens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megatherium*) pamukta görülen hastalık etmenlerine karşı denenmiştir. Yüzey dezenfeksiyonu yapılan tohumlar, %10, %25, %50 ve %100 seyreltilmiş antagonist bakteri solüsyonları içerisinde 18 saat bekletilerek uygulanmıştır. Çökerten etmeni *R. solani*'de dahil olmak üzere, hastalık etmenlerine karşı en etkili antagonistin *B. subtilis* 23 izolatının olduğunu saptanmıştır (Safiyazov vd., 1995).

Çökerten etmeni *R. solani*'ye karşı yürütülen bir başka saksı denemesinde, kullanılan *B. subtilis* RB14 izolatının sıvı besi yeri toprağa uygulanmıştır. Uygulama yapılmamış kontrol domates bitkilerinde hastalıklı bitki oranı %85,2 iken, biyolojik ajan uygulanan bitkilerde bu oran %16,7'ye düşmüş ve bitkilerin kuru ağırlıklarında önemli bir artış saptanmıştır (Shoda ve Asaka, 1996).

ABD'de 1995-1996 yıllarında *in-vitro* ve *in-vivo* koşullarda yürütülen bir çalışmada, fungusit karışımları (thiram, triadimenol, metalaxyl) ve Deny®,

Kodiak® (*B. subtilis*) ticari preparatları ile *Burkholderia cepacia* D1 izolatu karşılaştırılmıştır. Ticari preparatlar, tohuma üretici firmanın tarifine uygun olarak uygulanmıştır. *B. cepacia* D1 izolatu ise, ekimden önce sulu süspansiyon (10^8 CFU/ml) olarak araziye püskürtme şeklinde uygulama ve arpa kepeğine karıştırılıp arazide dikim karıklarına serpilerek iki farklı şekilde uygulanmıştır. Deneme sonucu üç fungusit karışımı ve *B. cepacia* D1 izolatının çökerten etmeni *R. solani*'yi baskıladığı saptanmıştır (Zaki vd., 1998).

Demir vd., (1999) yaptığı bir çalışmada, çökerten belirtisi göstermeyen sağlıklı pamuk bitkilerinin rizosfer toprağından elde ettikleri 128 *P. fluorescens* izolatının, çökerten etmeni *R. solani*'ye karşı *in-vitro* koşullarda 17 izolat güçlü antagonistik etki göstermiştir. Bakteriyel izolatlar, pamuk tohumlarına kurutulmuş xanthan sakızı (XG) ve sulu süspansiyon olmak üzere 2 farklı şekilde uygulanmıştır. Kurutulmuş XG formülasyonu sulu süspansiyona göre daha etkili olmuş, fide çıkış oranını arttırmış ve hastalık oranında iyi bir düşüş sağladığı bildirilmiştir.

2007 yılında yapılan bir başka çalışmada, çökerten etmeni *R. solani*'ye karşı, bir fungal biyopreparat (*Trichoderma harzianum*), üç farklı fungusit (carboxin 205 g/l + thiram 205 g/l, triadimenol %30 + metalaxyl %28,35 + trifloxistrobin %22, pyflufen 500 g/l) ve iki endofitik bakteri (*B. megaterium*, *B. cepacia*) kullanılmıştır. Carmen çeşit pamuk tohumlarına, tohum uygulaması şeklinde iklim odası ve tarla denemeleri yürütülmüştür. Fungisitler önerilen dozlarda tohumlara kaplanarak 12 saat oda sıcaklığında kurutulması sağlanmıştır. Antagonist bakteriler ise, 1 dk. yüzey dezenfeksiyonu yapılan tohumlar, 100 mg bakteri ve 1 ml %1,5 karboksimetil selüloz (CMC) ile kaplanmıştır. Çalışma sonucu pamuk bitkisinden izole edilen *B. cepacia* bakterisi çıkış öncesi çökertene %19,38 etki ve sağlıklı fide çıkışına %53,75 etkiyle kimyasal fungusit uygulamalarına en yakın etkiyi göstermiş ve *R. solani*'yi baskıladığı saptanmıştır. Tarla denemelerinde ise sağlıklı fide oranında *B. cepacia* bakterisi, *T. harzianum* ticari preparatından sonra etkili preparat olarak saptanmıştır (Akpınar, 2008).

Jorjani vd., (2012) şeker pancarında çökertene yol açan *R. solani*'ye karşı *P. fluorescens* ve *B. coagulans* olmak üzere iki farklı bakteri izolatının etkinliğini denemişlerdir. Araştırmacılar taşıyıcı materyal olarak; 2 inorganik (talk pudrası, bentonit) ve 2 organik (torf, pirinç kepeğı) madde olacak şekilde kullanmışlardır. Araştırmacılar, kaplama materyali ve antagonist bakterilerin etkinliğini saptayabilmek amacıyla oluşturdukları iklim odası denemelerinde %1

(ağırlık/ağırlık) *R. solani* inokulumlu toprak hazırladıklarını ve saksıları 4 tekerrürden oluşturduklarını bildirmişlerdir. Hastalığa karşı torf materyali ile uygulanan *B. coagulans* izolatının %60,4 etki göstererek en etkili karakter olduğunu, aynı izolatın talk pudrası ile uygulanmasının ise %54,4 oranında hastalığı baskıladığını bildirmişlerdir. Aynı denemede diğer antagonist izolat olan *P. fluorescens*'in torf materyali ile uygulanmasının ise hastalığı %55,3 oranında baskıladığı görülürken, kimyasal fungusit Carboxin + Thiram uygulamalarının ise hastalığı %53,4 oranında baskıladığını saptamışlardır.

Bir diğer çalışmada araştırmacılar, antagonist etkinliklerini ikili kültür testleri ile belirledikleri bakteri izolatları ile *R. solani*'ye karşı iklim odasında biyolojik mücadele olanaklarını araştırmışlardır. Antagonist etkideki bakteri izolatlarından hazırlanan süspansiyonlarında, pamuk tohumları bekletilerek tohumlarla muamele edilmesi sağlanmıştır. İklim odası koşullarında 4 tekerrürlü olarak kurulan deneme sonuçlarında, ekimden 15 gün sonra kontroller yapılmıştır. Uygulama yapılmamış kontrol grubunda hastalık oranının %69 olduğu görülürken, Carboxin + thiram uygulanan ilaçlı kontrol grubunda %34 oranında görüldüğünü bildirmişlerdir. Ayrıca antagonist bakteri süspansiyonlarının uygulandığı karakterlerde ise; *P. aureofaciens* izolatı hastalığa karşı en yüksek etkinliği göstererek, hastalığın %25 oranında görüldüğünü rapor etmişlerdir (Samavat vd., 2014a).

Khiyami vd., (2014) gram pozitif *Bacillus* türü bakteri izolatları ile çökerten hastalık etmeni *R. solani*'ye karşı iklim odası koşullarında bir çalışma yürütmüşlerdir. Araştırmacılar bakteri izolatlarından hazırladıkları süspansiyonları ayrı ayrı talk pudrası ve %1'lik CMC solüsyonu ile karıştırarak kaplama malzemesi elde ettiklerini bildirmişlerdir. Elde edilen bu kaplama malzemesinden 10 g/kg tohum olacak şekilde havsız pamuk tohumlarını kaplamışlardır. İklim odası koşullarında gerçekleştirilen deneme sonuçlarına göre; uygulama yapılmayan kontrol grubunda %5 oranında sağlıklı fide saptadıklarını bildirmişlerdir. En yüksek etkiyi ise *Bacillus cereus* izolatı ile kaplanan tohumlarda %85'e varan sağlıklı fidelerin çıkış yaptığını bildirmişlerdir.

Yapılan bir başka çalışmada araştırmacılar, çökerten hastalık etmeni *R. solani*'ye karşı, antagonistik özelliğini ikili kültür testleri ile saptadıkları *P. aureofaciens* 30-84 izolatını 4 farklı kaplama materyali (talk pudrası, pirinç unu, soya unu, pamuk tohumu küspesi) ile birlikte tohuma uygulamışlardır. Uygulama yapılan tohumlarla kurulan saksı denemesindeki 15 günlük fide ölüm oranlarını

saptamışlardır. Bu sonuçlara göre ölüm oranı uygulama yapılmamış tohumlarda %58,33 olarak saptanmıştır. Antagonist uygulaması yapılan tohumlardaki ölüm oranlarının fungusit uygulamasından daha iyi olduğu, pirinç unu ile birlikte yapılan uygulamalarda %6,25 olarak görüldüğünü, talk pudrası ile birlikte yapılan uygulamalarda ise %25 ölüm oranlarını saptadıklarını bildirmişlerdir (Samavat vd., 2014b).

Pamuk çökerten etmenlerine karşı *in-vitro* koşullarda yürütülen bir başka çalışmada, araştırmacılar pamuk bitkisi ve yabancı otlardan izole ettikleri 59 floresan *Pseudomonas* izolatının ikili kültür testleri ile antagonistik etkinliklerini belirlemişlerdir. Antagonistik özellikte bulunan bakteri izolatlarından hazırlanan süspansiyonlar %1'lik CMC solüsyonu ile birlikte pamuk tohumlarına uygulanmıştır. İklim odası koşullarında kurulan saksı denemesi sonuçlarına göre 2 izolatın, hastalık etmeni üç patojene karşı %70 oranında baskıladığını bildirmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar bu iki izolatın, denemede kullanılan fungusit (Vitavax, Maxim) ve biyofungisit (Subtilex) kadar etkili olduğunu ümit verici sonuçlar elde ettiklerini rapor etmişlerdir (Erdoğan vd., 2016).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Çalışmalarımızda Aydın ili ilçelerinde yetiştirilen sağlıklı pamuk bitkilerinin kökünden izole edilen antagonist bakteriler ve yine çalışma kapsamında izole edilmiş olan bir *Rhizoctonia solani* izolatu kullanılmıştır. Bitki çalışmalarında ise yöre üreticilerinin sıklıkla tercih ettiği ve bölge coğrafyasında en fazla kullanılan çeşitlerden biri olan Gloria çeşit havsız pamuk tohumu kullanılmıştır. Elde edilen antagonist bakterilerin tüm laboratuvar testleri Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Fitobakteriyoloji laboratuvarında yürütülmüştür. Saksı denemeleri ise, yine aynı bilim dalında bulunan ortalama 25,1°C sıcaklık ve %67,9 nem koşullarındaki 16 saat aydınlık 8 saat karanlık fotoperiyotlu iklim odasında yürütülmüştür. Çalışmalarda kullanılan toprak fakülte uygulama arazisinden tarım dışı alandan elde edilmiş ve 5 mm'lik elekten geçirilerek kullanılmıştır. Tohum kaplama çalışmalarında kullanılan cihaz tarafımızca geliştirilmiştir. Tohum kaplama materyali olarak Aydın ili Koçarlı ilçesinden elde edilen kurutulmuş kil kullanılmıştır. Tohum kaplama boyası olarak ise tohum kaplama için geliştirilen özel bir polimer boyadan (Sepiret 3242, BASF) yararlanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Çalışmalarda Kullanılacak Hastalık Etmeninin Elde Edilmesi

Çalışmada kullanılmak üzere pamukta çökerten hastalığı etmeni *Rhizoctonia solani*'yi elde etmek amacıyla bir ön sürvey olarak pamuk arazileri dolaşmış, hastalık belirtisi gösteren bitkilerden izolasyon yapılmıştır. Ancak bu tarih (28.06.2019) bölge için çökerten hastalığının görülmesi açısından geç olduğu için etmene rastlanamamıştır. Yapılan morfolojik ve mikroskobik incelemeler sonucunda elde edilen izolatların 10 adedi *Fusarium* spp. ve 1 adedi *Macrophomina* sp. olduğu bulunmuş ve çalışma konusu dışında kaldığı için kullanılmamıştır (veri sunulmamıştır). Bu çalışmaya ek olarak (Paulitz ve Schroeder, 2005)'de bildirilen kürdan yöntemiyle daha önceden pamuk ekimi yapılmış topraklardan etmeni izole etme çalışmaları da denenmiştir. Bu çalışmalar sonucunda elde edilen *R. solani* izolatları (4 adet) yapılan patojenisite testleri ile virüent olmadığı belirlenmiştir (Veri sunulmamıştır). Tüm bu izolasyon

denemelerinin ardından aşağıdaki yöntem kullanılarak tez çalışmasında değerlendirilecek virulent bir *R. solani* izolatu arayışı çalışmalarına devam edilmiştir.

Bu amaçla, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Ziraat Fakültesi arazilerinde pamuk yetiştirilen 10 farklı lokasyondan (Çizelge 3.1; Şekil 3.1) toprak alınmış, saksılara eşit miktarda koyularak pamuk tohumları (Carmen çeşidi) ekilmiş ve iklim odasına bırakılmıştır. On gün sonunda saksılarda çöken fideler alınarak laboratuvara getirilmiş ve standart fungus izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen izolatlardan preparat hazırlanarak, mikroskop altında incelenmiştir (Leica DMLS mikroskop ve Leica DFC320 fotoğraf ataçmanı). Seçilen şüpheli bir izolat ile patojenite çalışmaları ise şu şekilde gerçekleştirilmiştir. Martin, (2000)'de belirtilen yöntem değiştirilerek kepek kültürü hazırlanmıştır. Kepek kültürünün içeriği 250 ml yulaf kepeği, 250 ml vermikülit ve 100 ml distile su olacak şekilde hazırlanmış ve homojen olarak karıştırılması sağlanmıştır. 100 ml'lik kavanozlar içine konulan 15 g kepek kültürü 121°C'de 30 dk. art arda 2 gün sterilize edilmiştir. Sterilizasyonu sağlanan kepek kültürü kavanozlarına 4 günlük PDA ortamında geliştirilen izolatlardan 3'er adet 10 mm çapında fungus plağı atılarak karıştırılmıştır. Altı gün 25°C'lik inkübasyon süresinin sonunda inokulumlu kepek kültürü %5 ve %2,5 oranında toprakla karıştırılmıştır. Bu topraklar 500 ml'lik saksılara 300 g olacak şekilde dağıtılmış ve her saksıya 20 tohum ekilmiştir. Ayrıca inokulum karıştırılmayan bir de kontrol grubu bırakılmıştır. Değerlendirmeler ekimden 10 gün sonra çimlenip çıkış yapan bitkilerin sayılması şeklinde yapılmıştır.

Çizelge 3.1. *Rhizoctonia solani* izolasyonu için değerlendirilen toprak örneklerinin kodları ve alındıkları lokasyonlar.

Sıra No	Kod	Koordinat (Enlem Boylam, Ondalıklı derece)
1	A1	37,763767 27,760462
2	A2	37,764060 27,760548
3	A3	37,764272 27,760505
4	S1	37,764080 27,759647
5	S2	37,764144 27,759419
6	DG1	37,764220 27,757847
7	DG2	37,764258 27,758035
8	DG3	37,764457 27,757949
9	TH1	37,761133 27,759750
10	TH2	37,760492 27,759619



Şekil 3.1. *Rhizoctonia solani* izolasyonu için alınan toprak örneklerinin harita üzerindeki konumları (Numaralar Çizelge 3.1'deki sıra numaralarını göstermektedir).

3.2.2. Antagonist Bakterilerin İzolasyonu

Antagonist bakteri izolatlarını elde etmek amacıyla; 28.08.2019 – 26.09.2019 tarihleri arasında, Aydın ilinde 22 farklı pamuk arazisi dolaşmıştır. Bu bağlamda; pamuk tarımının yoğun olarak yapıldığı ilçelere tesadüfi olarak gidilmiştir. Üretim miktarı verileri göz önüne alınarak Söke ilçesinden 10, Koçarlı ilçesinden 7, Didim ve Efeler ilçelerinden 5'er adet olmak üzere 27 adet bitki örneği toplanmıştır. Özellikle sağlıklı gözükten ve diğerlerinden iri bir gelişim gösteren bitkiler köklenmiş ve üst kısım kesilerek atılmıştır. Kökler toprağı ile birlikte polietilen torbalara konularak etiketlenmiş ve buz kutusunda laboratuvara getirilerek buzdolabına kaldırılmıştır. İzolasyon çalışmalarına en geç 1 gün içinde başlanmıştır.

Buzdolabından çıkarılan pamuk bitkisi kök örnekleri, su kullanmadan elle vurularak toprağından arındırılmış ve kök yüzeyine yapışmış olan toprak parçaları bırakılmıştır. Ardından steril bistüri yardımıyla köklerden 1–2 cm boyunda parçalar kesilip 3'er g tartularak içerisinde 27 ml steril fizyolojik serum (%0,85

NaCl, pH 7,0) bulunan stomacher torbalarına alınmıştır. Daha sonra 1 dk. stomacher cihazı (BagMixer, Interscience, Fransa) ile kök parçaları homojenize edilmiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Laboratuvara getirilen pamuk bitkisi kök örneklerinden antagonist bakteri izolasyonu (**Soldan sağa sırasıyla;** Polietilen torbadaki bitki örneği, köklerden 3 g parçalar kesilmesi, kesilen parçaların stomacher poşetine koyulması, stomacher cihazında bitki örneklerinin karıştırılması).

Elde edilen süspansiyondan 10^{-5} 'e kadar seyreltme serileri hazırlanmıştır. Bu seriden 10^{-3} , 10^{-4} ve 10^{-5} seyreltmeleri 100 µl olacak şekilde KB (King vd., 1954) besi yerine cam baget yardımıyla yayılarak ekilmiştir (Şekil 3.3). 25°C 'de 4 gün gelişimin ardından petrilere gelişen bakteri kolonilerinin sayımı yapılmış, ayrıca 366 nm dalga boyundaki UV ışık ile floresan verme özelliklerine göre de koloniler sayılarak not edilmiştir. Daha sonra bu kolonilerden, floresan verme ve morfolojik açıdan farklı özellikte belirlenenlerden, KB besi yerine tek koloni düşecek şekilde saflaştırılmıştır.



Şekil 3.3. Bitki köklerinden elde edilen süspansiyon serisinin KB besi yerine ekilmesi (**Soldan sağa sırasıyla;** stomacher cihazından çıkan süspansiyonun alınması, süspansiyonun seyreltilmesi, KB besi yerine seyreltilen süspansiyondan 100 µl eklenmesi, süspansiyonun camet yardımıyla besi yerine yayılması).

3.2.3. Bakterilerin Antagonist Etkinliğinin İkili Kültür Testleri ile Saptanması

Pamuk bitki kök bölgesinden izole edilen bakteri izolatlarının hastalık etmenine karşı antagonist etkinliğini saptamak amacıyla *in-vitro* koşullarda petri kabında ikili kültür testleri yapılmıştır. Bu amaçla bakteriler NA (Nutrient Agar) besi yerinde 24–48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Gelişen bakteri izolatlarından öze yardımıyla alınarak, alt yüzeyinde şablon bulunan PDA besi yerine merkezden 25 mm uzaklıkta olacak şekilde dört ayrı noktaya 5 mm çaplı daire olacak şekilde ekilmiştir. Bakteri inokülasyonundan 24 saat sonra, çalışma kapsamında izole edilen ve virülent bir izolat olan DG2 *R. solani* izolatının 10 mm çaplı agar plağı petrinin merkezine koyulmuştur. Kontrol petrilere ise bakteri inokülasyonu yapılmadan fungus ekimi yapılmıştır. Besi yerleri 20°C’de inkübasyona bırakılmıştır. Kontrol petrisindeki fungal gelişim 50 mm çapa ulaşmasıyla, konulan fungus plağının kenarından başlamak üzere, gelişen fungusun uzunluğu 4 farklı noktadan kumpas yardımıyla ölçümü ve kontrolle kıyaslanarak engelleme oranı hesaplanmıştır (Özyılmaz, 2007). Denemeler 4 tekerrürlü olarak yürütülmüştür. Hiçbir engelleme zonu oluşturmayan bakteriler elenerek diğer testlere alınmamıştır.

3.2.4. Antagonist Bakteriler için Ön Eleme Testleri

Antagonist bakterilerin seçimini kolaylaştırması amacıyla bazı ön testler yapılmıştır. Bu testlerin detayları aşağıda gösterilmiştir.

Tütünde aşırı duyarlılık: Elde edilen antagonist etkiye sahip bakterilerin bitki üzerine olabilecek olumsuz etkilerin saptanması amacıyla tütünde aşırı duyarlılık testleri uygulanmıştır (Klement, 1963). Bunun için 24–48 saat geliştirilmiş NA kültürlerinden steril distile su içine 10^8 CFU/ml olacak şekilde bakteri süspansiyonları hazırlanmıştır. Süspansiyonlar, iklim odasında yaklaşık 2,5 aylık White Burley çeşidi tütün bitkisinin yaprak damar aralarına ince uçlu insülin enjektörü yardımıyla inoküle edilmiştir (Şekil 3.4). İnokülasyon bölgesinde 24–72 saat içinde oluşan derimsi ölü doku belirtisi pozitif sonuç olarak kaydedilmiştir. Pozitif kontrol olarak *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* (NCPPB 277, Plac277), negatif kontrol olarak steril su kullanılmıştır. Tütün testleri birbirinden bağımsız olarak 3 kere yinelenmiştir.



Şekil 3.4. Bakteri süspansiyonlarının tütün bitkisine inoküle edilmesi (**Sol:** tütün yapraklarına inokulasyon işlemi, **sağ:** süspansiyonların tütün yaprağına enjekte edilmesi sonrası görünüm).

Endospor için ısı testi: Bu test Gram pozitif bakterilerin dayanıklılık yapısı olan endospor varlığını ortaya koymak amacıyla yapılmıştır. Bu amaçla; 24–48 saat NA besi yerinde gelişmiş bakteri kültürleri öze dolusu olacak şekilde, içlerinde 200 µl steril su bulunan steril eppendorf tüplere alınarak süspansiyon hazırlanmıştır. Bu süspansiyonlardan sıcak uygulaması öncesi bir öze dolusu alınıp NA besi yerine çizgi ekimi yapılmıştır. Daha sonra tüpler kuru sıcak blokta (Biosan, Letonya) 80°C ısıda 15 dk. maruz bırakılmıştır. Cihazdan alınan tüplerden tekrar bir öze dolusu alınarak NA besi yerine ekimi yapılmıştır. Her bakteri izolatına ait iki petri de 25°C’de inkübasyona bırakılmış ve sıcak uygulaması yapılmış petrielerde 48 saat içinde gelişimin görülmesi pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Bradbury, 1970). Denemeler farklı zamanlarda iki kere tekrar edilmiştir.

Patateste yumuşak çürüklük testi: Bu testler antagonist bakterilerin pektolitik aktivitesinin belirlenmesi amacı ile yapılmıştır. Testte kullanılacak patatesler soyulmuş ve yıkanmıştır. Ardından patates bütün olarak %96’lık etil alkolde 1 dk. bekletilmiş ardından üzerindeki alkol yakılmıştır. Üzerindeki alkol yakılarak uzaklaştırılan patatesler daha sonra kurutma kağıtları üzerine yerleştirilmiştir. Sonrasında patates dilimleri 1 cm kalınlık ve yaklaşık 4–6 cm² alan oluşturacak şekilde steril bistüri yardımıyla parçalara ayrılmıştır. Bu parçalar, içerisinde 1 ml steril distile su ile nemlendirilmiş steril kurutma kâğıdı bulunan petri kaplarının içerisine yerleştirilmiştir. Patates parçaları yüzeyine 24–48 saatlik NA besi yerinde geliştirilen bakteri izolatları ile öze yardımıyla yayılarak inokulasyon yapılmış ve 25°C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda yumuşama görülen

patates dilimleri pozitif olarak değerlendirilmiştir. Pozitif kontrol olarak *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (SCRI 133, Ecc133) izolatu kullanılırken, ekim yapılmamış patatesler ise negatif kontrol olarak bırakılmıştır (Bradbury, 1970).

37°C'de gelişme: Bu çalışmalar antagonist bakterilerin laboratuvar koşullarından 37°C'de gelişebilme yeteneklerini saptanması amacıyla yapılmıştır. Bu test Özyılmaz, (2007)'da tarif edildiği şekliyle uygulanmıştır. 24–48 saatlik NA besi yerinde geliştirilmiş bakteri kültürlerinden her biri 2 farklı NA besi yerlerine ekilmiştir. Ardından bu petri kapları biri 25°C diğeri 37°C'de 2 gün boyunca inkübasyona bırakılmış ve inkübasyon sonucu bakterilerin iki farklı sıcaklıktaki gelişimleri kaydedilmiştir.

3.2.5. Antagonist Bakteriler için Ön Tanılama Testleri

Antagonist bakterilerin tanınması amacıyla bazı basit bakteriyolojik testler uygulanmıştır. Testlerin detayları aşağıda verilmiştir.

Gram boyama: Bakterilerin Gram reaksiyonunun belirlenmesi ve hücre şekillerinin saptanması amacıyla Klement, (1968)'de belirtilen prosedürden yararlanılmıştır. Bunun için, lam üzerine bir damla steril distile su damlatılmış ve 24–48 saatlik NA besi yerinde geliştirilmiş bakterilerden öze yardımıyla çok az bir miktar alınarak lam üzerine yaydırılmıştır. Sonrasında, lam hafifçe alevden geçirilerek bakterilerin lam üzerine sabitlenmesi sağlanmıştır. Lama crystal violet solüsyonu (%0,5) dökülerek 1 dakika bekletildikten sonra çeşme suyuyla yıkanmıştır. Ardından gram iodine solüsyonu (%1) dökülmüş ve 1 dakikalık beklemenin ardından tekrar çeşme suyuyla yıkanmıştır. Sonrasında lam üzeri etil alkol (%95) ile 30 sn yıkanmıştır. Son olarak lam üzeri safranin solüsyonu (%0,5) ile kaplanmış ve 1 dk. beklemenin ardından lam yıkanarak temiz kurutma kâğıdı ile dikkatlice kurulanmıştır. Tüm bu işlemlerin sonunda hazırlanan preparatlara mikroskopta (Leica DMLS mikroskop ve Leica DFC320 fotoğraf ataçmanı) 100× objektif altında immersiyon yağı ile bakılmış ve mavi-mor gözüken bakteriler gram pozitif, pembe-kırmızı gözüken bakteriler ise gram negatif olarak değerlendirilmiştir. Bu işlem sırasında hücre şekilleri ayrıca kaydedilmiştir.

Floresan pigment oluşumu testi: Bakteri izolatları KB besi yerine ekilerek 24–48 saat 25°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Gelişim ardından 366 nm dalga boyundaki

UV ışık altında floresan ışımaya yapan koloniler pozitif olarak kaydedilmiştir (King vd., 1954).

Nitrat indirgeme testi: Lelliott vd., (1966)'da bildirildiğine göre yapılmıştır. Tüplere 4 ml olacak şekilde besi yeri (1 g peptone, 0,5 g K_2HPO_4 , 0,2 g agar, 0,1 g yeast extract, 100 ml distile su, 7,2 pH) hazırlanmıştır. Nitrat ayırıcı olarak; Solüsyon A (400 mg sulfanilik asit, 50 ml 5 N asetik asit) ve Solüsyon B (300 mg 1-naphthylamine, 50 ml 5 N asetik asit) kullanılmıştır. Hazırlanmış olan besi yeri önce 121°C'de 1 dk. eritilmiş ve vida kapaklı tüplere 4'er ml koyulmuştur. Ardından 121°C'de 15 dk. otoklav edilerek sterilizasyonu sağlanmıştır. NA besi yerinde 24-48 saat geliştirilmiş bakteri izolatlarından öze yardımıyla alınarak hazırlanan tüplere batırma inokülasyonu gerçekleştirilmiştir. 25°C'de 3 günlük inkübasyonun ardından, tüplerin içine pastör pipeti yardımıyla 1'er damla gram iodine ve mikropipet yardımıyla 250 µl solüsyon A ve 250 µl solüsyon B eklenmiştir. Birkaç dakika beklemenin ardından tüplerde kırmızı renk oluşması nitratın indirgenmiş olduğunu göstermiş ve pozitif olarak değerlendirilmiştir. Birkaç dakika içerisinde renk oluşumu gözlemlenmeyen tüplerin içerisine az bir miktar çinko tozu eklenmiş ve tüplerde renk oluşması negatif, renk oluşmaması ise pozitif olarak değerlendirilmiştir. Pozitif kontrol olarak *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Ecc133) izolatı kullanılmıştır. Negatif kontrol amacıyla ise *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* (Plac277) kullanılmıştır.

Oksidaz testi: Kovacs, (1956)'da belirtilene göre; %1 tetra methyl-p-phenylendiamine dihydrochloride içeren test solüsyonu kullanılmıştır. NA besi yerinde 24-48 geliştiril bakteri izolatlarından steril kürdan ile bir miktar alınarak steril Whatman No.1 filtre kâğıdı üzerine yaydırılmıştır. Ardından, test solüsyonu pastör pipetiyle 1 damla damlatılmış ve kültürün 10 sn. içinde mavimsi mor renk alması pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Oksidatif fermentatif (O/F) reaksiyon testi: Test için 1 g pepton, 1 g $NH_4H_2PO_4$, 0,2 g KCl, 0,2 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,03 g bromothymol blue, 3 g agar, 1000 ml (7,2 pH) distile su kullanılarak besi yeri yapılmıştır. Ayrıca glikoz %10 olacak şekilde ayrı şişede yapılarak besi yeri ve glikoz çözeltisi 121°C'de 15 dk. otoklav işlemi gerçekleştirilmiştir. Altmış dereceye kadar soğumaya bekletilen besi yeri ve glikoz çözeltisi steril kabin içerisinde homojen karıştırılması sağlanmış ve vida kapaklı tüpler içerisine 4'er ml olacak şekilde dağıtılmıştır. Besi yeri soğuduktan sonra NA ortamında 25°C'de 24-48 saat geliştirilmiş olan bakteri izolatlarından özeyle

alınıp 2 ayrı tüpe tüp dibine ulaşacak şekilde batırma inokülasyon yapılmıştır. Tüplerden birinin üzerine 1 cm yükseklik oluşturacak şekilde sıvı vazelin (Sokol) ilave edilmiş diğeri ise boş bırakılmıştır. 25°C'de 48 saat inkübasyon süresi sonunda tüplerde sarı renk oluşumu pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir. Pozitif kontrol olarak *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Ecc133) kullanılırken, renk kıyaslaması yapabilmek amacıyla negatif kontrol olarak inokule edilmemiş tüpler kullanılmıştır (Bradbury, 1970).

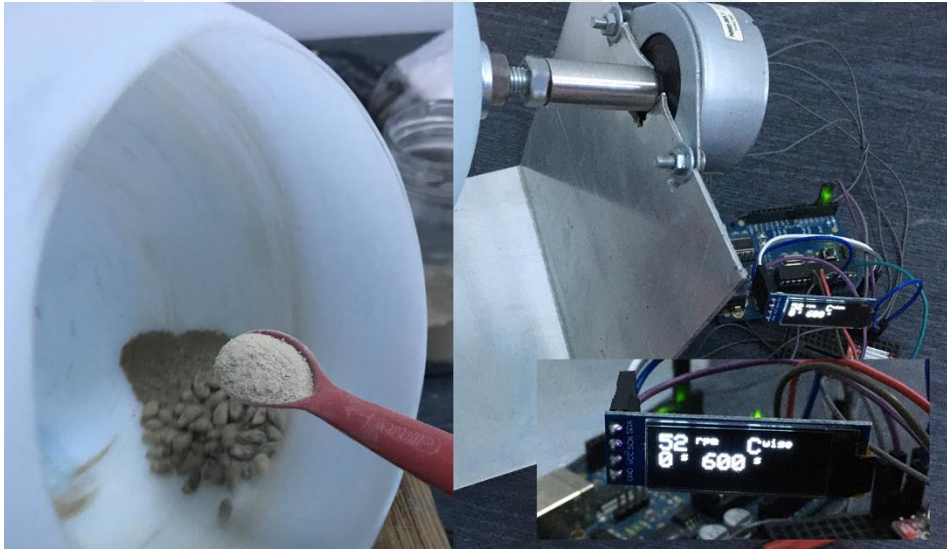
Arjinin testi: Arginin hidroliz testi için Thornley, (1960)'de verilen yönteme göre 2A besi yeri yapılmıştır. Bu besi yeri için 1 g L-arginine hydrochloride, 0,5 g sodium chloride, 0,1 g peptone, 0,03 g K₂HPO₄, 0,001 phenol red sırasıyla 100 ml suda karıştırılmış ve besi yeri pH'sı 7-7,2 olacak şekilde ayarlanmıştır. Ardından üzerine 0,3 g agar eklenmiş, 121°C'de 1 dk. otoklav işlemi yapılarak eritilmiştir. Vida kapaklı tüplere 3'er ml koyularak 15 dk. 121°C otoklav işlemi yapılmış ve soğumaya bırakılmıştır. Daha sonra 24-48 saatlik NA bakteri kültürlerinden öze yardımıyla alınarak batırma inokülasyon yapılmış ve besi yeri üzerine 1 cm yükseklik oluşturacak şekilde sıvı vazelin (Sokol) ilavesi yapılmıştır. 25°C de 3 günlük inkübasyonun ardından yapılan gözlem sonucu besi yerinin kırmızıya dönmesi pozitif, değişiklik göstermemesi ise negatif olarak değerlendirilmiştir. Pozitif kontrol olarak *Pseudomonas corrugata* (NCPBB 2445, Pc2445) kullanılırken, renk kıyaslaması yapabilmek amacıyla negatif kontrol olarak inokule edilmemiş tüpler kullanılmıştır.

Levan oluşumu testi: Bu test için Lelliott vd., (1966)'de belirtilen yönteme göre, Nutrient Sucrose Agar (NSA) yapılmıştır. 2 g Nutrient agar, 5 g sükröz, 100 ml distile su karıştırılarak 15 dk. 121°C'de otoklav ile sterilize edilmiştir. Otoklav işlemi sonrasında besi yeri perilere dökülmüştür. 24-48 saat NA ortamında geliştirilen izolatlardan öze yardımıyla alınarak tek koloni düşecek şekilde ekimi gerçekleştirilmiştir. 25°C'de inkübasyona bırakılan izolatların 72 saat gelişme süresi sonucunda kubbeli ve mukoid koloni oluşturanları pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir.

3.2.6. Tohum Kaplama Çalışmaları

Antagonist bakteri izolatlarının, koruyucu materyal yardımıyla havsız pamuk tohumları (Gloria) üzerine tutturulması/kaplanması amacıyla ilk olarak kaplama çalışmaları yürütülmüştür. Tohum kaplama çalışmaları tarafımızca tasarlanan bir

cihaz yardımıyla yapılmıştır (https://github.com/uozyilmaz/seed_coating). Bu cihaz 20 cm çaplı küresel bir haznenin dönen bir mile bağlanması ile oluşturulmuştur. Cihazın devri ayarlanabilmektedir. Yapılan ön denemeler ile 100 devir/dk ve yatayla 35 derecelik bir açı değerinin 50 tohumun kaplanması için uygun bir değer olduğu saptanmıştır. Geliştirilen bu cihazın benzer versiyonlarının tohum kaplama amacıyla kullanımı çok eskiye dayanmakta olduğu yapılan literatür taramalarıyla belirlenmiştir (Kapur ve Fuerstenau, 1967; Lyne ve Johnston, 1981) (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Tohum kaplamada kullanılan cihaz.

Kaplama malzemelerinin pamuk tohumu çimlenme gücüne etkileri

Çalışmalarda tohum kaplamak amacıyla iki kaplama materyali denenmiştir. Bunlardan biri Aydın / Koçarlı ilçesinden elde edilen kil, diğeri ise piyasadadan temin edilen CC002 (Kwizda, covercoat) kaplama malzemesidir. Kil kullanılmadan önce 180°C’de 1 saat bekletilerek iyice kurutulmuş, ardından havanda ezilmiş ve 500 mikronluk elekten geçirilmiştir. Kaplanacak olan tohumlar 1 dk. süreyle suda bekletilmiş, fazla suyundan arındırılmış ve cihazın kaplama haznesi içine alınmıştır. Cihaz çalıştırılmış ve tohumlar içinde yuvarlanırken üzerine yavaşça kaplama materyalleri eklenmiştir. Elli tohumun kaplanması için 4,8 g kaplama malzemesi kullanılmıştır. Daha sonra tohumlar, kaplama materyalinin kuruması amacıyla 24 saat 25°C’de bekletilmiştir. Kaplanan

tohumlar eşit sayıda ikiye ayrılarak yarısı polimer ile boyanırken (Pülverizasyon şeklinde) (Sepiret 3242 Blue, BASF), diğer yarısına boyama işlemi yapılmamıştır. Daha sonra tohumlar 24 saat 25°C'de kurumaya bırakılmıştır. Kaplama materyallerinin tohum çimlenme gücüne etkisini saptayabilmek amacıyla tesadüf parselleri deneme desenine göre 3 tekerrürlü saksı denemesi kurulmuştur. Her saksıda 800 g toprak içine 20 adet uygulama yapılmış tohum ekilmiştir. Denemeye bu karakterlere ek olarak çıplak tohumlara boya kaplama ve hiçbir uygulama yapılmamış tohumlar da ayrı birer karakter olarak eklenmiştir. Değerlendirmeler ekimden 10 gün sonra çimlenip çıkış yapan bitkilerin sayılması şeklinde yapılmıştır.

Polimer boyanın tohuma uygulama şeklinin belirlenmesi

Kaplama materyali ile kaplanan tohumların uygulama sırasında dağılmaması ve uygulanacak antagonist bakterinin topraktaki olumsuz koşullardan doğrudan etkilenmemesi amacıyla, tohumlar kaplandıktan sonra bu iş için geliştirilmiş olan polimer boya maddesi ile kaplanmıştır. Kullanılan boya maddesi (BASF Sepiret 3242) %20 boya %80 su oranında hazırlanmıştır. Kaplanmış tohuma boya maddesinin pülverizasyon ile uygulanması ve tohumların boya içine daldırılması şekilde iki farklı yöntemle denenmiştir. Boya pülverizasyonu işlemi tohumun yüzeyi tamamen kaplanacak şekilde el spreyi yardımıyla yapılmıştır. Uygulama yapılan tohumlar kuruması amacıyla 24 saat 25°C bekletilmiştir. Kuruma periyodunun ardından tesadüf parselleri deneme desenine göre, dört farklı karakter (Kil kaplama + pülverize boya, kil kaplama + daldırma boya, kil [boyasız] ve çıplak tohum) ile 3 tekerrürlü denemeler kurulmuştur. Her saksıda 800 g toprak içine 20 adet uygulama yapılmış tohum ekilmiştir. Değerlendirmeler ekimden 10 gün sonra çimlenip çıkış yapan bitkilerin sayılması şeklinde yapılmıştır.

Boyanın antagonist bakteri canlılığına etkisi

Uygulanan boya maddesinin, bakterinin canlılığına olumlu veya olumsuz etkisini saptamak amacıyla bu denemeler kurulmuştur. Antagonist bakterileri izolatları içinden temsilci olarak seçilen bir Gram negatif (S6-3) ve bir de Gram pozitif (A4-7) bakteri bu çalışmalarda kullanılmıştır. İzolatların her birinden 10⁹ CFU/ml olacak şekilde su içine koyu süspansiyonlar hazırlanmıştır. Her bir bakteri için hazırlanan süspansiyon ikiye bölünerek, bir yarısına son konsantrasyon %20 olacak şekilde boya eklenmiştir. Negatif kontrol olarak, diğer yarıya, boya yerine

aynı oranda sadece su eklenmiştir. Süspansiyonlar 15 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Bekleme periyodunun ardından, tüpler 10^{-6} 'ya kadar seyreltilmiş, Miles vd., (1938)'de belirtilen ekim yöntemine göre seyreltme serilerinden 10^{-6} ve 10^{-5} 20'şer μ l olacak şekilde KB besi yerine 5 tekerrür ekilmiştir. Ekimi gerçekleştirilen petripler 25°C 'de 24 saat inkübasyona bırakılmış ve süre sonunda mikroskop altında gelişen koloni sayıları kaydedilmiştir.

Karboksümetil selülozun tohumda bakteri tutunumuna etkisi

Bu deneme Karboksümetil selüloz (CMC)'un tohum üstüne kaplanan bakteri miktarına etkisini belirleyebilmek amacıyla yapılmıştır. Bu çalışmalarda yine bir gram pozitif (A4-7) ve bir de gram negatif (S6-3) olmak üzere iki adet bakteri izolatu kullanılmıştır. Seçilen bakteri izolatları ikişer kopya olarak KB besi yerine, petriyi kaplayacak şekilde çizgi ekim ile ekilmiştir. 24 saat 25°C inkübasyonun ardından kolonilerin besi yerini tamamen kaplaması ve miktarının artması amacıyla yapılan çizgi ekime dik gelecek şekilde tekrardan yaydırılmıştır. 24 saat 25°C inkübasyon sürecinden sonra her petri kabına 50 adet pamuk tohumu konulmuştur. Her bir bakteri izolatu için, ilk petriye 500 μ l steril distile su diğerine ise %1'lik 500 μ l CMC pipet yardımıyla eklenmiştir. Petri kabının kapağı kapalı vaziyette 1,5 dakika hızlıca yatay hareketlerle elle sallanarak tohumların bakteri kolonileriyle iyice temas etmesi ve kaplanması sağlanmıştır. Bakterilerle kaplanan tohumlar steril kurutma kâğıdı üstüne alınarak oda sıcaklığında 4 saat kurumaya bırakılmıştır. Kuruma sürecinin ardından kaplanan tohumlardan 3'er adet alınarak içerisinde 4,5 ml steril distile su bulunan tüplerin içine atılmıştır. Tohumlar, 60 saniye 2000 devir/dakikada karıştırılarak tohum üstüne kaplanmış bakterinin suya geçmesi sağlanmıştır. Daha sonra 10^{-5} 'e kadar seyreltme serisi oluşturulmuştur. Oluşturulan 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} seyreltme serilerinin her birinden 20 μ l çekilmiş ve KB besi yerine damlatılarak ekimi gerçekleştirilmiştir. Ekimi gerçekleştirilen bakteri izolatları 25°C inkübatörde 24 saat inkübasyona bırakılmıştır ve Miles vd., (1938)'de belirtilen yöntemine göre gelişen bakteri kolonileri sayılmış ve sonuçta tohum başına kaplanan bakteri miktarı hesaplanmıştır. Denemeler 3 tekerürlü olarak yürütülmüştür.

Karboksümetil selülozun pamuk tohumu çimlenmesi üzerine etkisi

CMC'nin tohum çimlenmesi üzerine bir etkisinin olup olmadığını belirleyebilmek amacıyla bu deneme kurulmuştur. Bu amaçla denemede 4 farklı karakter

değerlendirilmiştir. Karakterler şu şekildedir; 1- Tohumların 1,5 dk. %1 CMC içinde bekletilerek standart kil kaplama uygulaması (CMC + kil), 2- Tohumların 1,5 dk. süreyle distile su içinde bekletilerek standart kil kaplama uygulaması (Su + kil), 3- Tohumların 1,5 dk. %1 CMC içinde bekletilmesi (CMC) ve 4- Uygulama yapılmayan (Çıplak) tohum. Deneme tesadüf parselleri deneme desenine göre 3 tekerrürlü olarak oluşturulmuştur. Her saksıda 800 g toprak içine 20 adet tohum ekilmiştir. Değerlendirmeler ekimden 10 gün sonra çimlenip çıkış yapan bitkilerin sayılması şeklinde yapılmıştır.

Tohuma Farklı Yöntemlerle Antagonist Uygulamalarının Bakterinin Canlılığı Üzerine Etkileri

Üstte verilen kaplama uygulamaları sonucunda; bakterinin tohuma %1'lik CMC ile bulaştırılması, ardından kaplama materyali olarak kil kullanılması ve boyama metodu olarak da kaplanmış tohumun boya (%20) içine daldırılma yönteminin uygulanmasının en uygun olduğu belirlenmiştir. Çalışmaların bundan sonraki safhasında hep bu kaplama yönteminden yararlanılmıştır.

Bu denemede ise antagonist bakterilerin farklı yöntemler ile tohuma uygulanmasının bakteri canlılığına olan etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla önceki çalışmalarda olduğu gibi bir gram pozitif (A4-7) bir de gram negatif (S6-3) bakteri izolatu kullanılmıştır. Seçilen izolatlar tohuma 3 farklı yöntemle uygulanmıştır. Tohuma bakterilerin kaplanması CMC kullanılmıştır. A: Tohum + bakteri + kil + bakterili boya, B: Tohum + bakteri + kil + boya ve C: Tohum + kil + bakterili boya. Farklı yöntemler ile kaplanan tohumlardaki bakteri miktarlarının sayımının ilki; kaplama işlemlerinden sonra tohumların kuruması için geçen 24 saat sonunda yapılmıştır. Uygulamadan 16 gün sonra son sayım olacak şekilde 4'er gün aralıklarla toplam 4 kere daha sayım yapılmıştır. İçerisinde 4,5 ml steril distile su bulunan tüplere her karakterden 3'er tohum konulmuştur. Alınan tohumlar tüplerin içerisinde 1 saat beklemenin ardından 30 saniye 2000 devir/dk.'da karıştırılmıştır. Daha sonra oluşturulan seyreltme serilerinden 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} (Miles vd., 1938)'de belirtilen yöntemle göre 20 µl olacak şekilde KB besi yerine ekimi gerçekleştirilmiştir. Denemeler 3 tekerrürlü olarak yürütülmüştür. Yirmi dört saat 25°C inkübasyonun ardından mikroskop altında incelenen bakteri kolonilerinin sayımı yapılarak tohum başına bakteri miktarları hesaplanmıştır.

3.2.7. Saksı Denemelerinde Kullanılacak Uygun Patojen İnokulum Miktarının Belirlenmesi

Saksı çalışmalarında antagonist bakterilerin etkinliğinin belirlenmesi amacıyla kullanılacak *R. solani*'li toprakların içermesi gereken inokulum miktarının belirlenmesi amacıyla bu çalışmalar yapılmıştır. Bu amaçla Martin, (2000)'de belirtilen yöntem değiştirilerek kepek kültürü hazırlanmıştır. Kepek kültürü 250 ml yulaf kepeği, 250 ml vermikülit ve 100 ml distile su olacak şekilde hazırlanmış ve homojen olarak karıştırılmıştır. Otoklava dayanıklı poşet içerisine koyulan kepek karışımı 121°C'de 30 dk. olacak şekilde art arda 2 gün sterilize edilmiştir. Hastalık etmeni olarak çalışmalar kapsamında izole edilmiş olan *R. solani* DG-2 izolatu kullanılmıştır. Patojen fungusun 1 haftalık PDA kültüründen 5 mm çaplı mantar delici ile 50 adet agar plağı çıkarılmış ve 500 ml kepek kültürü bunlarla inokule edilmiştir. Kültürler çift katlı poşet içerisinde 25°C'de inkübatöre kaldırılmıştır. Kepek kültürü içinde fungusun homojen gelişmesi için poşetler ağzları açılmadan karıştırılmıştır. 10 günlük gelişimin ardından saksı denemelerine geçilmiştir. Kepek kültürü kendi içinde homojenliği sağlamak amacıyla plastik bir küvet içerisinde iyice karıştırılmıştır. Homojenliği sağlanan kepek kültürü %5, %1 ve %0,5 (ağırlık/ağırlık) inokulum olacak şekilde steril toprakla karıştırılmıştır. Deneme tesadüf parselleri deneme desenine göre 3 tekerrürlü olarak yürütülmüştür. Denemelere inokulum eklenmeyen bir de kontrol grubu eklenmiştir. Her saksıda 800 g toprak içine 20 adet hiçbir uygulama yapılmamış çıplak tohum ekilmiştir. Değerlendirmeler ekimden 10 gün sonra çimlenip çıkış yapan bitkilerin sayılması şeklinde yapılmıştır.

3.2.8. Antagonist Bakterilerin 16s rRNA Sekans Analizi ile Tanınması

Antagonist bakteriler başlık 3.2.4 ve 3.2.5'te belirtildiği üzere bazı ön testler ile tanılanmaya çalışılmış ve verdikleri reaksiyonlar değerlendirilerek antagonist olarak kullanılabilme potansiyelleri araştırılmıştır. Bu başlık altında ise antagonist bakterilerin 16s rRNA sekans analizleri ile tam olarak tür teşhisleri moleküler düzeyde yapılmaya çalışılmıştır. Bunun için ilk önce bakterilerden genomik DNA ekstraksiyon işlemi yapılmıştır. Bunun için De Boer ve Ward, (1995)'in önerdiği yöntemden yararlanılmıştır. Yirmi dört saatlik NA kültüründe gelişen bakterilerden bir öze dolusu alınarak mikro santrifüj tüplerinde bulunan 200 µl liziz tampona (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, NaCl 100 mM, SDS %1, pH 8,0) süspansiyon edilmiştir. Bu süspansiyon 55°C'ye ayarlı katı blok ısıtıcıda (Biosan,

Letonya) 1 saat bekletilmiştir. Daha sonra üzerine 100 µl soğuk 7,5 M amonyum asetat eklenmiş, karıştırılmış ve 15 dk. süre ile buza alınmıştır. Tüpler 14.000 rpm'de 5 dk. santrifüj edilmiş ve süpernatant yeni tüpe aktarılmıştır. Üzerine 300 µl soğuk isopropanol ilave edilmiş ve tüpler birkaç kez ters düz edilmiştir. Oda sıcaklığında 5 dk. bekledikten sonra tüpler 14.000 rpm'de 20 dk. santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır. Pellet üzerine 600 µl soğuk etanol (%70) eklenmiş ve 14.000 rpm'de 1 dk. santrifüj edilmiştir. Süpernatant dökülmüş ve tüpler steril kurutma kağıtları üzerine ters çevrilerek konulmuş ve geri kalan etanolün uçması sağlanmıştır. Pellet 100 µl T₁₀E₁ ile süspanse edilmiş ve genomik DNA ekstraksiyon işlemi tamamlanmıştır.

DNA ekstraktları fazla bekletilmeden PCR, saflaştırma ve sekans analizlerinin yapılması için Macrogen (Kore) şirketine gönderilmiştir. Aşağıda belirtilen çalışmalar şirket tarafından gerçekleştirilmiştir. PCR çalışmalarında 27F (AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG) / 1492R (TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T) universal primer çifti kullanılmıştır. Taq polimerase enzimi olarak Dr. MAX DNA Polymerase (Doctor protein INC, Korea)'dan yararlanılırken PCR cihazı olarak DNA Engine Tetrad 2 Peltier Thermal Cyclers (BIO-RAD) kullanılmıştır. PCR koşulları ise 35 döngü olacak şekilde 95°C'de 30 sn. denatürasyon, 58°C'de 30 sn. annealing ve 72°C'de 60 sn. uzama şeklinde ayarlanmıştır. Ayrıca PCR programına 95°C'de 5 dk. başlangıç denatürasyonu ile 72°C'de 7 dk. son uzama adımları eklenmiştir. PCR ürünlerinin saflaştırılmasının ardından 518F (CCA GCA GCC GCG GTA ATA CG) primeri kullanılarak tek yönlü sekans analizi yapılmıştır (ABI PRISM 3730XL Analyzer, 96 capillary type). Şirket tarafından teslim edilen sekanslar kalitesine göre incelenmiş, gerekli kırpma ve düzenleme işlemleri yapılmıştır (4Peaks for mac). Daha sonra sekanslar NCBI (National Center for Biotechnology Information) gen bankasındaki nukleotid koleksiyonunda aranarak (Blastn, megablast) olası türler benzerlik oranlarına göre çıkarılmaya çalışılmıştır (NCBI, 2020).

3.2.9. Antagonist Bakterilerin Saksı Koşullarında Denenmesi

Yapılan denemeler sonucunda antagonist bakterilerin %1'lik CMC ile birlikte tohuma kaplanması, ardından kil ile pelletlenmesi en uygun yöntem olarak belirlenmiştir (Şekil 3.6 üst). Tohum boyası ise bakteri içermeyecek şekilde pelletleme işleminin sonunda daldırma şeklinde uygulanmıştır (Şekil 3.6 alt). Deneme toprağındaki uygun hastalık inokulum miktarı %1 olarak belirlenmiştir.

Denemeye test edilecek olan 17 antagonist bakteri izolatına ek olarak ayrıca; bakteri kaplaması yapılmamış çıplak tohum, bakteri uygulaması yapılmamış standart kaplama tohum ve ruhsatlı bir preparat uygulanmış çıplak tohum (Dynasty CST 125 FS [75 g Azoxystrobin + 37,5 g Metalaxyl-M + 12,5 g Fludioxonil], Syngenta) karakter olarak eklenmiştir. İlaç uygulaması ürün etiketinde yer alan yönerge dikkate alınarak yapılmıştır (100 kg tohum 250 ml). Biyolojik etkinlik denemeleri tesadüf parselleri deneme desenine göre 4 tekerrürlü olacak şekilde oluşturulmuştur. Denemelerde kullanılan saksılarda 300 g toprak içine 10'ar adet tohum ekilmiştir. Değerlendirmeler ekimden 10 gün sonra çimlenip çıkış yapan bitkilerin sayılması şeklinde yapılmıştır.



Şekil 3.6. Antagonist bakteri uygulanmış tohumlar (**Üst:** kil ile pelletlemeden hemen sonra, **alt:** tohum boyası ile boyanan tohumların kurutulması).

4. BULGULAR

4.1. Çalışmalarda Kullanılacak Hastalık Etmeninin Elde Edilmesi

Çalışmalarda kullanmak amacıyla pamukta çökerten hastalığı etmeni *Rhizoctonia solani* izolatu elde etmek için yapılan ön çalışmalarda pamuk arazileri dolaşmış (Şekil 4.1), hastalıklı bitkiler toplanarak izolasyonlar yapılmıştır. Yapılan izolasyon çalışmaları sonucunda 10 adet *Fusarium* spp. ve 1 adet *Macrophomina* sp. izolatu elde edilmiş, sadece morfolojik olarak tanılanmış ve çalışma konusu dışında olduğu için değerlendirilmemiştir (veri sunulmamıştır). Bunun yanı sıra de tarif edilen kürdan yöntemi kullanılarak topraktan *R. solani* elde etme çalışmaları gerçekleştirilmiş, 4 adet fungus izolatu elde edilmiş ve yapılan patojenisite çalışmaları sonucu bu izolatların virüent olmadığı belirlenmiştir (veri sunulmamıştır).



Şekil 4.1. Hastalık belirtisi gösteren bitki (sol), örneklerin toplandığı bir araziden genel görünüş (sağ).

Sonuç alınamayan bu yöntemlerden sonra 10 farklı (Çizelge 3.1) lokasyondan getirilen topraklara pamuk tohumu ekimi yapılmış ve 10 gün sonra çimlenen bitkiler incelenmiştir. İklim odasında gerçekleştirilen saksı denemesi sonucunda; A1, A2, DG2, DG3 kodlu topraklarda yetiştirilen fidelerde hastalık belirtileri gözlenmiştir (Şekil 4.2).



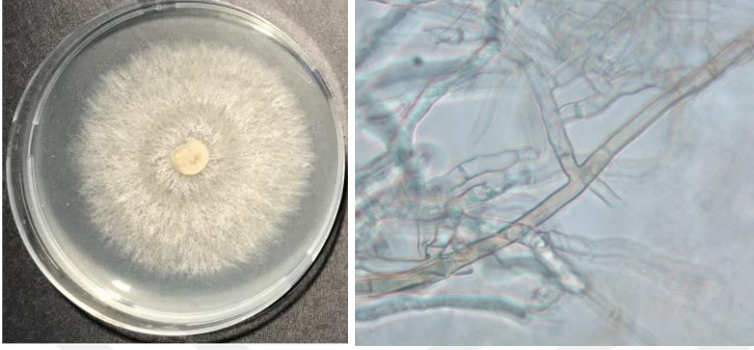
Şekil 4.2. Sağlıklı bitkiler (Steril torfta yetiştirilmiş), çöken bitkiler (DG2 kodlu toprak).

Çökerten hastalığı belirtileri saptanan fideler (Şekil 4.3) laboratuvara getirilerek klasik fungus izolasyonu yapılmıştır.



Şekil 4.3. Kök ve kök boğazlarındaki hastalık belirtileri (soldan sağa: DG3, DG2, A1 ve A2 kodlu topraklarda çöken bitkiler).

Yapılan izolasyonlar neticesinde DG2 kodlu toprakta çöken bitkiden bir izolat mikroskopik ve morfolojik incelendiğinde *R. solani* olarak değerlendirilmiş ve bu izolata DG2 kodu verilmiştir. Bu izolatın PDA besi yerindeki 2 günlük kültürünün görünümü ve mikroskop altındaki görünümü Şekil 4.4'de verilmiştir.



Şekil 4.4. DG2 izolatının 2 günlük PDA kültürü (sol) ve mikroskopik görünümü (40×) (sağ).

DG2 izolatının patojenisite testi için izolat kepek kültüründe geliştirilmiş (Şekil 4.5), %5 ile %2,5 oranında toprakla karıştırılmış ve pamuk tohumları bu hastalıklı toprağa ekilmiştir. On günün ardından inokulumlu topraklardaki ve hastaliksız topraktaki çıkış yapan bitki sayıları karşılaştırılmıştır. Saksılardaki sağlıklı bitki oranları Çizelge 4.1’de verilmiştir.



Şekil 4.5. DG2 izolatının 6 günlük kepek kültürü

Çizelge 4.1. DG2 izolatına ait patojenisite testi sonucu.

Karakter	Çıkış yapan bitki oranı (%)
%5 inokulumlu toprak	%5
%2,5 inokulumlu toprak	%20
%0 inokulumlu toprak (Kontrol)	%80

Çizelge 4.1’deki verilere göre kontrol grubunda 16 bitki sağlıklı görülürken (%80), %2,5 inokulumlu toprakta 4 bitki (%20) ve %5 inokulumlu toprak ise 1

bitki (%5) sağlıklı bulunmuştur. DG2 izolatının çalışmalarda kullanılabilir virülensi yüksek bir *R. solani* izolatı olduğu saptanmıştır.

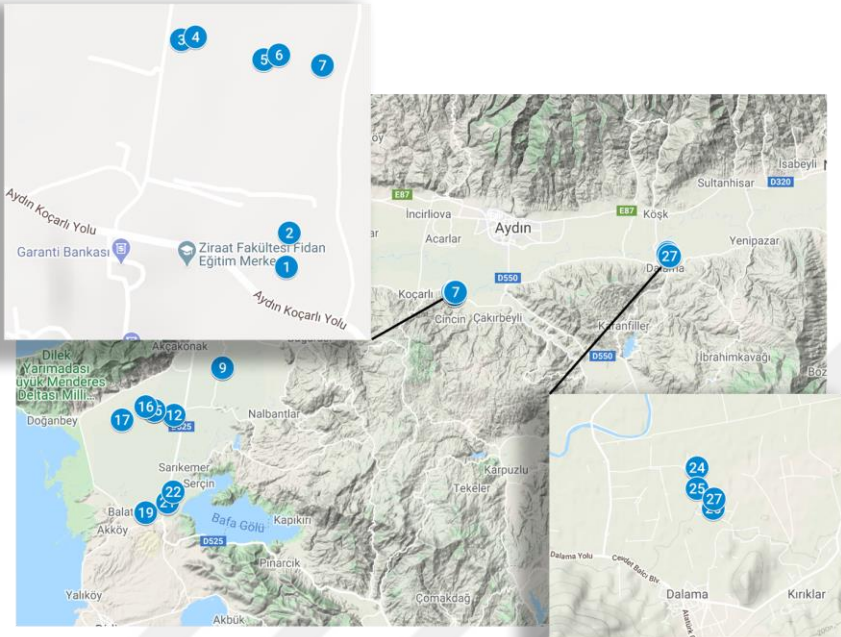
4.2. Antagonist Bakterilerin İzolasyonu

Aydın ilinde yoğun olarak pamuk yetiştiriciliği yapılan 4 farklı ilçeden (Söke, Koçarlı, Didim, Efeler) toplam 22 farklı tarla gezilmiş, 27 pamuk bitkisi kök örneği alınmıştır. Arazilerde göze çarpan, sağlıklı ve iri gelişim göstermiş bitkiler seçilmiş izolasyon çalışmaları için alınmıştır. Çizelge 4.2’de antagonist bakterilerin izolasyonunda kullanılacak bitkilerin alındığı arazilerin koordinatı, çeşidi ve alınan ilçeler gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. Antagonist bakterileri izolasyonu için toplanan bitkiler.

	Kod	Çıkış tarihi	Çeşit	İlçe	Koordinat (Enlem Boylam, Ondalık derece)
1	TH 1	28.08.2019	Gloria	Koçarlı	37,760429 27,759677
2	TH 2	28.08.2019	Gloria	Koçarlı	37,761048 27,759741
3	A5	28.08.2019	Gloria	Koçarlı	37,764513 27,757295
4	A4	28.08.2019	Gloria	Koçarlı	37,764555 27,757617
5	A3	28.08.2019	Gloria	Koçarlı	37,764156 27,759162
6	A2	28.08.2019	Gloria	Koçarlı	37,764232 27,759516
7	A1	28.08.2019	Gloria	Koçarlı	37,764054 27,760492
8	S1	5.09.2919	Cloudia	Söke	37,677692 27,423858
9	S2				
10	S3	5.09.2919	Gloria	Söke	37,623253 27,352658
11	S4				
12	S5				
13	S6	5.09.2919	Lima	Söke	37,628219 27,324889
14	S7				
15	S8	5.09.2919	Lima	Söke	37,632217 27,311828
16	S9	5.09.2919	Cloudia	Söke	37,616967 27,277531
17	S10	5.09.2919	Gloria	Didim	37,511181 27,311269
18	D11	5.09.2919	Karizma	Didim	37,511275 27,311414
19	D12	5.09.2919	Gloria	Didim	37,522083 27,343139
20	D13	5.09.2919	Lodos	Didim	37,522317 27,343097
21	D14	5.09.2919	Deltapine	Didim	37,534714 27,352058
22	D15	5.09.2919	Gloria	Efeler	37,810281 28,068128
23	E1	26.09.2019	Gloria	Efeler	37,810261 28,068408
24	E2	26.09.2019	Gloria	Efeler	37,807336 28,068364
25	E3	26.09.2019	Gloria	Efeler	37,804517 28,071342
26	E4	26.09.2019	Gloria	Efeler	37,805867 28,071464
27	E5	26.09.2019	Gloria	Efeler	37,805867 28,071464

Antagonist bakteri izolatları için elde edilen bitki örneklerinin konumları harita üzerinde gösterilmiştir (Şekil 4.6).



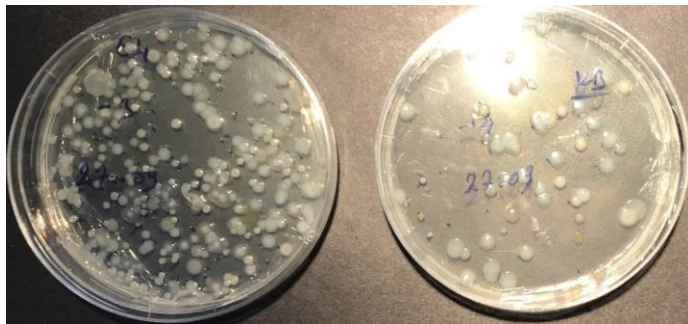
Şekil 4.6. Antagonist bakterileri izolasyonu için gezilen araziler.

Çizelge 4.2'deki veriler incelendiğinde, gezilen alanların büyük çoğunluğunda (%68,2) Gloria çeşit pamuk yetiştirildiği, bunu Lima ve Cloudia çeşidi (%9'ar) takip ettiği ve diğer çeşitlerin (Deltapine, Lodos, Karizma) daha az oranda olduğu belirlenmiştir. Aydın ilinde en fazla pamuk üretim miktarına sahip Söke ilçesinden 10 farklı örnek alınmış bu sayı da toplam örnek sayısı içinden yaklaşık %37 gibi bir değer ifade etmektedir. Üretim miktarı bakımından sırasıyla yer alan; Koçarlı ilçesinden 7 örnek (%26), Didim ilçesinden 5 örnek (%18,5) ve Merkez Efeler ilçesinden 5 örnek (%18,5) toplanmıştır (Şekil 4.7). Elde edilen bitkiler laboratuvara getirilerek izolasyon çalışmaları yapılmıştır.



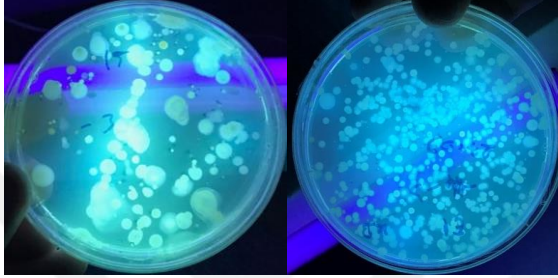
Şekil 4.7. Antagonist bakterileri izolasyonu için çıkılan arazilerden görünüm (Sol üst: Söke, sol alt: Didim, sağ üst: Koçarlı, sağ alt: Efeler).

Laboratuvara getirilen bitki örneklerinin kökünden antagonist bakteri izolasyonu yapılmıştır. Bu işlem için hazırlanan seyreltme serileri KB besi yerine baget yardımıyla ekilmiştir. Dört gün 25°C’de inkubasyonun ardından gelişen bakteri kolonilerinin sayımı yapılmış (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. 10^{-3} (sol) ve 10^{-4} (sağ) seyreltme serilerinden gelişen 4 günlük bakteri kolonileri.

Ayrıca 366 nm dalga boyundaki ultraviyole ışık altında floresan veren koloniler de (Şekil 4.9) sayılarak not edilmiştir. Elde edilen bakteri sayıları gram bitki kökünde olacak şekilde hesaplanıp Çizelge 4.3'te verilmiştir.



Şekil 4.9. Ultraviyole ışık altında bakteri kolonilerinin görünümü (Sol: floresan koloniler, sağ: non-floresan koloniler).

Çizelge 4.3. Bir gram bitki kökünde bulunan bakteri koloni sayısı.

Bitki örneği kodu	Toplam bakteri sayısı* (CFU/g bitki)	Floresan bakteri sayısı* (CFU/g bitki)
TH 1	$1,26 \times 10^7$	0
TH 2	$7,56 \times 10^6$	0
A5	$2,53 \times 10^7$	0
A4	$2,92 \times 10^7$	$9,00 \times 10^4$
A3	$5,45 \times 10^6$	$4,50 \times 10^4$
A2	$5,40 \times 10^6$	$1,35 \times 10^5$
A1	$3,78 \times 10^6$	$9,00 \times 10^4$
S1	$1,01 \times 10^8$	$8,37 \times 10^6$
S2	$9,77 \times 10^7$	$3,06 \times 10^6$
S3	$8,71 \times 10^7$	$1,80 \times 10^7$
S4	$7,43 \times 10^7$	$5,00 \times 10^6$
S5	$1,11 \times 10^8$	0
S6	$2,33 \times 10^7$	$1,98 \times 10^6$
S7	$2,42 \times 10^7$	$5,85 \times 10^5$
S8	$2,61 \times 10^7$	$2,12 \times 10^6$
S9	$5,57 \times 10^7$	$7,56 \times 10^6$
S10	$3,46 \times 10^7$	$1,40 \times 10^6$
D11	$1,86 \times 10^7$	$9,90 \times 10^5$
D12	$2,30 \times 10^7$	$2,25 \times 10^5$
D13	$3,93 \times 10^7$	$3,06 \times 10^6$
D14	$5,63 \times 10^7$	$1,71 \times 10^6$
D15	$7,05 \times 10^7$	$3,60 \times 10^6$
E1	$7,10 \times 10^7$	$9,23 \times 10^6$
E2	$2,86 \times 10^7$	$1,08 \times 10^7$
E3	$2,78 \times 10^7$	$1,33 \times 10^7$
E4	$4,23 \times 10^7$	$1,50 \times 10^7$
E5	$4,32 \times 10^7$	$2,57 \times 10^7$

* 10^{-3} ve 10^{-4} seyreltmelerinden ortalama alınarak hesaplanan değerlerdir.

Çizelge 4.3'e göre gram bitki kökündeki bakteri miktarında lokasyonlara göre çok fazla farklılık görülmediği saptanmıştır. Elde edilen kolonilerden farklı morfolojiye sahip, iyi gelişim gösterenler öze yardımıyla alınarak KB besi yerine saflaştırılmıştır. Yapılan izolasyon çalışmaları sonucu, 114 bakteri izolatu elde edilmiştir.

4.3. Bakterilerin Antagonist Etkinliğinin İkili Kültür Testleri ile Saptanması

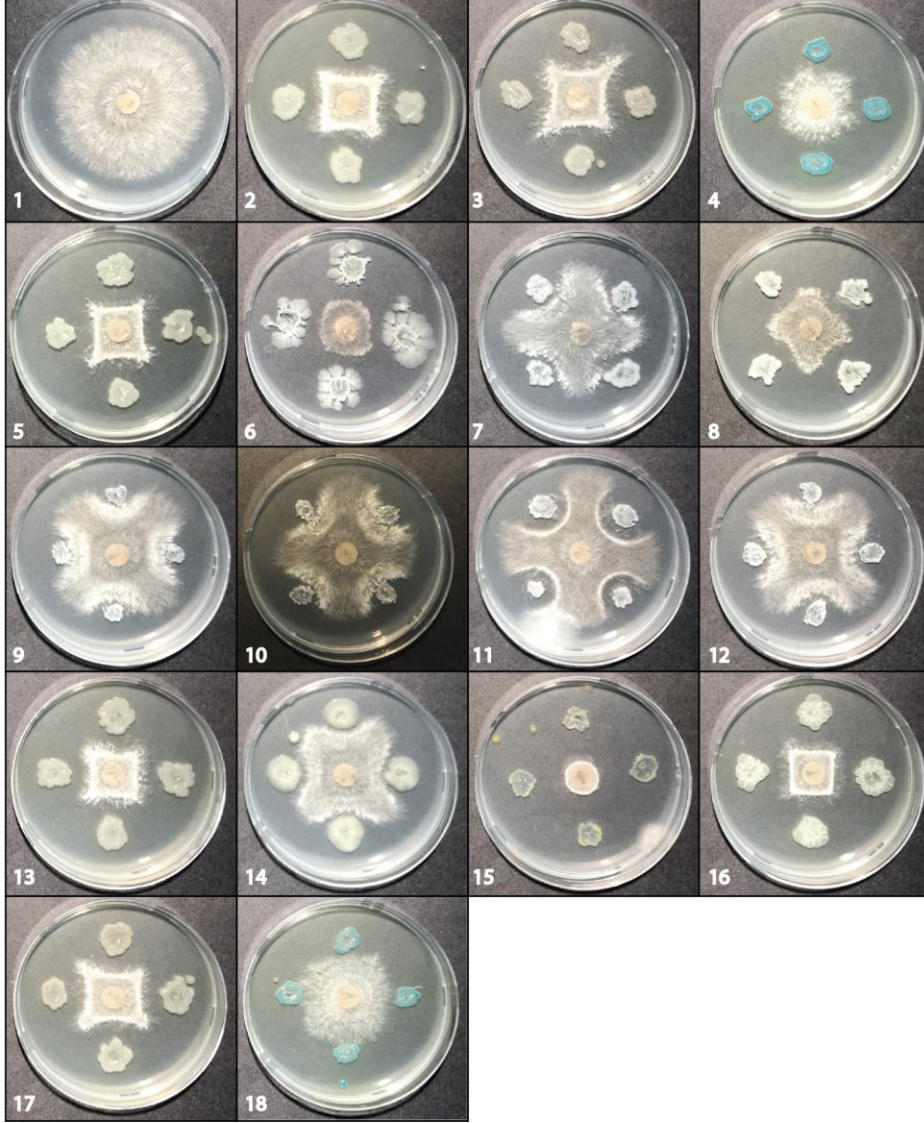
Pamuk bitkisi köklerinden izole edilen bakterilerin ikili kültür testleri çalışma kapsamında elde edilen *R. solani* DG2 fungus izolatu ile yapılmıştır. Toplamda izole edilen 114 bakteri içinden 17 izolatu engelleme zonu oluşturduğu gözlenmiş ve engelleme oranları hesaplanmıştır. Bakterilere izole edildikleri bitkilere verilen kodlar (Çizelge 4.3) baz alınarak nihai bir kod verilmiştir. Engelleme oranları Çizelge 4.4'de yer almaktadır.

Çizelge 4.4. Antagonistlerin engelleme oranları.

İzolat	Engelleme Oranı (%)*
S3-3	91.9 ± 1.2
S6-3	82.4 ± 0.6
S2-2	79.9 ± 0.9
A4-4	79.3 ± 0.7
A1-4	77.2 ± 0.6
S6-5	77.1 ± 1.6
A4-7	76.4 ± 1.1
A1-1	76.2 ± 2.2
ES2-1	68.4 ± 1.7
A2-3	63.0 ± 0.7
ES4-1	61.1 ± 1.2
S2-4	56.3 ± 2.3
D11-2	54.5 ± 2.9
S10-3	51.1 ± 2.4
S1-1	50.4 ± 2.9
ES2-2	44.2 ± 1.8
ES3-2	41.6 ± 2.6

* 4 tekrerrün ortalaması standart hata ile birlikte verilmiştir.

Yapılan testler sonucu Çizelge 4.4’de görüldüğü gibi antagonistlere ait engelleme oranları %91,9 (S3-3) ile %41,6 (ES3-2) arasında değiştiği saptanmıştır. İkili kültür test sonuçlarına ait fotoğraflar Şekil 4.10’da verilmiştir.



Şekil 4.10. Engelleme zonlarının görünümü (1: Kontrol, 2: A1-1, 3: A1-4, 4: A2-3, 5: A4-4, 6: A4-7, 7: D11-2, 8: ES2-1, 9: ES2-2, 10: ES3-2, 11: ES4-1, 12: S1-1, 13: S2-2, 14: S2-4, 15: S3-3, 16: S6-3, 17: S6-5, 18: S10-3).

4.4. Antagonist Bakteriler için Ön Eleme Testleri

İkili kültür testleri ile antagonist etkisi belirlenen 17 bakteri izolatının; tütün aşırı duyarlılık, endospor oluşumu için ısı testi, patatesteki yumuşak çürüklük ve 37°C’de gelişme testleri yapılmıştır. Çıkan sonuçlar Çizelge 4.5 gösterilmiştir.

Çizelge 4.5. Antagonist bakterilerin ön eleme testleri sonuçları.

İzolat	Tütünde Aşırı Duyarlılık	Endospor Isı Testi	Patates Yumuşak Çürüklük	37°C Gelişme
S1-1	-	+	-	+
S2-2	+	-	-	++
S2-4	-	+	-	+
S3-3	-	-	-	++
S6-3	-	-	-	+
S6-5	-	-	-	+
S10-3	-	-	-	+
ES2-1	-	+	+	++
ES2-2	-	+	-	++
ES3-2	-	+	-	++
ES4-1	-	+	-	++
A1-1	+	-	-	+
A1-4	+	-	-	+
A2-3	-	-	-	+
A4-4	+	-	-	+
A4-7	-	+	+	++
D11-2	-	+	-	++
Ecc133	+	nt	+	+
Pc2445	+	nt	nt	+
Plac277	+	nt	nt	-

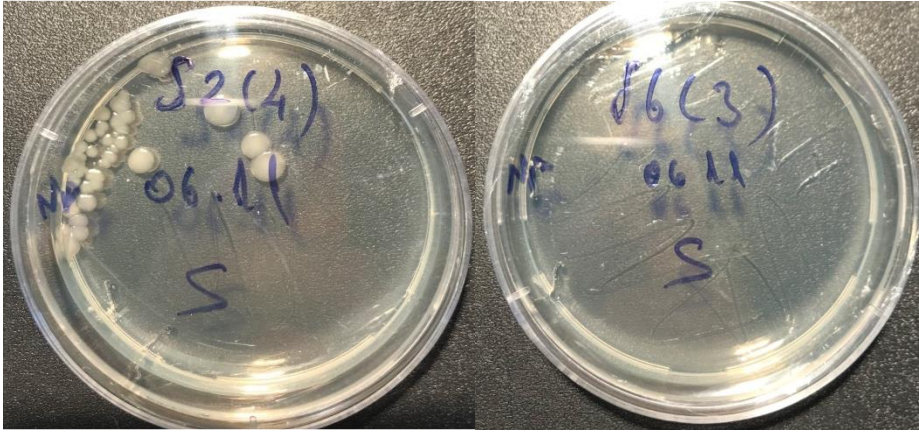
-: negatif, +: pozitif, ++: 25°C’ye göre daha iyi bir gelişme, nt: test edilmedi, Ecc133: *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, Pc2445: *Pseudomonas corrugata*, Plac277: *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*.

Çizelge 4.5’e göre antagonist bakteriler içinden 13 bakteri izolatu tütün aşırı duyarlılık testinden negatif sonuç verirken, 4 bakteri izolatu (S2-2, A1-1, A1-4, A4-4) pozitif sonuç vermiştir. Pozitif kontrol olarak kullanılan Plac277 izolatu beklendiği üzere 24 saat sonra pozitif sonuç vermiştir (Şekil 4.11 sağ).



Şekil 4.11. Tütün aşırı duyarlılık testi sonucu (**Sol:** S3-3 negatif, **sağ:** Plac277 pozitif).

Isı testi sonuçlarına göre 8 izolat (S1-1, S2-4, ES2-1, ES2-2, ES3-2, ES4-1, A4-7, D11-2) uygulama sonunda besi yerinde gelişerek endospor pozitif olduğu belirlenmiştir. Bu izolatların yüksek sıcaklığa toleransının olduğu, sıcaklığa maruz kalsa bile gelişme gösterebileceği saptanmıştır (Şekil 4.12). Dokuz antagonist bakteri ise 80°C ısıda 15 dk. sonunda canlılıklarını yitirmiştir. Kontrol olarak bırakılmış ısı işlem görmeyen süspansiyonlardan ekilen bakterilerin hepsinin geliştiği görülmüştür.



Şekil 4.12. Isı testi sonucu NA besi yerinde uygulamadan 48 saat sonra bakteri kolonileri (**Sol:** pozitif S2-4, **sağ:** negatif S6-3).

Patates yumuşak çürüklük testi sonuçlarına göre (Şekil 4.13) 2 antagonist izolat (ES2-1 ve A4-7) ile pozitif kontrol Ecc133 izolatlarının test sonucu pozitif çıkmıştır.



Şekil 4.13. Patates yumuşak çürüklük testi (**Sol:** pozitif Ecc133, **sağ:** negatif su).

Çizelge 4.5 incelendiğinde tüm antagonist bakterilerin 37°C’de geliştiği belirlenirken, bunlar içinden 8 izolatın (S2-2, S3-3, ES2-1, ES2-2, ES3-2, ES4-1, A4-7, D11-2) 25°C’deki eşine göre daha iyi bir gelişme sergilediği saptanmış ve çizelgede “++” olarak gösterilmiştir. Kontrol izolatlarından sadece Plac277 37°C’de gelişmemiştir.

4.5. Antagonist Bakteriler için Ön Tanılama Testleri

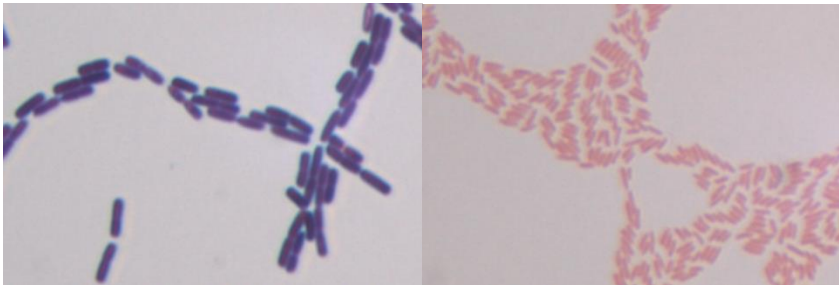
İkili kültür ve ön eleme testlerinden geçmiş antagonistik özellikteki 17 adet bakteri izolatına; gram boyama, floresan pigment oluşumu, nitrat indirgeme, oksidaz, oksidatif fermantatif (O/F), arjinin ve levan olmak üzere çeşitli ön tanılama testleri yapılmıştır. Yapılan tüm ön tanılama testlerinin sonuçları detaylı olarak Çizelge 4.6’da gösterilmiştir.

Çizelge 4.6. Elde edilen antagonist bakterilerin gram boyama ve biyokimyasal test sonuçları.

İzolat	Gram Boyama	Floresan	Nitrat	Oksidaz	O/F	Arjinin	Levan
S1-1	+	-	-	-	-/-	-	-
S2-2	-	+	+	+	+/-	+	+
S2-4	+	-	-	-	-/-	-	+
S3-3	-	+	+	+	+/-	+	-
S6-3	-	+	+	+	+/-	+	+
S6-5	-	+	+	+	+/-	+	+
S10-3	-	+	+	+	+/-	+	+
ES2-1	+	-	+	-	+/+	-	-
ES2-2	+	-	-	-	-/-	-	-
ES3-2	+	-	-	-	+/-	-	-
ES4-1	-	-	-	-	-/-	-	-
A1-1	-	+	+	+	+/-	+	+
A1-4	-	+	+	+	+/-	+	+
A2-3	-	+	+	+	+/-	+	+
A4-4	-	+	+	+	+/-	+	+
A4-7	+	-	+	-	+/+	-	-
D11-2	+	-	+	-	+/+	+	-
Ecc133	nt	nt	+	nt	+/+	-	-
Plac277	nt	nt	-	nt	+/-	-	+
Pc2445	nt	nt	+	nt	nt	+	-

-: negatif, +: pozitif, nt: test edilmedi, Ecc133: *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, Pc2445: *Pseudomonas corrugata*, Plac277: *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*.

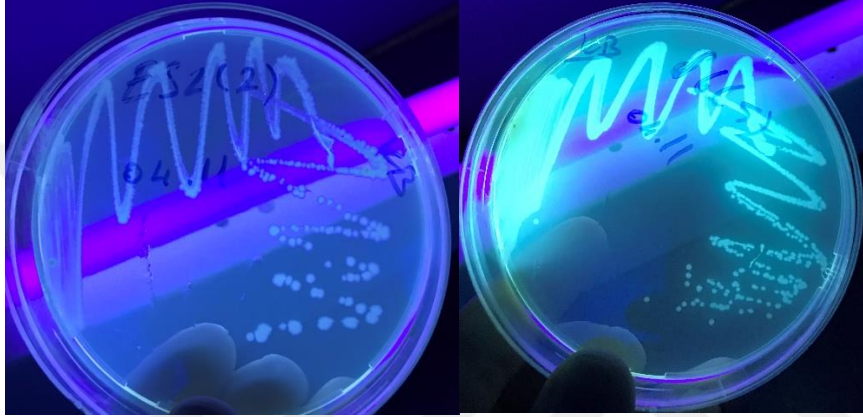
Çizelge 4.6'daki gram boyama verileri değerlendirildiğinde 7 bakteri izolatının (S1-1, S2-4, ES2-1, ES2-2, ES3-2, A4-7, D11-2) gram boyama sonucu pozitif diğerleri negatif olarak çıkmıştır. Ayrıca tüm izolatların mikroskop incelemesi sonucunda çubuk şekilli oldukları saptanmıştır (Şekil 4.14).



Şekil 4.14. İki antagonist bakterinin Gram boyama sonucu mikroskop görüntüsü (Sol: D11-2 Gram +, sağ: A1-1 Gram -).

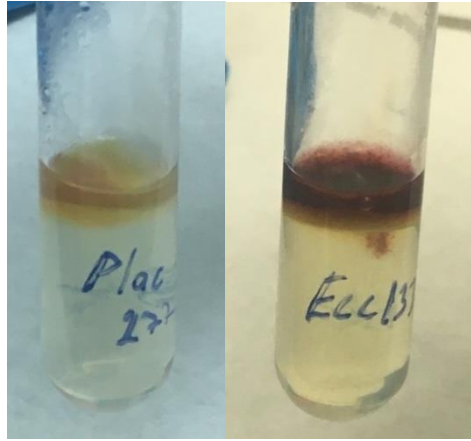
KB besi yerine ekilmiş olan antagonist bakterilerin 25°C'de 24 saat inkübasyonu sonucunda 366 nm dalga boyundaki UV ışık altındaki ışımaya yapma durumları

Çizelge 4.6'da yer almaktadır. Çizelge incelendiğinde 17 bakteri izolatından 9 bakteri izolatu (S2-2, S3-3, S6-3, S6-5, S10-3, A1-1, A1-4, A2-3, A4-4) ışımaya yaptığı görülmüş ve pozitif olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. Floresan negatif (**Sol:** ES2-2) ve floresan pozitif (**Sağ:** S6-5) bakteri izolatlarının UV ışık altındaki görünümü.

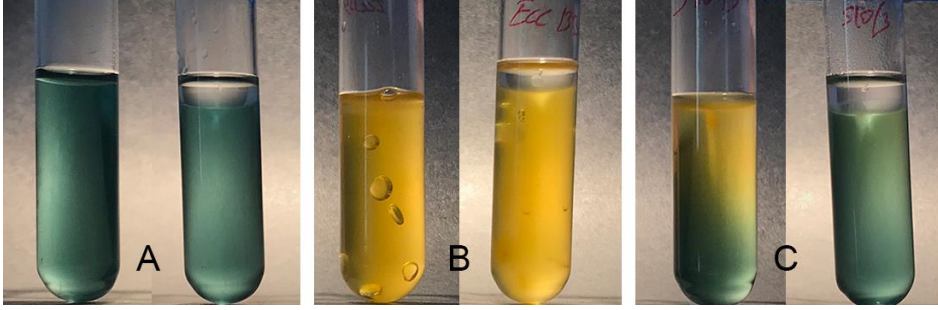
Nitrat indirgeme testine göre 5 izolat (S1-1, S2-4, ES2-2, ES3-2, ES4-1) negatif sonuç vermiştir. Ayrıca kontrol olarak kullanılan Ecc133 izolatu pozitif ve Plac277 izolatu negatif sonuç vermiştir (Şekil 4.16).



Şekil 4.16. Nitrat indirgeme testi (**Sol:** Plac277 negatif, **sağ:** Ecc133 pozitif).

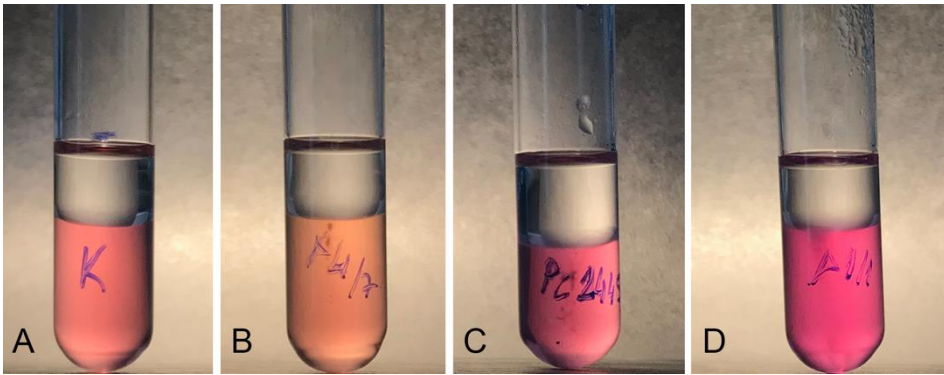
Çizelgede verilen oksidaz testi sonuçlarına göre antagonist bakteriler içinden 9 bakteri izolatının (S2-2, S3-3, S6-3, S6-5, S10-3, A1-1, A1-4, A2-3, A4-4) pozitif sonuç verdiği saptanmıştır.

İzolatların O/F reaksiyon testi sonucu incelendiğinde 17 antagonist bakteri içinden 3 izolatın (ES2-1, A4-7, D11-2) glikozu hem oksidatif hem de fermentatif olarak kullandığı saptanmıştır. Bunun yanında 4 bakteri izolatının (S1-1, S2-4, ES2-2, ES4-1) ise glikozu oksidatif ve fermentatif olarak kullanmadığı belirlenmiştir. Test sonuçlarına göre diğer antagonist izolatların hepsi sadece oksidatif reaksiyon göstererek glikozu kullandığı saptanmıştır. Ayrıca pozitif kontrol olarak ekimi yapılan Ecc133 izolatının hem oksidatif hem de fermentatif olarak glikozu kullandığı yapılan test sonucunda belirlenmiştir (Şekil 4.17).



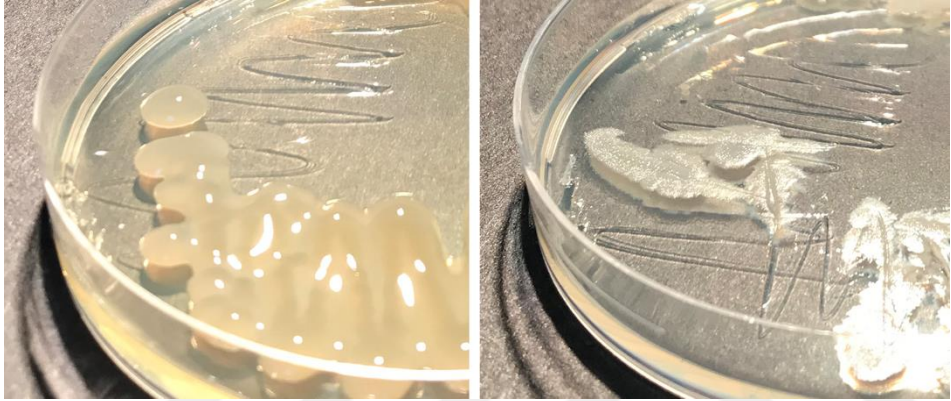
Şekil 4.17. O/F testi (A: İnoküle edilmemiş kontrol negatif [O] - negatif [F], B: Ecc133 pozitif [O] - pozitif [F], C: S10-3 pozitif [O] - negatif [F]).

Çizelge 4.6'da yer alan arjinin testine göre 7 bakteri izolatının (S1-1, S2-4, ES2-1, ES2-2, ES3-2, ES4-1, A4-7) test sonucunun negatif olduğu saptanmıştır. Bunun yanında testin kıyaslanması amacıyla yapılan, ekimsiz tüplerde sonucun negatif olduğu ve pozitif kontrol olarak Pc2445 izolatının ise beklendiği üzere pozitif sonuç verdiği saptanmıştır (Şekil 4.18).



Şekil 4.18. Arjinin testi (A: İnoküle edilmemiş kontrol, B: A4-7 negatif, C: Pc2445 pozitif, D: A1-1 pozitif).

Levan testi sonuçları değerlendirildiğinde 17 antagonist bakteri içinden 9 izolatın (S2-2, S2-4, S6-3, S6-5, S10-3, A1-1, A1-4, A2-3, A4-4) pozitif sonuç verdiği saptanmıştır. Diğer izolatların ise mucoid, kubbeli koloniler oluşturmadığı belirlenerek negatif olarak değerlendirilmiştir. (Şekil 4.19).

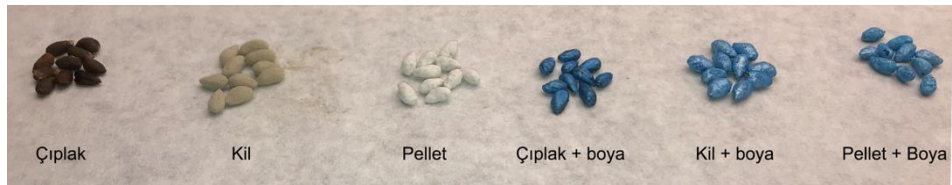


Şekil 4.19. Levan testi sonucu (Sol: S6-5 pozitif, sağ: D11-2 negatif).

4.6. Tohum Kaplama Çalışmaları

4.6.1. Kaplama Malzemelerinin Pamuk Tohumu Çimlenme Gücüne Etkileri

Uygun kaplama materyalinin belirlenmesi amacıyla yapılan tohum kaplama çalışmalarında tohumların uygulama sonrası görünüşleri Şekil 4.20 verilmiştir.



Şekil 4.20. Kaplama işlemi sonrası tohumların görünüşleri.

Her saksıya 20'şer adet tohum ekilmiş, 10 gün sonra çıkan fideler sayılmış ve çıkış oranı hesaplanmıştır. Altı karakterden oluşan saksı denemesine ait bulgular Çizelge 4.7'de yer almaktadır.

Çizelge 4.7. Kaplama malzemesinin pamuk tohumu çimlenme gücüne etkisi.

Karakter	Çıkış yapan bitki oranı (%)*
Kil kaplama	96,7
Kil kaplama + boya kaplama	96,7
Çıplak tohumu boya kaplama	91,7
Pellet kaplama + boya kaplama	91,7
Çıplak tohum (Negatif kontrol)	88,3
Pellet kaplama	86,7

* 3 tekerrür ortalamasıdır, analizler için ArcSine \sqrt{x} transformasyonu yapılmıştır, karakterler arasında istatistiki açıdan fark yoktur (Student's t-test, $p > 0,05$).

Çizelge 4.7'deki veriler incelendiğinde, en az bitki çıkışlarının pellet kaplama uygulamalarında görüldüğü hatta uygulama yapılmamış çıplak tohumdan daha az bitki çıkışı olduğu saptanmıştır. Yine aynı çizelgeye göre, en fazla bitki çıkışlarının kil uygulamalarında olduğu görülmektedir. Ancak yapılan istatistik analize göre (ANOVA) karakterler arasında istatistiki olarak önemli bir farka ($p > 0.05$) rastlanmamıştır.

4.6.2. Polimer Boyanın Tohumu Uygulama Şeklinin Belirlenmesi

Boya maddesi tohumu pülverizasyon ve daldırma olarak iki farklı şekilde denenmiştir (Şekil 4.21). Boyama yöntemlerinin etkinliğini belirleyebilmek amacıyla uygulama yapılmamış çıplak ve sadece kil kaplanmış tohumlarında yer aldığı saksı denemesinde, ekimden 10 gün sonra çıkan bitkiler sayılmıştır. Bulgular Çizelge 4.8'de gösterilmiştir.



Şekil 4.21. Boya kaplama maddesinin 2 farklı yöntemle tohumu uygulanması (Sol: pülverizasyon, sağ: daldırma).

Çizelge 4.8. Farklı boyama yöntemi ile kaplanan tohumlarda bitki çıkışları.

Karakterler	Çıkış yapan bitki oranı (%)*
Kil kaplama	95,0
Kil kaplama + pülverize boya	88,3
Kil kaplama + daldırma boya	83,3
Çıplak tohum (Negatif kontrol)	81,6

* 3 tekerrür ortalamasıdır, analizler için ArcSine \sqrt{x} transformasyonu yapılmıştır, karakterler arasında istatistiki açıdan fark yoktur (Student's t-test, $p > 0,05$).

Çizelge 4.8'deki veriler değerlendirildiğinde en düşük bitki çıkışlarının, uygulama yapılmamış çıplak tohumda görüldüğü saptanmıştır. Boya uygulamalarının ise; daldırma yönteminde çıkış yapan bitki sayılarının pülverizasyon uygulama yöntemine göre daha düşük olduğu görülmektedir. Ancak boya uygulamalarının istatistiki anlamdan tohum çimlenmesi üzerine bir etkisi bulunmamaktadır. Bundan sonraki denemelerde hem uygulamasının kolay olması hem de az miktarda boya harcanması (5 ml boya solüsyonu/100 tohum) açısından daldırma şeklinde boya uygulaması tercih edilmiştir.

4.6.3. Boyanın Antagonist Bakteri Canlılığına Etkisi

Boyanın antagonist bakterilerin canlılığına etkisini belirleyebilmek amacıyla bu çalışmalar yürütülmüştür. İzolatlar arasından seçilen bir gram pozitif (A4-7) ve bir de gram negatif (S6-3) bakteri kullanılarak süspansiyonlar hazırlanmıştır. Hazırlanan süspansiyonlara çalışma konsantrasyonunda boya eklenmiştir. Oluşturulan seyreltme serilerinden 10^{-6} ve 10^{-5} kullanılarak ekim yapılmıştır. Yirmi dört saat 25°C inkübasyon süresinin ardından mikroskop altında, gelişen bakteri kolonileri sayılmış ve kaydedilmiştir (Çizelge 4.9).

Çizelge 4.9. Tohum kaplama boyasının bakteri canlılığı üzerine etkileri.

İzolat	Boya	Bakteri sayısı/ml*
S6-3	Boyalı	$7,02 \times 10^8$
	Boyasız	$6,56 \times 10^8$
A4-7	Boyalı	$2,02 \times 10^8$
	Boyasız	$2,15 \times 10^8$

* Seyreltme bağımsız 10 tekerrür ortalamasıdır, izolatlar kendi içerisinde karşılaştırıldığında boyalı ve boyasız arasında istatistiki açıdan fark yoktur (Student's t-test, $p > 0,05$).

Çizelge 4.9'daki veriler incelendiğinde her izolat kendi içinde değerlendirildiği zaman; boyalı ve boyasız süspansiyonlardan gelişen bakteri koloni sayılarının istatistiki olarak aynı olduğu hesaplanmıştır. Böylece tohum kaplama

çalışmalarında kullanılan boyanın bakteri canlılığına etkisinin olmadığı ispatlanmıştır.

4.6.4. Karboksümetil Selülozun Tohumda Bakteri Tutunumuna Etkisi

Bu testler antagonist bakterilerin tohuma tutturulması aşamasında CMC'nin etkisini gözlemlemek amacıyla yapılmıştır. Çalışma bulguları Çizelge 4.10'da yer almaktadır.

Çizelge 4.10. Karboksümetil Selülozun tohuma bakteri tutunumuna etkisi.

İzolat	Boya	Bakteri sayısı/tohum*
S6-3	Su	$2,35 \times 10^6$ a
	CMC	$1,46 \times 10^7$ b
A4-7	Su	$5,13 \times 10^4$ A
	CMC	$6,86 \times 10^5$ B

* Seyreltme bağımsız 12 tekrür ortalamasıdır, izolatlar kendi içerisinde karşılaştırıldığında su ve CMC uygulamaları istatistiki olarak birbirinden farklıdır (Student's t-test, $p < 0,05$).

Çizelge 4.10'daki verilere göre CMC'nin hem Gram negatif hem de Gram pozitif bakteri izolatlarının tohum üzerine yapışmasına katkı sağladığı istatistiki olarak hesaplanmıştır ($p < 0,05$). CMC kullanılmadan su ile bakteri kaplaması yapılan uygulamalarda tohumların üstüne az miktarda bakteri tutunduğu gözlemlenmektedir.

4.6.5. Karboksümetil selülozun Tohum Çimlenmesi Üzerine Etkisi

CMC'nin pamuk tohumlarının çimlenme gücüne etkisi yapılan 3 tekrürlü saksı denemesinde testlenmiştir. Deneme sonunda bitki çıkış oranları Çizelge 4.11'de yer almaktadır.

Çizelge 4.11. Karboksümetil Selülozun pamuk tohumlarında çimlenmeye etkisi.

Karakterler	Çıkış yapan bitki oranı (%)*
Su + kil	98,3 a
Çıplak (Negatif kontrol)	93,3 ab
CMC	90,0 ab
CMC + kil	86,7 b

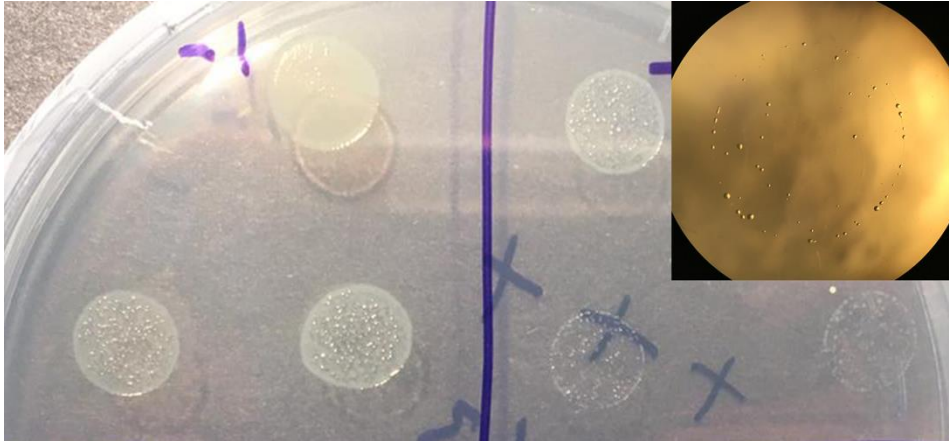
* 3 tekrür ortalamasıdır, analizler için ArcSine \sqrt{x} transformasyonu yapılmıştır, aynı harfle gösterilen değerler arasında istatistiki açıdan fark yoktur (Student's t-test, $p < 0,05$).

Çizelge 4.11'deki verilere göre, CMC'nin pamuk tohumlarının çimlenme gücüne etkisi olduğu saptanmıştır. Kontrol grubunda çıkış yapan bitki oranlarının %93

olduğu görülürken, %87 oranıyla CMC + kil uygulaması yapılan karakterin en düşük bitki çıkışı sağladığı görülmektedir. Yine aynı çizelgede sadece CMC uygulaması yapılmış tohumlarda çıkış yapan bitki sayısı kontrol grubundan az olduğu görülürken, Su + kil uygulaması yapılan tohumlarda %98 ile en yüksek çıkış oranı saptanmıştır.

4.6.6. Tohuma Farklı Yöntemlerle Antagonist Uygulamalarının Bakterinin Canlılığı Üzerine Etkileri

Antagonist bakterilerin tohuma uygulanmasından ekilinceye kadar geçen sürede canlılığındaki değişikliği saptamak amacıyla bu denemeler yürütülmüştür. Bir Gram + ve bir de Gram - bakteri izolatu ile kaplanan tohumlar belirli zaman aralıklarında (1, 5, 9, 13 ve 18) değerlendirilerek üzerlerindeki toplam bakteri miktarları ayrı ayrı hesaplanmıştır. Bu amaçla yapılan testlerde oluşturulan seyreltme serilerinden KB besi yerinde 24 saat sonra gelişen koloniler Şekil 4.22'de gösterilmiştir.



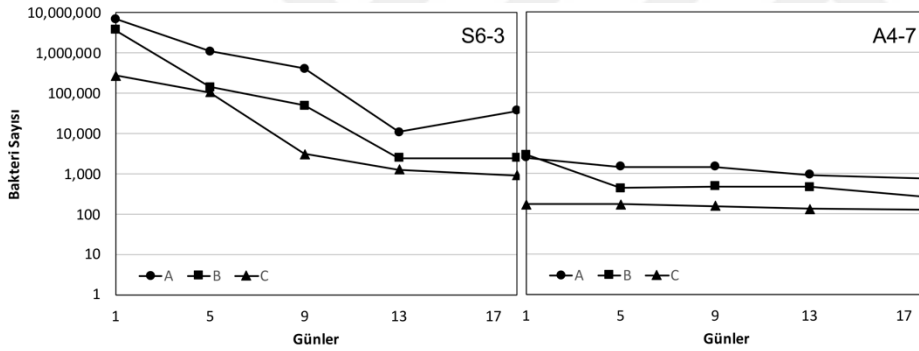
Şekil 4.22. King B besi yerine ekimi yapılan süspansiyonlardan 24 saat sonra gelişen bakteri kolonileri (S6-3 izolatu için; **sol:** petride -1 seyreltme kolonileri, **sağ:** petride -2 seyreltme kolonileri, **sağ-üst fotoğraf:** -3 seyreltme stereo-zoom mikroskoptaki görünümü).

Farklı günlerde iki antagonist bakteri izolatu için yapılan sayım sonuçları Çizelge 4.12 ve Şekil 4.23'te detaylı olarak gösterilmiştir.

Çizelge 4.12. Tohum bakterizasyonu uygulamalarından sonra zamana bağlı olarak tohumlardaki bakteri popülasyonundaki değişim.

İzolat	Uyg*	Bakteri sayısı (CFU/tohum)**				
		1. gün	5. gün	9. gün	13. gün	18. gün
S6-3	A	$7,03 \times 10^6$ aA	$1,10 \times 10^6$ aB	$4,16 \times 10^5$ aB	$1,13 \times 10^3$ aB	$3,75 \times 10^2$ aB
	B	$3,73 \times 10^6$ abA	$1,44 \times 10^5$ bB	$5,00 \times 10^4$ bB	$2,56 \times 10^3$ bB	$2,51 \times 10^2$ bB
	C	$2,83 \times 10^5$ bA	$1,09 \times 10^5$ bAB	$3,18 \times 10^3$ bB	$1,33 \times 10^3$ bB	$9,45 \times 10^2$ bB
A4-7	A	$2,50 \times 10^3$ aA	$1,50 \times 10^3$ aBC	$1,49 \times 10^3$ aB	$9,39 \times 10^2$ aBC	$7,50 \times 10^2$ aC
	B	$3,00 \times 10^3$ aA	$4,50 \times 10^2$ bB	$4,94 \times 10^2$ bB	$4,80 \times 10^2$ bB	$2,63 \times 10^2$ bB
	C	$1,75 \times 10^2$ bA	$1,75 \times 10^2$ bA	$1,58 \times 10^2$ bA	$1,38 \times 10^2$ bA	$1,25 \times 10^2$ bA

* Uygulamalar A: Tohum + bakteri + kil + bakterili boya, B: Tohum + bakteri + kil + boya ve C: Tohum + kil + bakterili boya. ** 18 tekerürün ortalamasıdır (3 tekrür, 6 pseudo-tekrür [seyreltme serileri ve ekim]). Her iki bakteri izolatu birbirinden ayrı değerlendirilmiştir. Aynı harf ile gösterilen değerler arasında istatistik açıdan fark yoktur (Student's t-test, $p < 0,05$). Küçük harf ile gösterilenler sütünde, büyük harf ile gösterilenler satırdaki farklılıkları göstermektedir.



Şekil 4.23. Günlere ve uygulamalara göre tohumlardaki bakteri sayısı değişimi (Grafikler logaritmiktir, **A**: Tohum + bakteri + kil + bakterili boya, **B**: Tohum + bakteri + kil + boya ve **C**: Tohum + kil + bakterili boya).

Çizelge 4.12'de görüldüğü gibi, her iki izolat için de hem kil hem de boyada bulunan (A) bakteri uygulamasında diğer uygulamalara göre beklendiği şekilde daha yüksek bakteri saptanmıştır. Yine aynı verilere bakıldığında, sadece kil ile bakteri kaplanması ve boya uygulaması (B) tahmin edileceği gibi her iki uygulamanın arasında bir değere sahiptir. Normal tohum kaplama prosedürü sonrası bakteri süspansiyonlu boya karışımıyla kaplanan tohumlarda (C) bakteri miktarının diğer uygulamalarla kıyasla az olduğu göze çarpmaktadır. Gram negatif (S6-3) bakteri izolatu ile kaplanan tohumların raf ömürlerine bakıldığında geçen gün süresiyle paralel olarak bakteri sayılarında düzenli bir düşüş gerçekleştiği göze çarpmaktadır. Gram pozitif (A4-7) bakteri izolatuyla kaplanan tohumların raf ömürlerine baktığımızda bakteri miktarındaki düşüşün daha az olduğu ve bakterilerin stabilitesinin daha yüksek olduğu saptanmıştır.

4.7. Saksı Denemelerinde Kullanılacak Uygun Patojen İnokulum Miktarının Belirlenmesi

Testlerde kullanmak amacıyla uygun patojen inokulum miktarını belirleyebilmek için ilk önce kepek kültürü hazırlanmıştır (Şekil 4.24).



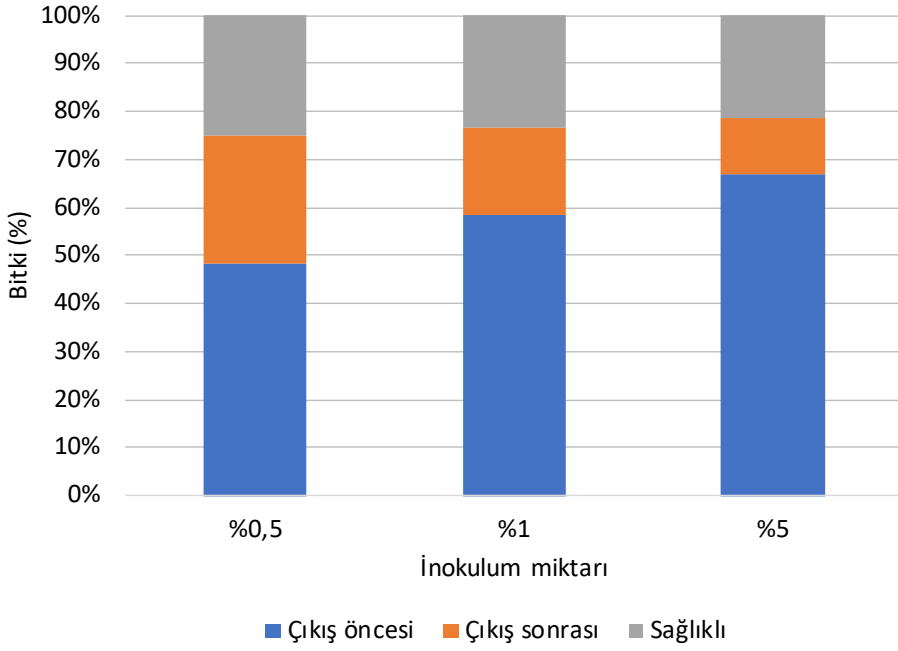
Şekil 4.24. İnokule edilmiş, toprakla karıştırılmaya hazır kepek kültürü.

Hazırlanmış kepek kültürü; %5, %1, %0,5 olacak şekilde steril toprakla karıştırılmış ve deneme 3 tekerrürlü olarak 800'er gramlık saksılarda uygulama yapılmamış tohumlarla kurulmuştur. Ekimden 10 gün sonra çıkış öncesi ve çıkış sonrası ölen bitki oranları ile sağlıklı kalan bitkilerin oranları Çizelge 4.13'de yer almaktadır.

Çizelge 4.13. Uygun patojen inokulum miktarı belirleme testleri sonucu.

İnokulum miktarı	Çıkış öncesi çöken (%)*	Çıkış sonrası çöken (%)*	Sağlıklı bitki (%)*
%5	66,7	11,7	21,6
%1	58,3	18,3	23,4
%0,5	48,3	26,7	25,0

* 3 tekerrür ortalamasıdır, analizler için ArcSine \sqrt{x} transformasyonu yapılmıştır, aynı sütünde gösterilen değerler arasında istatistiki açıdan fark yoktur (Student's t-test, $p > 0,05$).



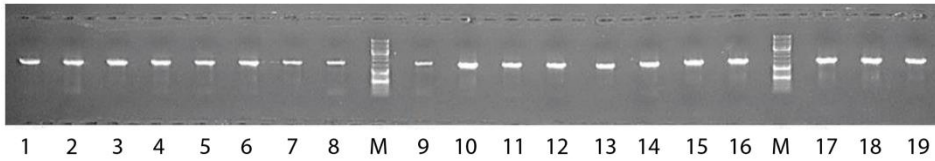
Şekil 4.25. Farklı inokulum miktarlarında çıkış öncesi/sonrası çöken bitkiler ve sağlıklı bitki oranlarının dağılımı.

Denemelerde negatif kontrol olarak kullanılan bitkilerdeki çıkış oranı %88,3 olarak belirlenmiştir. Çizelge 4.13'e incelendiğinde, %5 inokulum içeren topraklarda en fazla bitkinin öldüğü görülmektedir. Yine aynı çizelgede, en düşük çöken bitki oranının %0,5'te olduğu görülmektedir. Ancak yapılan istatistiki analizler sonucunda hem çıkış öncesi hem de çıkış sonrası çöken bitki oranları ayrı ayrı değerlendirildiğinde inokulum miktarları arasında bir farkın olmadığı bulunmuştur. Şekil 4.25'te farklı inokulum miktarlarında çıkış öncesi ve çıkış sonrası çöken bitki oranları sağlıklı bitki oranları ile karşılaştırılmalı olarak verilmiştir.

4.8. Antagonist Bakterilerin 16s rRNA Sekans Analizi ile Tanınması

Bakterilerin tanınması amacıyla gerçekleştirilen 16s rRNA analizleri için ilk önce DNA ekstraksiyonu çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmalar sonunda antagonist bakterilerden 3,4 ile 127,5 ng/μl arasında genomik DNA elde edilmiş ve değeri 50'den yüksek olanlar 50 ng/μl'ye seyreltilerek PCR/sekans için bu iş

amacıyla hizmet veren ticari bir kuruluşa yollanmıştır. İzolatlara ait PCR jel fotoğrafı Şekil 4.26’da verilmiştir.



Şekil 4.26. 27F/1492R primer çifti ile yapılan PCR sonucunda izolatlara ait yaklaşık 1.400 bp büyüklüğündeki ürünlerin agaroz jeldeki fotoğrafı (M: marker Thermo Scientific GeneRuler 10.000 bp, 1: S2-2, 2: S2-4, 3: S3-3, 4: S6-3, 5: S6-5, 6: S10-3, 7: ES2-1, 8: ES2-2, 9: ES3-2, 10: ES4-1, 11: A1-1, 12: A1-4, 13: A2-3, 14: A4-4, 15: A4-7, 16: D11-2, 17: A4-7, 18: ES2-1, 19: ES3-2; bazı izolatlar kontrol amaçlı tekrar etmektedir).

Bakterilere ait oluşan sekans dizileri baz kalitelerine göre incelenmiş ve devam eden okunabilir dizileri NCBI veri bankasında blastn analizine tabi tutulmuştur. Analiz sonunda çıkan muhtemel eşleşen türler Çizelge 4.14’te verilmiştir.

Çizelge 4.14. Antagonist bakteri sekanslarına ait muhtemel eşleşen tür isimleri.

İzolat	NCBI blastn eşleşme
S1-1	na
S2-2	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
S2-4	<i>Bacillus megaterium</i>
S3-3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
S6-3	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>
S6-5	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
S10-3	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>
ES2-1	<i>Bacillus velezensis</i>
ES2-2	<i>Bacillus endophyticus</i>
ES3-2	<i>Bacillus endophyticus</i>
ES4-1	<i>Brevibacillus brevis</i>
A1-1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
A1-4	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
A2-3	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>
A4-4	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
A4-7	<i>Bacillus velezensis</i>
D11-2	<i>Bacillus cereus</i>
A4-7	<i>Bacillus velezensis</i>
ES2-1	<i>Bacillus velezensis</i>
ES3-2	<i>Bacillus endophyticus</i>

na: Sekans kalitesi kötü olduğu için sağlıklı analiz yapılamamış ve değerlendirme dışı bırakılmıştır.

4.9. Antagonist Bakterilerin Saksı Koşullarında Denenmesi

Antagonist bakterilerin biyolojik etkilerinin saksı koşullarında belirlenmesi amacıyla bu çalışmalar yürütülmüştür. Bunun için ilk olarak; tohumlar bakteri izolatları ile kaplanmıştır. Bakteriler tohuma %1'lik CMC ile bulaştırılmış, ardından kil ile kaplanmış ve pellet %20'lik tohum boyasına daldırılarak sabitlenmiştir. Daha sonra tohumlar %1 inokulum içeren steril topraklara ekilmiştir. 10 günün ardından çıkan bitkiler değerlendirilerek Çizelge 4.15'te gösterilmiştir. Şekil 4.27'da ise biyolojik etkinlik denemelerinin ekimden 5 gün sonra görünümü verilmiştir.

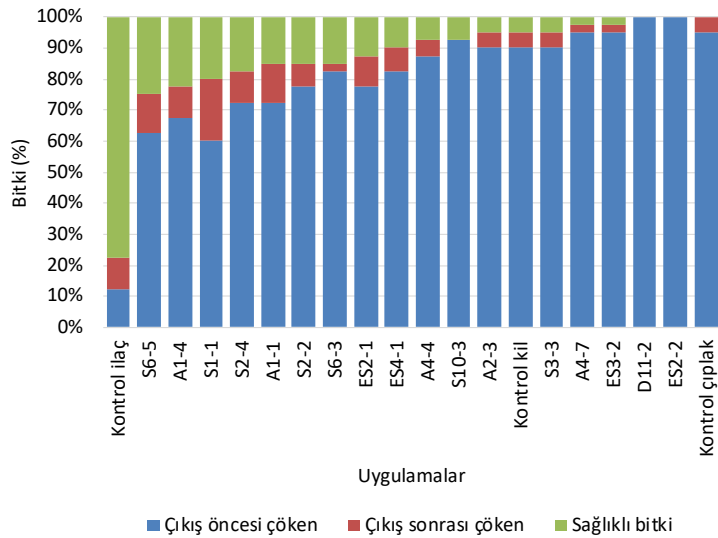


Şekil 4.27. Ekimden 5 gün sonra bitkilerdeki görünüm (**Sol:** ilaçlı kontrol, **orta:** S6-5 bakteri uygulanmış tohum, **sağ:** çıplak tohum).

Çizelge 4.15 Saksı denemesi sonuçları.

Uygulama	Çıkış öncesi çöken (%)	Çıkış sonrası çöken (%)	Sağlıklı bitki (%)*
Kontrol ilaç	12,5	10	77,5 a
S6-5	62,5	12,5	25 b
A1-4	67,5	10	22,5 bc
S1-1	60	20	20 bcd
S2-4	72,5	10	17,5 bcde
A1-1	72,5	12,5	15 bcde
S2-2	77,5	7,5	15 bcde
S6-3	82,5	2,5	15 bcde
ES2-1	77,5	10	12,5 bcde
ES4-1	82,5	7,5	10 bcde
A4-4	87,5	5	7,5 bcde
S10-3	92,5	0	7,5 bcde
A2-3	90	5	5 cde
Kontrol kil	90	5	5 cde
S3-3	90	5	5 cde
A4-7	95	2,5	2,5 de
ES3-2	95	2,5	2,5 de
D11-2	100	0	0 e
ES2-2	100	0	0 e
Kontrol çıplak	95	5	0 e

* 4 tekerrür ortalamasıdır, analizler için ArcSine \sqrt{x} transformasyonu yapılmıştır, aynı harf ile gösterilen değerler arasında istatistiki açıdan fark yoktur (Student's t-test, $p < 0,05$).



Şekil 4.28. Saksıda biyolojik etkinlik denemesi çıkış öncesi/sonrası çöken bitkiler ve sağlıklı bitki oranlarının dağılımı.

Çizelge 4.15 incelendiğinde tohumlar çıplak olarak hastalıklı toprağa ekildiğinde çıkış saptanamamıştır. Aynı denemede, ilaçlı kontrol grubunun %77,5 oranında sağlıklı bitki çıkışıyla hastalığa karşı etkili olduğu görülmüştür. Denemede bir diğer kontrol grubu olan, sadece kil ve boya kaplanmış tohumlarda ise çıkış oranı %5’de kaldığı tespit edilmiştir. Yine aynı çizelgeye göre, en etkili izolata; %25 bitki çıkış oranıyla S6-5 izolatu olduğu, onu %22,5 bitki çıkış oranıyla A1-4 izolatu takip etmektedir. Ayrıca S1-1 izolatu %20 ve S2-4 izolatının %17,5 oranlarında sağlıklı bitki çıkışı görülmüştür. Yine verilere göre, 3 izolatta (A1-1, S2-2 ve S6-3) bitki çıkış oranlarının aynı olduğu ve hastalığı %15 oranında engellediği görülmüştür. Ayrıca ES2-1 izolatının etkinliği %12,5 oranında saptanmıştır. Şekil 4.28’de hastalığın çıkış öncesi ve çıkış sonrası hangi düzeyde etkili olduğu gösterilmiştir. Burada grafik incelendiğinde; fidelerin hastalık kaynaklı çıkış öncesi çökerten oranlarının daha yüksek olduğu saptanmıştır. Çıkış yapan fidelerde çıkış sonrası çökerten kaynaklı ölümlerin daha az oranda fideleri etkilediği belirlenmiştir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Dünyada, pamuklarda görülen fide kök çürüklüğü “çökerten” hastalığına; *Sclerotium rolfsii*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Rhizoctonia solani*, *Pythium* spp., *Thielaviopsis basicola*, *Fusarium moniliforme*, *Macrophomina phaseoli* gibi birçok fungusun sebep olduğu belirlenmiştir (Hillocks, 1997). Ülkemizde yapılan bir çalışmaya göre, Ege Bölgesi’ne hastalıklı fidelerden *Fusarium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Macrophomina*, *Anixiopsis*, *Ulacladium*, *Populaspora*, *Monilia*, *Sclerotinia*, *Myrothecium*, *Gliocladium* patojen fungusları izole edilmiş, en çok rastlanan etmenin ise *R. solani* olduğu rapor edilmiştir (Karcılıoğlu, 1976).

Ege Bölgesi’nde 2006 yılında yürütülen bir çalışmada, hastalık belirtisi gösteren 42 pamuk fidesi toplanmış ve bu fidelerden yapılan izolasyon çalışması sonucu %80,95 *R. solani*, %4,76 *Fusarium* spp., %9,52 *Pythium* spp., %4,76 *Aspergillus* spp., oranlarında olacak şekilde belirlendiği rapor edilmiştir. 2007 yılında tekrarlanan çalışmalarda ise, 26 hastalıklı pamuk fidesinden %84,61 *R. solani*, %7,69 *Pythium* spp., %3,84 *Macrophomina* spp. ve %3,84 *Fusarium* spp. oranlarında patojen fungus izole edildiği bildirilmiştir (Akpınar, 2008). Bir başka çalışmada ise Söke İlçesinden toplanmış, hastalık belirtisi gösteren pamuk fidelerinden %88,46 *R. solani*, %3,95 *Fusarium* spp., %1,98 *Aspergillus* spp. ve %1,78 *Pythium* spp. oranlarında patojen fungus izole edildiği rapor edilmiştir (Nemli ve Sayar, 2002). Yılmaz, (2009) 2008 yılında yaptığı çalışmada Söke ovasında toprağın en fazla *Rhizoctonia* (%90) ile bulaşık olduğunu, ayrıca *Alternaria* (%3), *Fusarium* (%1) hastalık etmenlerinin varlığını bildirmiştir.

Pamukta çökerten hastalığı ana etmeni *R. solani* olduğu yapılan literatür taramaları sonucu göstermektedir. Bu nedenle çalışmamızda pamukta çökerten hastalığına karşı hedef organizma olarak *R. solani* seçilmiştir. Yapılan literatür taramaları *R. solani*’yi hedef organizma olarak seçmenin, çökerten ile mücadelede etkili bir yöntem olduğunu kanıtlar niteliktedir. Toprak kaynaklı bir fungus olan *R. solani*, pamuk tohumlarına ve fidelerine saldırarak onların ölümlerine ve ciddi kayıplara neden olabilmektedir. Bu hastalığa karşı, kimyasal fungusitlerin tohum uygulamaları olarak kullanılması en yaygın stratejidir (Heydari vd., 2008; Rush vd., 1994). Ancak bitki hastalıklarının yönetimi adına kimyasal fungusitlerin sürekli kullanılması dünyada bir sorun haline gelmiştir. Hedef dışı organizma, halk ve çevre sağlığı üzerine çok sayıda olumsuz ve zararlı etkilerinden dolayı alternatif arayışlar içine girilmiştir (Cook, 2000; Heydari ve Pessarakli, 2010; Samavat vd.,

2014a). Toprak kaynaklı fungal patojenlerin kontrolünde antagonist bakteriler ümitvar sonuçlar göstermektedir (Khiyami vd., 2014; Ramarathnam vd., 2011; Samavat vd., 2011; Zaim vd., 2013).

Çalışmamızda sağlıklı pamuk bitkilerinin kökünden elde ettiğimiz 114 bakteri izolatından 17 bakteri izolatının hastalık etmeni *R. solani*'ye karşı etkili olduğu, yapılan ikili kültür testleriyle saptanmıştır. Benzer şekilde Demir vd., (1999) yaptığı çalışmada, sağlıklı pamuk bitkilerinin köklerinden elde edilen 128 bakteri izolatı içinden, 17 bakteri izolatının *R. solani*'ye karşı antagonistik özellikte olduğunu, yaptıkları ikili kültür testleri ile belirlediklerini rapor etmişlerdir. Başka bir çalışmada Rajendran ve Ramasamy, (2008) Hindistan'da yaptığı bir çalışmada, pamuk bitkisinin köklerinden 103 farklı bakteri izolatı elde ettiğini, bunların içinden 5 izolatın *R. solani*'ye karşı etkili olduğunu saptamışlardır.

Yapılan ikili kültür testleri sonucu (Çizelge 4.4) en etkili izolatın S3-3 olduğu ve kontrol petrisine göre yaklaşık %92 oranında patojen fungusu baskıladığı görülmüştür. Yine aynı çizelgeye göre en az etkiye sahip izolatın ES3-2 olduğu, ancak patojen fungusu karşı %42 oranında fungus gelişimini engellediği saptanmıştır. İkili kültür çalışmalarında elde ettiğimiz veriler başka araştırmacıların çalışmalarıyla kıyaslandığında daha etkili olduğu görülmüştür. Örneğin Sama Samavat vd., (2014) yaptığı çalışmada pamuk çökerten etmeni *R. solani*'ye karşı 5 farklı *Pseudomonas fluorescens* ve *Pseudomonas aureofaciens* izolatlarını kullanarak antagonistik etkinliklerini saptamışlardır. Oluşturulan ikili kültür testlerine göre; *P. aureofaciens* izolatının en yüksek etkiyi gösterdiği ve kontrol grubundaki fungus büyümesine göre %72 oranında etkili olduğunu saptamışlardır. Diğer bakteri izolatları *P. fluorescens* 5 (%68), *P. fluorescens* 4 (%67), *P. fluorescens* 2 (%58), *P. fluorescens* 1 (%57), *P. fluorescens* 3 (%54)'ünde patojen fungusu karşı etkili olduklarını saptamışlardır. Samaneh Samavat vd., (2014) yaptıkları bir çalışmada, hastalık etmeni *R. solani*'ye karşı *P. aureofaciens* 30-84 izolatının antagonistik özelliğini belirleyebilmek amacıyla ikili kültür testi oluşturmuşlardır. Yapılan ikili kültür testi sonucu, *P. aureofaciens* 30-84 izolatının hastalık etmeni patojeni %67,56 oranında baskıladığını bildirmişlerdir. Rajendran ve Ramasamy, (2008) pamuk köklerinden elde ettikleri bakteriler ile *R. solani*'ye karşı oluşturdukları ikili kültür testleri sonucu 5 izolatın etkili olduğu, patojen fungus büyümesini %41,9 ile %28,1 değerleri arasında inhibe ettiğini bildirmişlerdir.

Çalışmamızda, tohumun ticari bir pellet kaplama malzemesi ve kil materyalinin etkisinin saptandığı saksı denemesi yapılmıştır. Alınan sonuçlara göre kil kaplama materyalinin bitki çimlenmesi üzerine olumsuz bir etkisinin olmadığı, hatta uygulama yapılmamış tohuma göre çimlenme gücüne pozitif bir etki oluşturduğu saptanmıştır. Ayrıca pellet malzemesi ile kıyaslandığında, tohumların daha yüksek çimlenme gücü gösterdiği görülmektedir (Çizelge 4.7). Öte yandan taşıyıcı kaplama materyalinin, aynı bakteri izolatlarının hastalık etmenine karşı başarısını etkilediği açık şekilde belirlenmiştir. Antagonist bakterilerin etkinliğinin geliştirilmesi ve etkili kaplama maddeleri bulmak amacıyla literatürde birçok çalışma vardır (Amer ve Utkhede, 2000; Bharathi vd., 2004; Chung vd., 2005; Mansoori vd., 2013; Sallam vd., 2013; Samavat vd., 2014b).

Yapılan bir çalışmada araştırmacılar, çökerten hastalık etmeni *R. solani*'ye karşı, antagonistik özelliğini ikili kültür testleri ile saptadıkları *P. aureosfaciens* 30-84 izolatını 4 farklı kaplama materyali (talk pudrası, pirinç unu, soya unu, pamuk tohumu küspesi) ile birlikte tohuma uygulamışlardır. Uygulama yapılan tohumlarla kurulan saksı denemesindeki 15 günlük fide ölüm oranlarını saptamışlardır. Bu sonuçlara göre ölüm oranı uygulama yapılmamış tohumlarda %58,33 olarak saptanırken, Carboxin + Thiram bileşenli fungusit uygulamasında %33,33 olarak bildirilmiştir. Antagonist uygulaması yapılan tohumlardaki ölüm oranlarının fungusit uygulamasından daha iyi olduğu, pirinç unu ile birlikte yapılan uygulamalarda %6,25 olarak görüldüğünü, talk pudrası ile birlikte yapılan uygulamalarda ise %25 ölüm oranlarını saptadıklarını bildirmişlerdir. Ayrıca bu verilerine göre, organik taşıyıcı materyalin inorganik materyale göre antagonist bakterinin başarısını arttırdığını, bunun sebebinin organik materyalin yapısı ve karbon kaynakları olabileceğini bildirmişlerdir (Samavat vd., 2014b).

Kaplama materyalinin etkinliğinin saptandığı bir başka çalışmada ise; Jorjani vd., (2012) şeker pancarında çökertene yol açan *R. solani*'ye karşı *Pseudomonas fluorescens* ve *Bacillus coagulans* olmak üzere iki farklı bakteri izolatının etkinliğini denemişlerdir. Araştırmacılar taşıyıcı materyal olarak; 2 inorganik (talk pudrası, bentonit) ve 2 organik (torf, pirinç kepeği) madde olacak şekilde kullanmışlardır. Araştırmacılar, kaplama materyali ve antagonist bakterilerin etkinliğini saptayabilmek amacıyla oluşturdukları iklim odası denemelerinde %1 (ağırlık/ağırlık) *R. solani* inokulumlu toprak hazırladıklarını ve saksıları 4 tekerrürden oluşturduklarını bildirmişlerdir. Hastalığa karşı torf materyali ile uygulanan *B. coagulans* izolatının %60,4 etki göstererek en etkili karakter

olduğunu, aynı izolatın talk pudrası ile uygulanmasının ise %54,4 oranında hastalığı baskıladığını bildirmişlerdir. Aynı denemede diğer antagonist izolat olan *P. fluorescens*'in torf materyali ile uygulanmasının ise hastalığı %55,3 oranında baskıladığı görülürken, kimyasal fungusit Carboxin + Thiram uygulamalarının ise hastalığı %53,4 oranında baskıladığını saptamışlardır. Araştırmacılar, çalışma kapsamında organik kaplama materyalinin inorganik materyale göre antagonistler üzerine daha etkili olduğunu bildirmişlerdir. Bunun sebebinin de antagonist bakterilerin ürettiği ikincil metabolitlere organik materyalin kaynaklık edebileceğini ve bitki kökünde daha iyi kolonize olabileceğini düşündüklerini bildirmişlerdir. Ayrıca organik kaplama materyalini antagonistler besin olarak da kullanabilir.

Çalışmamızda kaplama materyali ile pelletlenen tohumun üstüne kaplama boyası uygulama aşamasında pülverize ve daldırma olacak şekilde 2 farklı metot izlenmiştir. 2 farklı uygulama (pülverize ve daldırma) ile kaplanan tohumlar, boya uygulamadan sadece kil kaplama ve çıplak tohum olacak şekilde oluşturulan saksı denemesi sonuçlarına göre (Çizelge 4.8), kaplanan tohumun boya içine daldırma uygulamasının pülverizasyon uygulamalarıyla istatistiki açıdan aynı olduğu belirlenmiştir. Ancak uygulama aşamasında daldırma uygulamalarının daha pratik olduğu boya maddesinin pülverizasyon uygulamasına göre daha ekonomik olacağı kanısına varılmıştır. Diğer yandan pratikte, kullanıcıların pülverizasyon yöntemiyle boya maddesi uygulaması yönünden gerekli ekipman yoksunluğu yaşaması göz önüne alındığında, daldırma yönteminin hem daha pratik hem de daha ekonomik olacağı kanısına varılmıştır.

Polimer boya maddesinin (BASF Sepiret 3242®) antagonistler üzerine olan etkisini saptamak amacıyla bakteriler içinden bir gram negatif (S6-3) ve bir de gram pozitif (A4-7) bakteri izolatından süspansiyon hazırlanmış ve boya ile karıştırılmıştır. Elde edilen boyalı ve boyasız eş süspansiyonlardan Miles vd., (1938) yöntemine göre ekimi yapılmış ve boya maddesinin bakteri canlılığına olumsuz bir etkisinin olmadığı saptanmıştır (Çizelge 4.9). Yapılan çalışma sonucunda kaplama boyasının antagonist bakterilerle kullanılmasının uygun olduğu, tohum uygulamalarında biyolojik mücadele açısından sorun teşkil etmediği belirlenmiştir.

Çalışmalarımızda CMC'nin pamuk tohumlarının çimlenmesi üzerine etkisini belirleyebilmek adına kurulan saksı denemelerinde, CMC'nin tohum çimlenmesi

üzerine olumsuz bir etkisinin varlığı gözlemlenmiştir. Benzer şekilde Sökel, (2019) yaptığı bir çalışmada, CMC uygulamasının hıyar tohumlarının çimlenme gücünde düşüslere yol açtığını bildirmiştir. Ancak yaptığımız saksı çalışmalarındaki istatistik analizler (Çizelge 4.11) CMC'nin, uygulama yapılmayan (çiplak) tohumlardan çıkış yapan fide sayılarıyla aynı grupta olduğunu göstermiştir. Bunun yanı sıra bir tohum üstüne kaplanan bakteri miktarında CMC'nin etkisinin fazla olduğu, CMC kullanılmadan yapılan kaplama çalışmalarında bakteri sayısının yaklaşık 10 kat daha az olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.10). CMC yapıştırıcı özelliği ile antagonist bakterilerin tohuma daha iyi tutunmasını sağlayarak buradaki popülasyonlarının artmasına, dolayısıyla hastalıkla mücadelede etkinliğin başarısında kilit rol oynadığı düşünülmektedir. Pamukta çökerten hastalığına karşı yapılan birçok biyolojik mücadele çalışmalarında (Akpınar, 2008; Erdoğan vd., 2016; Jorjani vd., 2012; Khiyami vd., 2014; Samavat vd., 2014b) antagonist bakterilerin tohuma CMC ile birlikte uygulandığı ve başarıda azımsanmayacak bir öneminin olduğunu ortaya koymaktadır.

Kaplanan tohumların üstünde ne kadar bakteri olduğunu saptayabilmek amacıyla yaptığımız çalışmalarda sonuçlar Çizelge 4.12'de yer almaktadır. Bu çalışma, anlatıldığı gibi kaplanan tohumdan finalde süspansiyon oluşturularak sayımı gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemin tarafımızca daha doğru ve toprağa girecek tohum üstündeki bakteri sayısının saptanması konusunda net sayılar verdiği düşüncesindeyiz. Hill vd., (1994) yaptıkları bir çalışmada, 5×10^8 yoğunluğundaki bakteri süspansiyonunda tohumları 15 dk. beklettikleri, finalde her tohum üzerinde yaklaşık 10^7 bakteri olduğunu bildirmişlerdir. Benzer şekilde, Samavat vd., (2014b) yaptıkları çalışmada 50 gr kaplama materyaline 50 ml (10^9 CFU/ml) bakteri süspansiyonu ile %10'luk 5 ml CMC ekledikleri ve 48 tohum kaplandığını belirtmişlerdir. Kapladıkları her tohum üzerinde 10^8 CFU bakteri olduğunu bildirmişlerdir. Ancak yapılan çalışmalarda kullanılan kaplama materyalinin hepsinin tohumların üzerine geçemeyeceği ve dolayısıyla artan kaplama materyalinde de bakteri kalacağı kanısındayız. Böylelikle kaplama materyaline eklenen süspansiyondaki bakteri sayısı kaybının 1/10'dan daha fazla olacağı ve doğru sayıları yansıtamayabileceği düşüncesindeyiz. Bu durumun önüne geçebilmek ve net sayıları yansıtabilmesi açısından belirlenmiş sayıda tohumdan izolasyon yapılp sayımları gerçekleştirilmesi gerektiğinin kanısındayız. Tohum

üzerindeki bakteri sayının belirlenmesi çalışmalarımızda bu durum göz önüne alınarak sayılar belirlenmiştir.

Kaplanan tohumların üstündeki bakterilerin ne kadar süre dayanabileceği ve kaplandıktan toprağa ekime kadar geçen sürede ne düzeyde azalacağını belirlemek amacıyla canlılık denemesi yapılmıştır. Çizelge 4.12’de yer alan değerlerde, Gram pozitif ve Gram negatif olmak üzere 2 farklı antagonistin etkinlikleri verilmiştir. Başlangıçta Gram negatif (S6-3) bakteri izolatının, Gram pozitif (A4-7) bakteri izolatına göre daha fazla popülasyonda olduğu saptanmıştır. Ancak geçen gün sayısı ile orantılı olarak Gram negatif bakteri izolatındaki popülasyon azalışlarının daha fazla olduğu saptanmıştır. Gram pozitif bakteri izolatındaki (A4-7) popülasyonun, geçen gün sayısı ile orantılı olarak azalmasına rağmen, Gram negatif (S6-3) izolatına göre daha stabil kaldığı belirlenmiştir. Bunun sebebinin Gram pozitif *Bacillus* türlerinin ısıya ve kurumaya dirençli sporlar oluşturduğu düşünülmektedir (Jayaraj vd., 2005; Jorjani vd., 2012). Ayrıca bazı *Bacillus* türlerinin, floresan *Pseudomonas*’lara ve diğer gram negatif bakterilere göre uzun raf ömrü, ürettikleri antibiotiklerin geniş spektrumlu olması gibi farklılıkları hastalıkları baskılamasında avantaj oluşturabileceği düşünülmektedir (Chen vd., 2009; Khiyami vd., 2014; Samavat vd., 2014a).

Bir başka konu olan, bakterilerin tohuma hangi şekilde uygulanması sonucuna canlılık denemelerinden saptanan değerlerle belirlenmiştir. Bu bağlamda tohuma 3 farklı A, B, C (A: Tohum + bakteri + kil + bakterili boya, B: Tohum + bakteri + kil + boya ve C: Tohum + kil + bakterili boya) uygulama yapılmış ve uygulamadan hemen sonra 1. gün yapılan sayımlarda A ve B karakterlerinin tohum üstündeki bakteri miktarlarında bir fark olmadığı saptanmıştır (Çizelge 4.12). Diğer bir yöntem (C) ile uygulanan bakterilerin dış ortamla direkt temastan dolayı kolaylıkla olumsuz şartlardan etkileneceği ve tohum üstündeki bakteri miktarındaki sayıların göreceli olarak düşük olması sebebiyle diğer çalışmalar için seçilmemiştir. Bu sonuçlar ile işlemler; maliyet, iş yükü ve zaman faktörleri göz önüne alındığında, antagonist bakterilerin tohuma kil ile uygulanıp üstüne bakterisiz koruyucu boya kaplaması yapılmasının (B) daha doğru olacağı belirlenmiş ve diğer çalışmalarda kullanılmıştır.

Saksı denemelerinde kullanılan hastalık etmeni *R. solani*’nin inokulum kaynağı olarak kullandığımız kepek kültürünün miktarını saptayabilmek amacıyla uygun inokulum miktarı belirleme denemeleri gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmaları

yapmamızın sebebi; yapılan literatür taramalarında araştırmacıların farklı oranlarda inokulum kullandığı olarak savunulabilir. Bu durumun kullanılan fungus izolatlarının farklılığı dolayısıyla virülensliklerinin değişebileceğinden kaynaklandığı düşünülebilir. Örneğin; Akpınar, (2008) yaptığı çalışmada uygun inokulum miktarını %0,1 olarak, benzer şekilde Egamberdieva ve Jabborova, (2013) %0,1, Hill vd., (1994) %1, Martin, (2000) %0,75 olarak kullandıklarını bildirmişlerdir.

Uygun inokulum miktarının belirlenmesi için kurulan saksı denemelerinde, denemeler farklı zamanlarda 3 kere denenmiştir. Hatta bu denemelerde ara değerler olan; %2,5 ve %0,25 inokulum oranları da denenmiştir. Ancak sonuçlarda bu değerler yer aldığı istatistiki açıdan sürekli bir heterojenlik olduğu saptanmıştır. Bu nedenle bu veriler analizlere dahil edilmemiştir. Paylaşılan değerler ikinci yapılan deneme sonucu verilerini içermektedir. Biyolojik etkinlik denemelerinde kullanılması amacıyla elimizdeki izolat için en uygun inokulumun %1 olduğu tarafımızca belirlenmiş ve kullanılmıştır. Bu değer her iki değer arasında oluşu ve diğer karakterlerle arasında istatistiki açıdan fark olmayışı sebebiyle belirlenmiştir.

İkili kültür testleri ile antagonistik etkinliklerini saptadığımız 17 antagonist bakteri izolatının NCBI blastn eşleşme karşılığı Çizelge 4.14'de verilmiştir. Bu verilere göre elde edilen 17 bakteri izolatı içinden 9 izolatın floresan *Pseudomonas* türü olduğu, 7 izolatın ise *Bacillus* türü olduğu belirlenmiştir. Çalışmamıza benzer şekilde Wang ve Davis, (1997) Çin'de yaptıkları bir çalışmada, pamuk köklerinden *B. subtilis*, *B. cereus*, *P. fluorescens*, *P. putida*, ve *Pseudomonas* türlerini izole ettiklerini, Kloepper vd., (1980) ise floresan *Pseudomonas* gibi faydalı bakterilerin bitki köklerinde ve toprakta yoğun olarak bulunduğunu bildirmişlerdir. Benzer şekilde Gajbhiye vd., (2010) pamuk bitkisinin kök bölgesinden *Bacillus* türü bakterileri elde ettiklerini ve biyolojik mücadele çalışmalarında kullandıklarını bildirmişlerdir. Ayrıca çalışmamızda izole edilen; *Bacillus endophyticus*, *B. megaterium*, *B. velezensis*, *Brevibacillus brevis*, *P. brassicacearum* bakteri izolatlarının da çeşitli bitki hastalıklarına karşı biyolojik savaş çalışmalarında kullanıldığı da bilinmektedir (Zheng ve Sinclair, 2000; Solanki vd., 2012; Zhou vd., 2012; Nehra vd., 2016; Chauhan vd., 2016; Fan vd., 2018).

Saksıda biyolojik etkinlik denemelerinde, uygun inokulum miktarı denemesiyle bağlantılı olarak %1 inokulum seçilmiştir. Bunun sonucunda, iklim odasında kurulan biyolojik etkinlik denemelerinde sağlıklı fidelerin sayısının az olması göze çarpmaktadır. Bunun sebebinin, özellikle hastalığın yüksek inokulum miktarı karşısında etkinliğini saptamak ve güçlü antagonist elde etmek için yapıldığı savunulabilir. Benzer şekilde, Jorjani vd., (2012) şeker pancarında *R. solani*'nin neden olduğu çökerten etmenine karşı antagonist bakteriler ile yaptığı bir çalışmada, yüksek inokulumlu toprak (%1) kullandıklarını bundan dolayı düşük sağlıklı fide sayısı saptadıklarını, bunun sebebinin ise çalışmamıza benzer olarak etkili biyolojik ajanları saptamak olduğunu bildirmişlerdir.

İklim odası verileri göz önüne alındığında; kontrol grubunda hiç bitki çıkışı gözlenmediği, Azoxystrobin + Metalaxyl-M + Fludioxonil uygulanan karakter grubunda fungusitin %77,5 oranında sağlıklı bitki çıkışı sağladığı saptanmıştır. Ayrıca en etkili izolatan S6-5 olduğu, sırasıyla A1-4, S1-1, S2-4, A1-1, S2-2, S6-3, ES2-1, ES4-1, A4-4, S10-3, A2-3 etkili oldukları belirlenmiştir (Çizelge 4.15). Etkili olan izolatlar incelendiğinde, Gram pozitif *Bacillus* türlerinin ve gram negatif *Pseudomonas* türlerinin olduğu göze çarpmaktadır. Yapılan literatür taramalarına göre; kimi araştırmacılar *Bacillus* spp., kimileri ise *Pseudomonas* spp. ile hastalığa karşı savaşında başarı sağladıklarını rapor etmişlerdir.

Saksıda biyolojik etkinlik denemesi sonucumuza benzer şekilde; (Samavat vd., 2014a) antagonist bakterilerle çökerten hastalık etmeni *R. solani*'ye karşı saksı denemesi oluşturmuşlardır. Ekimden 15 gün sonra yapılan kontrolde, uygulama yapılmamış kontrol grubunda hastalık oranının %69 olduğu görülürken, Carboxin + thiram uygulanan ilaçlı kontrol grubunda %34 oranında görüldüğünü bildirmişlerdir. Ayrıca antagonist bakteri süspansiyonlarının uygulandığı karakterlerde ise; *P. aureofaciens* izolatu hastalığa karşı en yüksek etkinliği göstererek, hastalığın %25 oranında görüldüğünü rapor etmişlerdir.

Ülkemizde pamuk yetiştirilen alanlarda özellikle *R. solani* kaynaklı fide kök çürüklüğü hastalıkları büyük bir problem olmaktadır. Üreticilerin bu hastalığın yarattığı ürün kayıplarından korunmak amacıyla dekara gereğinden fazla tohum atarak önlem almaya çalıştıkları belirlenmiştir. Bu durum tohum maliyetlerini arttırdığı gibi bitki çıkışlarından sonra görülen fazla fidelerin işçi gücü kullanılarak seyreltilmesini gerektirmekte hem ekonomik hem de iş yükü bakımından sorun oluşturmaktadır. Ülkemiz ve Aydın ili bakımından önemli konumda olan Söke

ilçesinde üreticilerden aldığımız bilgiler dahilinde, pamuk tarımının yapıldığı arazilerin pamuk ekim döneminde ekilmiş arazinin hastalık kaynaklı bazı durumlarda çok kez bozulup tekrar pamuk ekiminin yapıldığı belirlenmiştir. Bu durum hem zaman açısından hem de maliyet ve iş yükü bakımından önemli sorunlar teşkil etmektedir. Üreticilerden alınan bir diğer bilgiye göre ilaçlı tohum kullanılmasına karşın bazı arazilerde bu kötü senaryonun değişmediği, hastalıktan dolayı tarlayı bozup tekrar ekim yapılması gerektiği saptanmıştır. Antagonist bakteriler ile yapılan biyolojik mücadele çalışmaları uzun zamandan beri süre gelmektedir. Özellikle bu antagonistlerin nasıl uygulanacağı, muhafaza edileceği ve etkinliklerinin ne düzeyde olacağı bir soru işaretidir. Çalışmamız pamuk tohumlarına yine pamuk kök bölgesinden izole edilen antagonist bakterileri kaplayarak hastalığa karşı etkisinin başarılı olmasını amaçlamıştır. Bu bağlamda tohumlara kaplama yöntemiyle bakteri izolatlarının uygulanması denenmiştir. Bu yöntemle uygulanan bakterilerin tohumlar ekilinceye kadar canlılıklarını sürdürülebildiği yaptığımız canlılık denemelerinde belirlenmiştir. İklim odası sonuçlarına göre en etkili S6-5 (*Pseudomonas fluorescens*) ve A1-4 (*P. fluorescens*) izolatları olduğu belirlenmiştir. Ancak çalışmamız kapsamında yapılan ve Çizelge 4.5'te verilen ön eleme testleri sonucu; A1-4 (*P. fluorescens*), S2-2 (*P. fluorescens*), A1-1 (*P. fluorescens*), A4-4 (*P. fluorescens*) izolatlarının tütün testi pozitif çıktığı saptanmıştır. Sonuçlara göre bu izolatların, çökerten hastalıkları ile savaşmada biyolojik ajan olarak kullanılmaları pamuk bitkileri açısından aşırı duyarlılık oluşumuna neden olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Ayrıca yine aynı çizelgede yer alan Patetes yumuşak çürüklük testi sonuçlarına göre ES2-1 (*Bacillus velezensis*) ve A4-7 (*B. velezensis*) izolatları sonuçlarının pozitif çıkması bitkiler üzerine pektolitik aktivitede rol oynayabileceği düşünülebilir. Bu bağlamda Tütün aşırı duyarlılık ve Patates yumuşak çürüklük testleri pozitif reaksiyon gösteren izolatların biyolojik savaşta antagonist olarak kullanılmaları konukçu pamuk bitkileri için risk teşkil edebileceği değerlendirilmeli ve başarıyı olumsuz etkileyebileceği akıldan çıkarılmamalıdır.

Genel olarak bitkilerde patojen olan etmenler insanlarda ve memelilerde sorun teşkil etmezler. Ancak bazı saprofitik mikroorganizmalar insanlarda hastalıklara sebep olabilir. Bunun yanında topraktan ve sudan izole edilen bazı mikroorganizmaların bitki patojenlerine karşı antagonistik özelliği bulunabilir. Bu izolatların her ne kadar bitki patojenlerine karşı antagonistik özelliği olmasına

rağmen aynı zamanda insan patojeni özelliği de taşıyabilirler (Özyılmaz, 2018). Bu duruma örnek teşkil edecek S3-3 (*P. aeruginosa*) izolatu çalışmamızda izole edilmiştir. Bu izolatu ikili kültür testleri sonucu *R. solani*'ye karşı en etkili izolat olduğu belirlenmiştir. Ancak yapılan literatür taramaları sonucu bu izolatu; topraktan, nehir sularından ve sebzelerden kolaylıkla izole edilebileceği ve insanlarda fırsatçı patojen olarak bildirildiği görülmüştür. Özellikle bağışıklık sistemi düşük, kanser ve yanık hastaları için ciddi solunum riskleri oluşturmaktadır (Maçin, 2014) . Topraktan izole edilen bakterilerin her zaman masum olamayabileceği, gerekli testlerin yapılması ve bu çalışmalar sırasında araştırmacıların titiz davranmaları gerekmektedir. İlerde yapılacak olan çalışmalarda bu durumlar göz önüne alınarak yardımcı olabileceği düşünülmektedir. Özellikle son yıllarda revaçta olan organik tarım ve artan pestisit kullanımı buna oranla maliyet artışlarına bir alternatif olabileceği düşünülmektedir. Özellikle biyolojik ajanların depolanması ve uygulamadaki birtakım zorlukların çalışmamızda kullanılan yöntemlerle uygulanması sonucu bu sorunların önüne geçilebileceği düşünülmektedir. Sonuç olarak ülkemizde diğer mücadele yöntemleriyle birlikte biyolojik mücadele uygulamaları kombine edilerek, daha ümitvar sonuçların elde edilebileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Akpınar, M.Ö. 2008. Pamukta Fide Kök Çürüklüğü Etmenlerine Karşı Bazı Biyolojik Preparatların Etkinliğinin Saptanması. Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi (Basılmamış), Aydın.
- Alagesaboopathi, C. 1994. Biological control of damping-off disease of cotton seedling. **Curr. Sci.**, 66: 865–868.
- Amer, G.A., Utkhede, R.S. 2000. Development of formulation of biological agents for the management of root rot lettuce and cucumber. **Can. J. Microbiol.**, 46: 809–816.
- Anonim 2006. Tarış Ar-Ge Pamuk Raporu.
- Anonim 2017. Pamuk Entegre Mücadele Teknik Talimatları. Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü, Ankara.
- Anonim 2018. 2018 Pamuk Raporu. URL <http://www.zmo.org.tr> (erişim 3.5.20).
- Anonim 2019. 2019 World Cotton Area. FAO. URL <http://www.fao.org> (erişim 3.5.20).
- Anonim 2020a. Cotton Supply and Distribution by Country. United States Dep. Agric. Foreign Agric. Serv. URL <https://apps.fas.usda.gov/> (erişim 3.5.20).
- Anonim 2020b. Yıllara Göre Türkiye Pamuk Üretim Verileri. Türkiye İstatistik Kurumu. URL <http://www.tuik.gov.tr> (erişim 3.5.20).
- Anonim 2020c. 2019 Yılı İllere Göre Pamuk Üretim Verileri. Türkiye İstatistik Kurumu. URL www.tuik.gov.tr (erişim 3.4.20).
- Anonim 2020d. 2019 Yılı Aydın İli ve İlçeleri Üretim Verileri. Türkiye İstatistik Kurumu. URL www.tuik.gov.tr (erişim 3.4.20).
- Başal, H., Sezener, V. 2012. Turkey Cotton Report, **In 11th Regional Meeting of the International Cotton Advisory Committee (ICAC)**. Antalya, Turkey.
- Bewley, J.D., Black, M. 1994. Seeds, 2nd Editio. ed, Seeds. Springer Science+Business Media, New York.
- Bharathi, R., Vivekananthan, R., Harish, S., Ramanathan, A., Samiyappan, R. 2004. Rhizobacteria-based bio-formulations for the management of fruit rot infection in chillies. **Crop Prot.**, 23: 835–843.

- Bradbury, J.F. 1970. Isolation and preliminary study of bacteria from plants. **Plant Pathol.**, 49: 213–218.
- Burns, J.R., Benson, D.M. 2000. Biocontrol of damping-off of *Catharanthus roseus* caused by *Pythium ultimum* with *Trichoderma virens* and binucleate *Rhizoctonia* fungi. **Plant Dis.**, 84: 644–648.
- Carvajal, M., Martinez-Ballesta, M.C., Moreno, D.A., Bernabeu, J., García-Viguera, C. 2015. Seed Coating Increase Broccoli Nutrient Content and Availability after Cooking. **J. Agric. Sci.**, 7.
- Chauhan, A.K., Maheshwari, D.K., Kim, K., Bajpai, V.K. 2016. Termitarium-inhabiting *Bacillus endophyticus* TSH42 and *Bacillus cereus* TSH77 Colonizing *Curcuma longa* L.: Isolation, Characterization, and Evaluation of their Biocontrol and Plant-Growth-Promoting Activities. **Can. J. Microbiol.**, 62: 880–892.
- Chen, X.H., Koumoutsi, A., Scholz, R., Borriss, R. 2009. More than anticipated - Production of antibiotics and other secondary metabolites by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. **J. Mol. Microbiol. Biotechnol.**, 16: 14–24.
- Chung, W.C., Huang, J.W., Huang, H.C. 2005. Formulation of a soil biofungicide for control of damping-off of Chinese cabbage (*Brassica chinensis*) caused by *Rhizoctonia solani*. **Biol. Control**, 32: 287–294.
- Cook, R.J. 2000. Advances in plant health management in the 20th century. **Annu. Rev. Phytopathol.**, 38: 875–890.
- Çopur, O. 2018. GAP Projesinin Türkiye Pamuk Üretimine Etkisi: Son On Yıldaki Değişimler. **ADYÜTAYAM**, 6: 11–18.
- De Boer, S.H., Ward, L.J. 1995. PCR detection of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* Associated with Potato Tissue. **Phytopathology**, 85: 854–858.
- Demir, G., Karcıoğlu, A., Onan, E. 1999. Protection of Cotton Plants Against Damping-off Disease with Rhizobacteria. **J. Turkish Phytopathol.**, 28: 111–118.
- Dinler, H. 2007. Aydın ili'nde Pamuk Alanlarından Elde Edilen *Verticillium dahliae* kleb. İzolatlarının Vejetatif Uyum Gruplarının (VCGS) Saptanması. Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi (Basılmamış), Aydın.
- Duman, İ., Gökçöl, A. 2017. Biber (*Capsicum annuum* L.) ve Patlıcan (*Solanum melongena* L.) Tohumlarının Fidelik Performanslarının İyileştirilmesi. **Ege Üniv. Ziraat Fak. Derg.**, 54: 333–340.

- Egamberdieva, D., Jabborova, D. 2013. Biocontrol of Cotton Damping-off Caused by *Rhizoctonia solani* in Salinated Soil with Rhizosphere Bacteria. *Asian Australas. J. Plant Sci. Biotechnol.*, 7: 31–38.
- Erdoğan, O., Bölek, Y., Göre, M.E. 2016. Biological control of cotton seedling diseases by fluorescent *Pseudomonas* spp. *Tarım Bilim. Dergisi*, 22: 398–407.
- Eser, B., Duman, İ., Gökçöl, A. 2009. Türk tarımında tohumun stratejik önemi. *Türktarım, Tarım ve Köyişleri Bakanl. Dergisi*, 188: 30–38.
- Fan, B., Wang, C., Song, X., Ding, X., Wu, L., Wu, H., Gao, X., Borriss, R. 2018. *Bacillus velezensis* FZB42 in 2018: The gram-positive model strain for plant growth promotion and biocontrol. *Front. Microbiol.*, 9.
- Gajbhiye, A., Rai, A.R., Meshram, S.U., Dongre, A.B. 2010. Isolation, Evaluation and Characterization of *Bacillus subtilis* from Cotton Rhizospheric Soil with Biocontrol Activity Against *Fusarium oxysporum*. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 26: 1187–1194.
- Garcia, S., De Alencar Nääs, I. 2014. Textile industry can be less pollutant: introducing naturally colored cotton. *Int. J. Prod. Manag. Eng.*, 2: 85.
- Gardener McSpadden, B.B., Fravel, D.R. 2002. Biological Control of Plant Pathogens: Research, Commercialization, and Application in the USA. *Plant Heal. Prog.*, 1–18.
- Gökçöl, A., Duman, İ. 2018. Tohum Kaplama Teknolojileri. *TÜRKTÖB Dergisi*, 26: 23–25.
- Harman, G.E. 2000. Myths and Dogmas of Biocontrol Changes in Perceptions Derived from Research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Dis.*, 84: 377–393.
- Heydari, A., Misaghi, I.J., Balestra, G.M. 2008. Pre-emergence herbicides influence the efficacy of fungicides in controlling cotton seedling damping-off in the field. *Int. J. Agric. Res.*, 2: 1049–1053.
- Heydari, A., Pessarakli, M. 2010. A Review on Biological Control of Fungal Plant Pathogens Using Microbial Antagonists. *J. Biol. Sci.*, 4.
- Hill, D.S., Stein, J.I., Tokewitz, N.R., Morse, A.M., Ligon, J.M., Howell, C.R., Becker, J.O., Pachlatko, J.P. 1994. Cloning of Genes Involved in the Synthesis of Pyrrolnitrin from *Pseudomonas fluorescens* and Role of Pyrrolnitrin Synthesis in Biological Control of Plant Disease. *Applied And Environmental Microbiology*, 60: 78–85.

- Hillocks, R.J. 1997. Cotton and Tropical Fibres in Soilborne Diseases of Tropical Crops. **CAB International**, 303-329.
- İyriboz, N.Ş. 1971. Pamuk Zararlıları ve Hastalıkları. Ticaret Matbaacılık T.A.Ş., İzmir.
- Jayaraj, J., Radhakrishnan, N. V., Kannan, R., Sakthivel, K., Suganya, D., Venkatesan, S., Velazhahan, R. 2005. Development of new formulations of *Bacillus subtilis* for management of tomato damping-off caused by *Pythium aphanidermatum*. **Biocontrol Sci. Technol.**, 15: 55–65.
- Jorjani, M., Heydari, A., Zamanizadeh, H.R., Rezaee, S., Naraghi, L., Zamzami, P. 2012. Controlling Sugar Beet Mortality Disease By Application of New Bioformulations. **J. Plant Prot. Res.**, 52: 303–307.
- Kabaluk, J.T., Antonet, M.S., Goettel, M.S., Woo, S.G. 2010. The Use And Regulation Of Microbial Pesticides In Representative Jurisdictions Worldwide, IOBC Global. Canada.
- Kapur, P.C., Fuerstenau, D.W. 1967. Dry Strength of Pelletized Spheres. **J. Am. Ceram. Soc.**, 50: 14–18.
- Karaca, İ. 1984. Sistemik Bitki Hastalıkları. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları. No:217, İzmir.
- Karcılıoğlu, A. 1976. Gediz Havzasında Pamuklarda Çökerten Yapan Fungal Etmenler, Zarar Derecesi ve Patojenisteleri Üzerine Araştırmalar. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi (Basılmamış), İzmir.
- Keawkham, T., Siri, B., Hynes, R.K. 2014. Effect of Polymer Seed Coating and Seed Dressing with Pesticides on Seed Quality and Storability of Hybrid Cucumber. **Aust. J. Crop Sci.**, 8.
- Khiyami, M.A., Omar, M.R., Abd-Elsalam, K.A., Aly, A.A.E. 2014. Bacillus-based biological control of cotton seedling disease complex. **J. Plant Prot. Res.**, 54: 340–348.
- King, E.O., Ward, M.K., Raney, D.E. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. **J. Lab. Clin. Med.**, 44: 301–307.
- Klement, Z. 1963. Rapid detection of the pathogenisty of phytopathogenic pseudomonas. **Nature**, 199: 299–300.
- Klement, Z. 1968. Pathogenicity factors in regard to relationships of phytopathogenic bacteria. **Phytopathology**, 58: 1218–1222.

- Kloepper, J.W., Schroth, M.N., Miller, T.D. 1980. Effects of rhizosphere colonization by plant growth promoting rhizobacteria on potato plant development and yield. **Phytopathology**, 70: 1078–1082.
- Kovacs, N. 1956. Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the Oxidase Reaction. **Nature**, 178: 703.
- Küçük, N. 2015. Pamuğun Dünyası, Küresel Aktörler ve Politikalar. **ASSAM Int. Ref. J.**, 81–113.
- Küçük, N., Issı, S. 2019. Pamuk Üretiminin Stratejik Önemi Üzerine Genel Bir Değerlendirme. **Turan-Sam Uluslararası Bilimsel Hakemli Dergisi**, 11.
- Lamichhane, J.R., Dürr, C., Schwanck, A.A., Robin, M.H., Sarthou, J.P., Cellier, V., Messéan, A., Aubertot, J. 2017. Integrated management of damping-off diseases. A review. **Agron. Sustain. Dev.**, 37.
- Lelliott, R.A., Billing, E., Hayward, A.C. 1966. A Determinative Scheme for the Fluorescent Plant Pathogenic *Pseudomonads*. **J. Appl. Bacteriol.**, 29: 470–489.
- Lyne, C.W., Johnston, H.G. 1981. The Selection of Pelletisers. **Powder Technol.**, 29: 211–216.
- Maçın, S. 2014. Pigmentli ve Pigmentsiz *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarının Virulans Faktörlerinin Fenotipik ve Genotipik Olarak Karşılaştırılması. Uzmanlık Tezi, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi.
- Mansoori, M., Heydari, A., Hassanzadeh, N., Rezaee, S., Naraghi, L. 2013. Evaluation of *Pseudomonas* and *Bacillus* bacterial antagonists for biological control of cotton *Verticillium* wilt disease. **J. Plant Prot. Res.**, 53: 154–157.
- Martin, F.N. 2000. *Rhizoctonia* spp. Recovered from Strawberry Roots in Central Coastal California. **Phytopathology**, 90: 345–353.
- Mert, M. 2007. Pamuk Tarımının Temelleri, Teknik Yay. ed. Kozan Ofset Matbaacılık, Ankara.
- Miles, A.A., Misra, S.S., Irwin, O. 1938. The Estimation of The Bactericidal Power of The Blood. **Cambridge Univ. Press**, 38: 732–749.
- NCBI 2020. National Center for Biotechnology Information (NCBI)[Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; [1988]. URL www.ncbi.nlm.nih.gov (erişim 5.11.20).

- Nehra, V., Saharan, B.S., Choudhary, M. 2016. Evaluation of *Brevibacillus brevis* as a Potential Plant Growth Promoting Rhizobacteria for Cotton (*Gossypium hirsutum*) Crop. **Springerplus**, 5.
- Nemli, T., Sayar, İ. 2002. Aydın Söke Yöresinde Pamuk Hastalıklarının Yaygınlığı, Etmenlerin ve Önleme Olanaklarının Araştırılması.
- Okumuş, A., Alçınkaya, T. 2019. Toprak ve Bitki Destekleyicileri: Biopestisit ve Mikrobiyal Gübreler. İçinde: **2. Uluslararası 19 Mayıs Yenilikçi Bilimsel Yaklaşımlar Kongresi**, Samsun, Turkey.
- Özbek, N. 2011. Pamukta (*Gossypium hirsutum* L.) Lif ve Tohum Özellikleri Arasındaki İlişkilerin Saptanması. Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi (Basılmamış), Aydın.
- Özyılmaz, Ü. 2007. Aydın İlinde Çilek Kök Hastalıklarına Karşı Antagonist Bakterilerle Biyolojik Savaş. Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi (Basılmamış), Aydın.
- Özyılmaz, Ü. 2018. Bitki Hastalıklarına Karşı Biyolojik Mücadele Çalışmalarında Kullanılan Mikroorganizmaların İnsan Sağlığı Açısından Taşıdığı Riskler. **Uluslararası Tarım, Çevre ve Sağlık Kongresi**, Aydın.
- Paulitz, T.C., Schroeder, K.L. 2005. A New Method for the Quantification of *Rhizoctonia solani* and *R. oryzae* from Soil. **Plant Dis.**, 89: 767–772.
- Paulson, J.K., Sirtioglu, I. 2015. Turkey Cotton and Products Annual Report 2015.
- Rajendran, L., Ramasamy, S. 2008. Endophytic *Bacillus* Species Confer Increased Resistance in Cotton Against Damping off Disease Caused by *Rhizoctonia solani*. **Plant Pathol.**, 7: 1–12.
- Ramarathnam, R., Dilantha Fernando, W.G., de Kievit, T. 2011. The role of antibiosis and induced systemic resistance, mediated by strains of *Pseudomonas chlororaphis*, *Bacillus cereus* and *B. amyloliquefaciens*, in controlling blackleg disease of canola. **BioControl**, 56: 225–235.
- Ritchie, G.L., Bednarz, C.W., Jost, P.H., Brown, S.M. 2007. Cotton Growth and Development. **Cooperative Extension**, 1252: 1-14.
- Rush, C., Carling, D.E., Haveson, R.M. 1994. Prevalence and pathogenicity of anastomosis groups of *Rhizoctonia solani* from wheat and sugar beet in Texas. **Plant Dis.**, 78: 349–352.

- Safiyazov, J.S., Mannanov, R.N., Sattarova, R.K. 1995. The use of bacterial antagonists for the control of cotton diseases. **F. Crop. Res.**, 43: 51–54.
- Sallam, N.A., Riad, S.N., Mohamed, M.S., El-eslam, A.S. 2013. Formulations of *Bacillus* spp. and *Pseudomonas fluorescens* for biocontrol of cantaloupe root rot caused by *Fusarium solani*. **J. Plant Prot. Res.**, 53: 295–300.
- Samavat, S., Besharati, H., Behboudi, K. 2011. Interactions of *Rhizobium* Cultural Filtrates with *Pseudomonas fluorescens* on Bean Damping-off Control. **J. Agric. Sci. Technol.**, 13: 965–976.
- Samavat, S., Heydari, A., Zamanizadeh, H.R., Rezaee, S., Aliabadi, A.A. 2014a. A comparison between *Pseudomonas aureofaciens* (chlororaphis) and *P. fluorescens* in biological control of cotton seedling damping-off disease. **J. Plant Prot. Res.**, 54: 116–121.
- Samavat, S., Heydari, A., Zamanizadeh, H.R., Rezaee, S., Aliabadi, A.A. 2014b. Application of new bioformulations of *Pseudomonas aureofaciens* for biocontrol of cotton seedling damping-off. **J. Plant Prot. Res.**, 54: 334–339.
- Saydam, C., Qureshi, S.H. 1979. The Effect of Nutrition and Inoculum Density of *Rhizoctonia solani* Kuhn. on Damping-off of Cotton Seedlings. **Turkish Phytopathol.**, 8: 101–106.
- Shoda, M., Asaka, O. 1996. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* Damping-Off of Tomato with *Bacillus subtilis* RB14. **Applied And Environmental Microbiology**, 62: 4081–4085.
- Sökel, S. 2019. Tohuma Kaplanan *Trichoderma* spp.'nin Hıyarda *Fusarium* Solgunluğuna Etkilerinin Araştırılması. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi (Basılmamış), İzmir.
- Solanki, M.K., Robert, A.S., Singh, R.K., Kumar, S., Pandey, A.K., Srivastava, A.K., Arora, D.K. 2012. Characterization of Mycolytic Enzymes of *Bacillus* Strains and Their Bio-Protection Role Against *Rhizoctonia solani* in Tomato. **Curr. Microbiol.**, 65: 330–336.
- Thornley, M.J. 1960. The differentiation of *Pseudomonas* from other Gram-negative bacteria on the basis of arginine metabolism. **J. Appl. Microbiol.**, 23: 37–52.
- Wang, H., Davis, R.M. 1997. Susceptibility of selected cotton-cultivars to seedling disease pathogens and benefits of chemical seed treatments. **Plant Disease**, 81: 1085–1088.

- Yıldız, A., Benlioğlu, S. 2008. *Trichoderma harzianum*'un Pamuklarda ökerten (*Rhizoctonia solani* Kühn.) Ve *Verticillium Solgunlugu* Hastalığı (*Verticillium dahliae* Kleb.)'na Etkisinin in-vivo Koşullarda Saptanması. **ADÜ Ziraat Fakültesi Dergisi**, 6: 3–7.
- Yılmaz, Ö. 2009. Pamuk Alanlarında ökertene Yol Açan Patojenlere Karşı Bazı İlaçların Etkinliğinin Saptanması. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi (Basılmamış), İzmir.
- Zaim, S., Belabid, L., Bellahcene, M. 2013. Biocontrol of chickpea Fusarium wilt by *Bacillus* spp. rhizobacteria. **J. Plant Prot. Res.**, 53: 177–183.
- Zaki, K., Misaghi, I.J., Heydari, A., Shatla, M.N. 1998. Control of cotton seedling damping-off in the field by *Burkholderia* (*Pseudomonas*) *cepacia*. **Plant Disease**, 82: 291–293.
- Zheng, X.Y., Sinclair, J.B. 2000. The effects of traits of *Bacillus megaterium* on seed and root colonization and their correlation with the suppression of *Rhizoctonia* root rot of soybean. **BioControl**, 45: 223–243.
- Zhou, T., Chen, D., Li, C., Sun, Q., Li, L., Liu, F., Shen, Q., Shen, B. 2012. Isolation and Characterization of *Pseudomonas brassicacearum* J12 as an Antagonist Against *Ralstonia solanacearum* and Identification of its Antimicrobial Components. **Microbiological Research**, 167: 388–394.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Hasan Hüseyin BAYIRLI

Doğum Yeri ve Tarihi : Manisa- 24.11.1995

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : Adnan Menderes Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü. 2014-2018.

Yüksek Lisans Öğrenimi : Adnan Menderes Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü.

Yabancı Diller : İngilizce

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

Lisans Tez Konusu : Bydgoszcz Teknoloji ve Yaşam Bilimleri Üniversitesi

Danışman : Prof. Dr. Kemal BENLİOĞLU

İLETİŞİM

E-Posta Adresi : hasanhuseyinbayirli@gmail.com

Tarih : 12 Haziran 2020