



Endofit ve Epifit Bakteri İzolatlarının Bazı Turunçgil Fungal Hastalık Etmenlerine Karşı *in vitro* Biyokontrol Etkinlik ve Etki Mekanizmalarının Belirlenmesi

Yusuf GÜMÜŞ¹, Emine Mine SOYLU²

^{1,2} Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü 31034 Antakya, Hatay, Türkiye,

¹<https://orcid.org/0000-0001-7818-1831>, ²<https://orcid.org/0000-0001-5961-0848>,

✉: msoylu@mku.edu.tr

ÖZET

Bu çalışmada, sağlıklı turunçgil çeşitlerinden izole edilen 48 farklı antagonist biyolojik mücadele etmeni (BCA) ve bitki gelişimini teşvik eden (PGP) endofit ve epifit bakteri izolatının turunçgillerde sorun bazı fungal hastalık etmenlerine (*Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium solani*, *Geotrichum citri-aurantii*) karşı *in vitro* antagonistik etkinlikleri ve etkinlik mekanizmalarının belirlenmesi amaçlanmıştır. MALDI-TOF tanımlama çalışmaları sonucunda 33 izolat Gram-pozitif (*Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Cronobacter*, *Staphylococcus*) 15 izolat ise Gram-negatif (*Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Kosakonia*, *Enterobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Pantoea*, *Rahnella*, *Raoultella*, *Rhizobium*, *Siccibacter*) bakteri cinslerine ait türler olarak belirlenmiştir. İkili kültür testlerinde *Bacillus vallismortis* YGL73ep, *B. thuringiensis* YGT22en, *B. subtilis* YGS5en, *B. cereus* YGK25en ve *Pseudomonas chlororapsis* YGM82ep izolatları *G. citri-aurantii*, *C. gloeosporioides* ve *F. solani*'nin misel gelişimini %65.5-77.2 oranlarında engelleyen en etkili antagonist bakteri izolatları olarak belirlenmiştir. Temsili olarak seçilen *P. chlororapsis* YGM82ep, *B. vallismortis* 73YGep, *B. thuringiensis* 22YGen ve *B. cereris* 25YGen izolatları tarafından üretilen uçucu organik bileşikler (VOC's) fungal etmenlerin *in vitro* misel gelişimlerini önemli ölçüde engellemiştir. Test edilen 25 bakteri izolatının, 20 tanesi siderofor, 24 tanesi amonyak, 19 tanesi protease, 5 tanesi ise hidrojen siyanür üretiminde pozitif etkinlik göstermiştir. Bakteri izolatlarından 21 tanesi IAA hormonu üretmiş, 7 izolatın ise fosforu çözebilmeye yeteneğinde olduğu belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar, yüksek düzeyde antagonist ve PGP etkinliği gösteren BCA izolatlarının, turunçgil fungal hastalıkların baskılanmasında biyopreparat, yetiştiriciliğinde ise biyogübre olarak kullanılma potansiyeline sahip olduğunu göstermiştir.

Bitki Koruma

Araştırma Makalesi

Makale Tarihçesi

Geliş Tarihi : 26.03.2024

Kabul Tarihi : 08.05.2024

Anahtar Kelimeler

Antagonist
Biyolojik mücadele
Solgunluk,
Antraknoz,
Ekşi çürüklük

Determination of *in vitro* Biocontrol Efficacy and Mechanisms of Action of Endophytic and Epiphytic Bacterial Isolates against Some Citrus Fungal Disease Agents

ABSTRACT

In this study, it was aimed to determine the *in vitro* antagonistic activities and mechanisms of activity of 48 different antagonist biological control agents (BCA) and plant growth promoting (PGP) endophyte and epiphyte bacterial isolates against some fungal disease agents (*Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium solani*, *Geotrichum citri-aurantii*) in citrus fruits. As a result of MALDI-TOF identification studies, 33 isolates were identified as Gram-positive (*Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Cronobacter*, *Staphylococcus*) and 15 isolates were identified as Gram-negative (*Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Kosakonia*, *Enterobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Pantoea*, *Rahnella*, *Raoultella*, *Rhizobium*, *Siccibacter*). *Bacillus vallismortis* YGL73ep, *B. thuringiensis* YGT22en, *B. subtilis* YGS5en, *B. cereus* YGK25en and *Pseudomonas chlororapsis* YGM82ep isolates were found to be the most effective antagonist isolates suppressing mycelial growth of *G. citri-aurantii*, *C. gloeosporioides* and *F. solani* by 65.5-77.2% in *in vitro* dual culture tests. Volatile organic compounds (VOCs) produced by representative isolates

Plant Protection

Research Article

Article History

Received : 26.03.2024

Accepted : 08.05.2024

Keywords

Antagonist
Biological control
Wilt
Antraknose
Sour rot

P. chlororapsis YGM82ep, *B. vallismortis* 73YGep, *B. thuringiensis* 22YGen, and *B. cererus* 25YGen significantly inhibited *in vitro* mycelial growth of fungal agents. Of the 25 bacterial isolates tested, 20 isolates were positive for siderophore, 24 isolates for ammonia, 19 isolates for protease, and 5 isolates for hydrogen cyanide production. Of the bacterial isolates tested, 21 isolates produced the hormone IAA and 7 isolates were found to be capable of solubilizing phosphorus. The results showed that the BCA isolates with high levels of antagonistic and PGP activities have the potential to be used as biopreparat for the suppression of citrus fungal diseases and also as biofertilizer in citrus cultivation.

Atıf İçin : Gümüş, Y., & Soylu, E.M. (2024). Endofit ve Epifit Bakteri İzolatlarının Bazı Turunçgil Fungal Hastalık Etmenlerine Karşı *in vitro* Biyokontrol Etkinlik ve Etki Mekanizmalarının Belirlenmesi. *KSÜ Tarım ve Doğa Derg* 27(6), 1376-1391. DOI: 10.18016/ksutarimdog.vi.1459337.

To Cite: Gümüş, Y., & Soylu, E.M. (2024). Determination of *in vitro* Biocontrol Efficacy and Mechanisms of Action of Endophytic and Epiphytic Bacterial Isolates against Some Citrus Fungal Disease Agents. *KSU J. Agric Nat* 27 (6), 1376-1391. DOI: 10.18016/ksutarimdog.vi.1459337.

GİRİŞ

Anavatanı Çin, Güneydoğu Asya ve Hindistan olan turunçgil günümüzde subtropik iklimlere sahip neredeyse tüm ülkelerde yetiştirilmektedir. Turunçgiller, dünyada en fazla yetiştirilen ve tüketilen meyve grubu olup, 9.8 milyon ha alanda 103 milyon ton üretim gerçekleştirilmiştir. Turunçgil üretiminde ilk sırayı 41 milyon tonla Çin almakta olup, bu ülkeyi 18 milyon tonla Brezilya ve 15 milyon ton ile Kuzey Amerika izlemektedir. Türkiye, 5 milyon ton ile turunçgil üretiminde yedinci sırada yer almaktadır (FAO, 2021).

Turunçgiller yetiştirme süresince olduğu kadar depolanma koşulları sırasında da birçok toprak ve hava kökenli fungal hastalıklar tarafından etkilenir. Dünyada ve Türkiye'nin önde gelen turunçgil üretim bölgelerinde sıkça görülen fungal hastalıklar arasında antraknoz (*Colletotrichum* spp) (Guarnaccia ve ark., 2017; Uysal ve ark., 2022.), Fusarium solgunluğu ve kök çürüklüğü (*Fusarium* spp.) (Kurt ve ark., 2020), turunçgil meyvelerinde kahverengi çürüklük ve gövde zamklanması (*Phytophthora citrophthora*) (Kurbetli ve ark., 2016), uçkurutan (*Plenodomus tracheiphilus*) (Krasnov ve ark., 2023), Alternaria kahverengi leke hastalığı (*Alternaria citri*) (Güney ve ark., 2023) bulunmaktadır. Bahçe koşullarında ortaya çıkan hastalıkların yanı sıra, depolama sürecinde de ekşi çürüklük (*Geotrichum citri-aurantii*), yeşil küf (*Penicillium digitatum*) ve mavi küf (*Penicillium italicum*) hastalıkları turunçgil üretiminde önemli ekonomik kayıplara neden olan diğer önemli hastalıklardır (Uysal & Kurt, 2019;).

Colletotrichum türleri genellikle antraknoz hastalığına neden olur ve fungus alemi içinde Ascomycota şubesine, Sordariomycetes sınıfına, Phyllachorales takımına ve Phyllachoraceae familyasına aittir (Shivas ve ark., 2016). Antraknoz hastalığı, turunçgillerin sürgünlerinde geriye doğru kuruma, yapraklarda lekeler, erken dönemde yaprak ve meyve dökülmeleri gibi belirtilerle kendini gösterir.

Hastalık belirtileri, bitkilerin tüm vegetatif ve generatif organlarında görülebilir (Wang ve ark., 2021).

Son yıllarda Türkiye'nin turunçgil üretiminin yapıldığı alanlarda *Fusarium solanini*'nin sıklıkla görülmeye başlamasıyla birlikte bu bölgelerdeki ağaçlarda farklı kök çürüklükleri ve solgunluk belirtileri ortaya çıkmıştır. Yeni tesis edilen bahçelerde ve yetişkin ağaçlardan oluşan bahçelerde yoğun kurumalara ve solgunluklara rastlanmakta, ileri düzeyde bu tür hastalıklardan dolayı ağaçların sökümü ile sonuçlanan kayıplar ortaya çıkmaktadır (Kurt ve ark., 2020). Fungal hastalık etmeni, solgunluk, sararma, nekrozlaşma ve yaprakların dökümü ile birlikte enfekteli ağaçların hızla ölümüne neden olur (Leslie & Summerell, 2006; Yaseen & D'Onghia, 2012; Al-Sadi ve ark., 2014; Bueno ve ark., 2014).

Geotrichum citri-aurantii'nin yol açtığı ekşi çürüklük hastalığı, bol yağışlı mevsimlerde meyve ürünlerinde büyük verim kayıplarına sebep olabilir. Bu hastalık, olgunlaşmış veya aşırı olgunlaşmış meyvelerde, yeşil ve olgunlaşmamışlara kıyasla daha fazla etki gösterebilir. Özellikle nemli iklimlerde uzun süren dönemlerde ve depolama süresi uzun olan meyvelerde bu hastalık ciddi sorunlara yol açabilir (Kara & Soylu, 2020; Soylu ve ark., 2022).

Toprak kökenli patojenlere karşı bazı fungusitlerin ya tamamen etkisiz ya da yetersiz kaldığı görülmektedir (Kara ve ark., 2024). Bazı patojenlere karşıda hiç ruhsatlı fungusit bulunmamaktadır. Bu sebeple bilim dünyası son yıllarda biyolojik mücadele etmenlerinin devreye girmesini hedeflemeleri nedeniyle mevcut konu üzerine kurgulanmış çalışmalara yoğunlaşmıştır (Soliman & Badaea, 2002; Kara ve ark., 2020; Kara & Soylu, 2022; Soylu ve ark., 2022).

Bitkilerde sorun olan fungal ve bakteriyel kökenli hastalıklarla kimyasal mücadeleye alternatif yollardan biri ise sağlıklı bitki veya yetiştirdikleri topraklardan izole edilen antagonist ve bitki gelişimini teşvik eden (Plant Growth Promoting Bacteria, PGPB)

bakteriyel biyokontrol etmenlerinin kullanıldığı biyolojik mücadeledir. Son yıllarda, hastalıklarla biyolojik mücadele kapsamında PGPR, epifitik bakteriler ve endofit bakterilerin kullanımı artmaktadır. Daha önce yapılan çalışmalarda, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Chryseobacterium*, *Clavibacter*, *Curtobacterium*, *Enterobacter*, *Micrococcus*, *Paenibacillus*, *Phyllobacterium*, *Pseudomonas*, *Serratia* ve *Stenotrophomonas* gibi çeşitli bakteriyel cinslere ait endofit ve epifit karakterli antagonistik bakteri türleri farklı kültür bitkileri ve yabancı bitkilerden izole edilerek biyolojik mücadele ve bitki gelişimini teşvik etme amaçlı çalışmalarda incelenmiştir (Tekiner ve ark., 2019; Sturz ve ark., 2000; Duman & Soylu, 2019; Aktan & Soylu, 2020; Soylu ve ark., 2020).

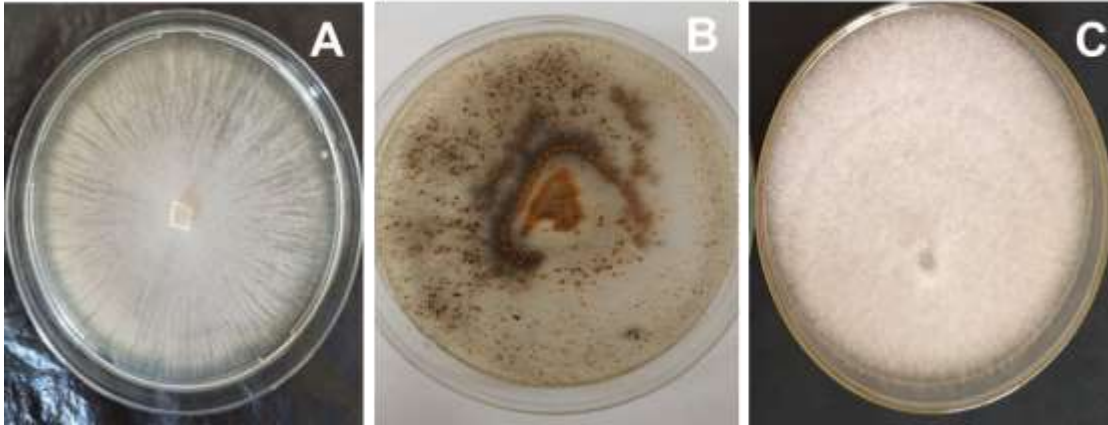
Yapılan bu çalışmada, farklı turuncgöl türlerine ait sağlıklı ağaçların farklı kısımlarından (i) endofit ve epifit bakteri izolatların izolasyonu, tanılanması; (ii) turuncgöllerde sorun olan fungal hastalık etmenlerinden *Geotrichum citri-aurantii*, *Colletotrichum gloeosporioides* ve *Fusarium solani*'nin misel gelişimleri üzerinde *in vitro* biyokontrol

etkinliklerinin belirlenmesi; (iii) fungal etmenlerin misel gelişiminin engellenmesinde ve bitki büyümesinin gelişiminde (PGP) rol oynayan olası etki mekanizmalarının karakterize edilmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOD

Fungal Hastalık Etmenleri

Biyoetkinlik çalışmalarında kullanılan ve çalışmanın ana materyalini oluşturan fungal hastalık etmenleri *Fusarium solani* (Cfs8), *Colletotrichum gloeosporioides* (LC5) ve *Geotrichum citri-aurantii* (MKUGca2), HMKÜ Bitki Sağlığı Kliniği Uygulama ve Araştırma Merkezi kültür koleksiyonundan temin edilmiştir. Bu patojenler Hatay ilinin en fazla turuncgöl yetiştiriciliğinin yapıldığı Erzincan ilindeki farklı hastalık belirtisi gösteren portakal (Washington Navel), mandarin (Owari Satsuma) ve limon (Meyer) ağaçlarının kök, gövde, sürgün, yaprak ve meyvelerinden Patates Dekstroza Agar (PDA) besi yerinde izole edilmiş (Şekil 1), morfolojik ve moleküler olarak tanımlanmıştır (Kurt ve ark., 2019; Kara ve ark., 2020; Kurt ve ark., 2020).



Şekil 1. Çalışmada kullanılan *Geotrichum citri-aurantii* (A), *Colletotrichum gloeosporioides* (B) ve *Fusarium solani* (C) izolatlarının tek spor kültürleri

Figure 1. Single spore cultures of *Geotrichum citri-aurantii* (A), *Colletotrichum gloeosporioides* (B) and *Fusarium solani* (C) isolates used in the study

Endofit ve Epifit Bakteri İzolatlarının İzolasyonu ve Seçimi

Farklı turuncgöl çeşitlerinden alınan sağlıklı bitki örnekleri bahçeden getirildikten sonra kök, gövde, sürgün, yaprak ve gövde olarak gruplandırılmış ve her gruba ayrı bir kod verilmiştir. Endofit bakteri izolasyonu için, bitki örneklerinin yüzeyleri muhtemel fungal/bakteriyel epifit kontaminantların uzaklaştırılması amacıyla temiz çeşme suyu altında yıkanmış, daha sonra %70'lik etanol (3 dak.) ve %2'lik sodyum hipoklorit solüsyonunda (2 dak.) bekletilmek suretiyle yüzey dezenfeksiyonları tamamlanmıştır. Gerek etanol gerekse sodyum hipoklorit solüsyonunun dokulardan uzaklaştırılmak amacıyla dokular 3 kez steril su içinde (her defasında 2 dak.) durulanmıştır.

Son durulama suyundan alınan 200 µl su örneği besi yerine yayılarak yüzey dezenfeksiyonun kontrolü yapılmıştır. Yüzey dezenfeksiyonu tamamlanan sağlıklı bitki dokuları 0.05 mM MgCl₂ tampon çözeltisi bulunan steril havan içerisinde iyice ezildikten sonra 5 dak. bekletilmiştir. Buradan alınan bakteri süspansiyonu seçici King B (KB) besi yeri üzerine bagetle yayılmak suretiyle ekimleri yapılmıştır. Epifit bakterilerin izolasyonunda sağlıklı bitki kısımlarına ön dezenfeksiyon amaçlı herhangi işlem yapılmamıştır. Sağlıklı bitki dokuları 1-2 cm boyunda kesildikten sonra bitki dokuları veya toprak-kök karışımı (5 gr) doğrudan steril 0.05 mM MgCl₂ tampon çözeltisi (yaklaşık 50 ml) içine konulup, 30 dak. 200 rpm orbital çalkalayıcı içerisinde çalkalamaya

birakılmış, daha sonra buradan alınan süspansiyonlar seri olarak sulandırıldıktan (10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 ve 10^6) sonra KB besi içeren petri kaplarına bağıtle yayılmıştır. Bazı petriler içerisindeki besiyerleri üzerine sağlıklı kök dokuları doğrudan konularak kök yüzeyinden bakterilerin izolasyonları gerçekleştirilmiştir.

Aday epifit ve endofit bakteri izolatların bitki patojeni olup olmadığının belirlenmesinde tütün bitkisinde aşırı duyarlılık testi (HR) ile patates yumuşak çürüklük testleri yapılmıştır (Lelliot ve Stead, 1987). Her iki test sonucunda "negatif" olarak değerlendirilen aday bakteri izolatları TSA besi yerine çizildikten sonra 37 °C en az 48-72 saat inkübasyona bırakılmış, burada "gelişmeyen" insan patojeni olmadığı kabul edilen bakteri izolatları gerek tanılama gerekse *in vitro* biyoetkinlik çalışmalarında "aday" biyolojik mücadele etmeni izolatlar olarak değerlendirilmeye alınmıştır.

Bakteri İzolatlarının Tanılanması

Aday epifit ve endofit bakteri izolatlarının tanılanması çalışmalarında tütün yapraklarında HR, patates dilimleri üzerinde yumuşak çürüklük oluşturmeyen, aynı zamanda 37 °C gelişme göstermeyen aday bakteri izolatları tanılanmıştır. Saf kültürde gelişen tek koloni izolatların tanılanması MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany) yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Saf kültürden elde edilen ve TSA besi yerinde 24-36 saat içinde gelişen saf bakteri kolonileri, etanol-formik asit yöntemiyle ekstrakte edilmiş ve her örnek noktaya 1 µl HCCA Matrix solüsyonu eklenmiş ve kurutulmuştur. Daha sonra, bakteriler MALDI-TOF MS cihazına yüklendikten sonra bakteri izolatlarının tür teşhisleri, BIOTYPER™ 3.0 (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany) yazılımı kullanılarak, cihazın mikroorganizma kütüphanesindeki standart türlerin spektrumları ile eşleştirilerek yapılmıştır (Aktan & Soylu, 2020).

Bakteri İzolatlarının *in vitro* Koşullarda Antagonistik Etkileri

Elde edilen bakteri izolatlarının *in vitro* biyokontrol etkinlik potansiyelleri *G. citri-aurantii*, *C. gloeosporioides* ve *F. solani*ye karşı belirlenmiştir. Bakteri izolatlarının fungal etmenlerin misel gelişimini engelleme (antagonistik) etkinlikleri 9 cm çapında, içerisinde TSA+PDA (1:1) besi yeri içeren petri kaplarında "ikili kültür" testleriyle belirlenmiştir. İkili kültür testlerinde petrinin üst noktasından 2 cm gerisine çizgi ekim yöntemi ile çizilmiş bakteri izolatları 25 °C'de 48 saat ön inkübasyona bırakılmıştır. Bu sürenin sonunda 5 günlük fungal kültürlerinden alınan 6 mm çaplı misel diskleri gelişen bakteri kolonisinden 4 cm gerisine yerleştirilmiş ve tekrar gelişmeye bırakılmıştır.

TSA+PDA besiyerlerine herhangi bir bakteri izolatu çizilmemiş, sadece fungal izolatu yerleştirildiği petriler "kontrol" olarak kullanılmıştır. İkili kültür testlerinde, "kontrol" petrilerinde bulunan fungal hastalık etmeni izolatlar petriyi tamamen kapladıkları zaman (fungal etmenlere göre değişmekle birlikte genelde inokulasyondan 4-5 gün sonra), tüm petrilerde fungal etmenlerin bakteriye doğru yönelen misel gelişim (MG_u) mesafeleri cetvelle ölçülmüştür. Bakterilerin antagonistik (engelleme) etkinlikleri, kontrol petrilerdeki misel gelişim uzunlukları (MG_k) baz alınarak her bir bakteri izolatu misel gelişimini engelleme oranları %Abbott formülü kullanılmak suretiyle hesaplanmıştır (Soylu ve ark., 2020).

$$\%Engelleme = ((MG_k - MG_u) / MG_k) * 100$$

Bakteri İzolatlarının Siderofor ve Proteaz Üretme Potansiyellerinin Belirlenmesi

Bakteri izolatlarının siderofor ve proteaz üretme potansiyelleri uygun besi yerleri ve yöntemlere göre belirlenmiştir. Siderofor etkinliği Chrom Azurol-S Agar (CAS) besi yeri üzerinde (Schwyn ve Neilands, 1987), proteaz enzimi üretim etkinliği %2 yağı alınmış süt tozu (Skimmed Milk Powder, Merck, Darmstadt, Germany) bulunan Luria Broth Agar (SMLBA) besi yeri üzerinde belirlenmiştir (Perneel ve ark., 2007). Bakteri kolonileri, steril kürdan yardımıyla seçilerek her bir izolat için üç farklı noktaya inokule edilmiştir. İnokulasyon işleminden sonra, bakteri izolatları 26 °C'de 2 gün boyunca inkübasyona alınmıştır. İnokulasyon süresinin sonunda, CAS besiyerinde "sarı-turuncu" renkteki engelleme bölgeleri ve SMLBA besiyerinde "şeffaf" renkteki engelleme bölgeleri gözlemlenmiştir. Bu engelleme bölgeleri, test edilen bakterilerin siderofor ve proteolitik aktivitesi olduğunu göstermektedir. Engelleme bölgelerinin ve bakteri kolonilerinin çapları ayrı ayrı ölçülmüştür. Siderofor (Sid-indeks) ve proteolitik (Pro-indeks) etkinlik indeksleri, engelleme zon çapının bakteri koloni çapına oranlanmasıyla hesaplanmıştır (Vazquez ve ark., 2000). Her bir bakteri izolatu için ölçümler üç ayrı petri kabında gerçekleştirilmiş ve deneme iki farklı zamanda tekrarlanmıştır.

Bakteri İzolatlarının Fosfor Çözme Potansiyellerinin Belirlenmesi

Bakterilerin fosforu çözme yetenekleri Pikovskaya Agar (PVK) besi yerinde tri kalsiyum fosfat Ca₃(PO₄) bileşiğinin çözülme şiddetine göre petrilerde belirlenmiştir (Kumar ve ark., 2012). PVK besi yeri üzerine taze bakteri kültürlerinden steril kürdan ile alınıp 3 farklı noktaya aşılandıktan sonra, petriler 26 °C'de 7 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnokulasyondan 5 gün sonra bakteri izolatlarının geliştiği noktadaki kolonilerin etrafında gelişen şeffaf engelleme bölgeleri, test edilen bakteri izolatu fosforu çözme yeteneğinde olduğunu göstermiştir. Bakteri

izolatlarının fosfor çözme etkinliği, ölçülen zon çapının gelişen bakteri kolonisinin çapına oranlanması ile fosfor çözme İndeks değerleri (Fos-İndeks) belirlenmiştir (Vazquez ve ark., 2000). Söz konusu testlerde bakteri izolatu için ölçümler ve değerlendirmeler 3 ayrı petri içerisinde gerçekleştirilmiş olup, deneme 2 farklı zamanda tekrarlanmıştır.

Bakteri İzolatlarının İndol Asetik Asit (IAA) Üretme Potansiyellerinin Belirlenmesi

Bakterilerin IAA üretme yetenekleri Glickman ve Dessaux, (1995) tarafından tarif edildiği şekilde Salkowski yöntemi kullanılarak tespit edilmiştir. Seçilmiş bakteri izolatların 48 saatlik taze kültürlerinden bakteri süspansiyonu (10^8 hücre/ml) hazırlandıktan sonra, 500 µl hacmindeki süspansiyon L-tryptophan (3 mg ml^{-1}) içeren 5 ml steril LB besi yeri bulunan cam tüplere (10x120 mm) aşılanmıştır. Bakteri izolatlarının aşılandığı besi yeri içeren tüpler 26 °C ayarlı inkübatörlü orbital çalkalayıcı (200 rpm) üzerinde 4 gün süreyle tekrar inkübasyona bırakılmıştır. Tüplerdeki sıvı besi yerinde gelişen bakteri süspansiyonundan alınan 2 ml süspansiyon soğutmalı santrifüjde 5000 rpm'de 30 dak. santrifüj edilmiştir. Sonrasında, tüplerin üst kısmından alınan 1 ml süspansiyon steril eppendorf tüplere aktarılmış ve üzerlerine yaklaşık 40 µl fosforik asit eklenmiştir. Bu karışımın tamamı 2 ml Salkowski çözeltisi (150 ml %98'lik H_2SO_4 , 250 ml of distile H_2O , 7.5 ml of 0.5 M $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) içeren steril cam tüplere aktarılmıştır. Tüpler, inkübatörde 25 °C'de 30 dak. karanlıkta inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında süspansiyon renginin "açık sarı"dan "kırmızı-pembe" renge dönüşmesi, test edilen bakteri izolatının besiyeri içeriğinde IAA ürettiğini göstermiştir. Üretilen IAA miktarları UV-vis spektrofotometre (Perkin Elmer, Lamda 25, USA) cihazı ile 535 nm dalga boyunda ölçülmüştür (Patten & Glick, 2002). IAA miktarları standart IAA (Merck, Darmstadt, Germany) çözeltisi ile hazırlanan "standart konsantrasyon eğrisiyle" karşılaştırılmak suretiyle µg/ml (ppm) düzeyinde belirlenmiştir.

Bakteri İzolatlarının Amonyak (NH_3) Üretme Potansiyellerinin Belirlenmesi

Bakterilerin amonyak (NH_3) üretme etkinlikleri Cappuccino ve Sherman, (2013) tarafından bildirildiği şekilde Pepton Water (PW) besiyelerine Nessler's çözeltisi ilave edilmek suretiyle belirlenmiştir. İçerisinde steril 5 ml PW içeren cam tüplere steril öze yardımıyla 2 günlük taze test edilen bakteri izolatlarının kültüründen alınan bakteri kolonisi bulaştırılmıştır. İnokulasyonların yapıldığı tüpler 150 rpm'e ayarlı inkübatörlü orbital çalkalayıcıda 26 °C'de 4 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Bulaştırmaların yapıldığı tüplerde gelişen bakteri

süspansiyonlarından 1 ml alınmış, santrifüj (13000 rpm 5 dak) yapılarak süpernatant solusyonu elde edilmiştir. Elde edilen süpernatant solusyonu üzerine 50 µl hacminde Nessler's çözeltisi ilave edildikten hemen sonra (2-4 saniye) besi yeri içerisinde üretilen "amonyak" birikiminin olup olmadığı, tüplerdeki besi yeri renginin "açık sarı"dan "kahverengi veya koyu sarı" renge dönüşmesiyle kalitatif (gözlemler) olarak tespit edilmiştir.

Bakteri İzolatlarının Hidrojen Siyanür (HCN) Üretim Potansiyellerinin Belirlenmesi

Castric (1977) tarafından bildirildiği üzere, 4.4 gr/L glycine eklenmiş TSA besi yerinde gelişen bakteri hücreleri tarafından üretilen uçucu HCN bileşeni petri kapağında bulunan ve pikrik asit/sodyum karbonat ile ıslatılmış (%0.5 pikrik asit (PA) + 2% sodyum karbonat (Na_2CO_3): 100 ml steril su+0.5 gr PA+2 gr Na_2CO_3) filtre kâğıdı renginin sarı renkten kahverengi veya koyu kırmızıya dönüşmesiyle kalitatif olarak belirlenmiştir.

Bakteri İzolatlarının Uçucu Bileşen(ler)inin *in vitro* Antagonistik Etkinliğinin Belirlenmesi

Bakteri izolatları tarafından üretilen uçucu bileşen(ler)inin *in vitro* koşullarda antifungal etkinlikleri daha önceden bildirilmiş "kapalı ikili kültür (sealed plate)" testleri ile belirlenmiştir (Chaves-Lopez ve ark. 2015). Antagonist bakteri izolatu, içinde TSA besiyeri içeren petrilere çizilmiş, fungus izolatu (6 mm disk) ise içerisinde PDA besiyeri olan diğer petriye yerleştirilmiştir. Daha sonra her iki kapak birbirlerine bakacak şekilde kapatılmış, oluşan uçucu bileşenlerin ortamdan uzaklaşması engellemek amacıyla petri kapaklarının kenarları parafilm ile sarılmıştır. Kontrol uygulaması olarak TSA besiyeri üzerine herhangi bir bakteri izolatu çizilmemiş, PDA içeren petriye sadece fungus misel diski yerleştirilmiştir. Uygulama sonrası petrilere 25 °C de inkübasyona bırakılmıştır. Kontrol petrilere bulunan fungus PDA besi yeri üzerinde gelişimi tamamlandıktan sonra, fungal izolatların misel gelişimi (MGu) çapları ölçülmüş ve kontrol petrilere misel (MGk) gelişim çaplarına kıyaslanarak % engelleme oranları hesaplanmıştır. Her bakteri izolatu için ölçümler 3 ayrı petri kabında gerçekleştirilmiş olup, denemenin tekerrürü 2 farklı zamanda yapılmıştır.

Deneme Deseni ve İstatistik Analizler

Bakterilerin fungal etmenlere karşı *in vitro* antagonistik etkinlikleri ve etki mekanizmalarının belirlenmesi çalışmaları tesadüfi parseller deneme desenine göre kurulmuş, her bir uygulama için 3 tekerrür kullanılmıştır. Denemelerde elde edilen veriler, SPSS istatistik programı for Windows Version 17 (SPSS, 2008) kullanılarak tek yönlü varyans analizi

yapılmış ve uygulamalar arasındaki farklılıklar Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi ($P \leq 0.05$) ile analiz edilmiştir.

BULGULAR ve TARTIŞMA

Endofit ve Epifit Bakterilerin İzolasyonu

Hatay ilindeki turuncgil bahçelerinden, ağaçların sağlıklı toprak altı (kök, kök boğazı ve köklere yakın topraklar) ve toprak üstü (sürgün, yaprak ve meyve) aksamlarından, biyokontrol etkinlik çalışmalarında kullanılmak üzere toplamda 53 epifit ve 32 endofit olmak üzere 85 bakteri izolatu elde edilmiştir. Yapılan testler sonucunda bitkide ve insanda hastalık etmeni olmadığı sonucuna varılan 26 endofit, 45'i ise epifit olmak üzere toplam 71 aday bakteri izolatu elde edilmiştir. MALDI-TOF tanılama çalışmaları sonucunda indeks değeri 1.7 ve üzerinde olan toplam 71 bakteri izolattan, 51 izolat Gram-pozitif, 20 izolat ise Gram-negatif olarak belirlenmiştir. Tür düzeyinde kesin teşhisi yapılan ve literatüre göre insan/hayvan/gıda patojenleri olduğu tespit edilen (*Bordetella petrii*, *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp. ve *Staphylococcus* spp.) türlere ait izolatlar çalışmalara dahil edilmemiş olup, bu izolatlar dışında kalan 48 aday bakteri izolatları ile detaylı çalışmalar yapılmaya karar verilmiştir.

Endofit ve Epifit Bakterilerin Tanılanması

İzolasyon çalışmaları sonucunda bitki ve insan patojeni olmadığı belirlenen 48 adet bakteri izolatu elde edilmiştir. Elde edilen 48 izolatın MALDI TOF MS analizleri sonucunda 22 izolat *Bacillus* türü, 7 izolat *Lysinibacillus*, 3 izolat *Acinetobacter*, 2'şer izolat *Pseudomonas* ve *Kosakonia*, 1'er izolat *Burkholderia*, *Cronobacter*, *Curtobacterium*, *Enterobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Pantoea*, *Rahnella*, *Raoultella*, *Rhizobium*, *Siccibacter* ve *Staphylococcus* cinslerine ait olduğu belirlenmiştir.

Bakteri İzolatlarının *in vitro* Koşullarda Fungal Etmenlere Karşı Antagonistik Etkileri

Fungal hastalık etmenlerinin misel gelişimleri farklı antagonist bakteriler tarafından engellenme potansiyelleri *in vitro* ikili kültür testlerinde misel gelişim çapları ölçülerek belirlenmiş, elde edilen sonuçlar Çizelge 1 ve Şekil 1'de sunulmuştur. Test edilen fungal hastalık etmenlerinden *G. citri-aurantii*'nin misel gelişimini en yüksek düzeyde engelleyen izolatlar sırasıyla, %77.2 ile *B. vallismortis* YGL73ep, %76.6 ile *B. cereus* YGK25en, %73.3 ile *Pseudomonas chlororaphis* YGM82ep olarak belirlenmiştir (Şekil 2A). Antraknoz hastalık etmeni *C. gloeosporioides*'in misel gelişimini en yüksek düzeyde engelleyen izolatlar sırasıyla %72.7 ile *B. thuringiensis* YGT22en, %71.1 ile *B. vallismortis* YGL73ep ve *B. cereus* YGK25en, %65.56 ile *P.*

chlororaphis YGM82ep olarak belirlenmiştir (Şekil 1B). Bir diğer hastalık etmeni *F. solani*'nin misel gelişimini en yüksek düzeyde engelleyen izolatlar ise sırasıyla, %71.1 engelleme oranı ile *B. subtilis* YGS5en olduğu belirlenirken, bu izolatu %70.0 engelleme oranı ile *B. cereus* YGK25en ve %66.1 engelleme oranı ile *P. chlororaphis* YGM82ep izolatları izlemiştir (Şekil 2C). Misel gelişimini engellemede yüksek düzeyde etkinlik gösteren izolatlar arasında olduğu kadar aynı türe ait izolatların da misel gelişimini engellemesi arasında istatistiksel olarak önemli düzeylerde farklılıklar görülmüştür (Çizelge 1). Bu çalışmada kullanılan 3 farklı fungal etmene karşı ≥ 50 antagonistik etkinlik gösteren 11 endofit ve epifit bakteri izolat arasında Gram negatif *P. chlororaphis* YGM82ep dışında kalan bakteri izolatların tamamının Gram pozitif *Bacillus* spp. ait izolatlar olduğu belirlenmiştir. İzolatlar arasında *G. citri-aurantii* etmenine karşı > 50 antagonistik etkinlik gösteren toplam 21 izolattan 14 tanesi, *C. gloeosporioides*'e karşı toplam 17 izolattan 15 tanesinin, *F. solani*'ye karşı ise 17 izolattan 13 tanesinin benzer şekilde *Bacillus* spp. ait izolatlar olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 1).

Yapılan *in vitro* ikili kültür çalışmalarında antagonistik etkinliği yüksek olarak belirlenen *Bacillus cereus*, *B. mojavensis*, *B. vallismortis*, *B. subtilis*, ve *B. thuringiensis* gibi epifit ve endofit kökenli *Bacillus* spp. türlerinin antimikrobiyal etkinliğe sahip farklı bileşikler üretme potansiyeline sahip olmaları nedeniyle biyolojik mücadele çalışmalarında en fazla irdelenen bakteriyel türlerdir (Tariq ve ark., 2020). Soylu ve ark. (2022) tarafından yakın zamanda yapılan araştırmada, sağlıklı turuncgil ağaçlarından elde edilen 16 farklı bakteri izolatının *G. citri-aurantii*'nin misel gelişimin engellenmesi *in vitro* ikili kültür testleriyle ortaya konulmuştur. Test edilen bakteri izolatları arasında, *Bacillus* spp.'ye ait izolatların misel gelişimini %59.5 ile %78.6 aralığında engellerken, *B. subtilis* CM8 (%78.6) izolatu en yüksek antagonistik etkiyi gösteren izolat olarak belirlenmiştir. Chenniappan ve ark. (2019) tarafından yapılan çalışma ile zerdeçal bitkisinin kök ve rizomlarından izole edilen bakteriler 7 farklı rizom kök çürüklüğü hastalık etmeni olan *Rhizoctonia solani*, *Schizophyllum commune*, *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium graminearum* ve *F. solani*'ye karşı antagonistik etkinlikleri araştırılmıştır. Söz konusu fungal patojenlere karşı *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. tequilensis*, *B. cereus*, *B. subtilis* türlerine ait 16 izolatın değişen oranlarda antagonistik etkinlik gösterdikleri bildirilmiştir. Yapılan benzer çalışmalarda *Bacillus* spp. ait bazı izolatların *in vitro* ve *in vivo* koşullarda turuncgillerde depo hastalık etmenlerinden *P. digitatum*, *P. crustosum*, *P. italicum* ve *G. citri-aurantii*'ye karşı antifungal etkinlik gösterdiği bildirilmiştir (Hong ve ark., 2014; Chen ve ark., 2018; Tian ve ark., 2020).

Çizelge 1. Antagonist bakteri izolatlarının *in vitro* ikili kültür testlerinde 3 farklı fungal etmenin misel gelişimini (mm)^a engellemde gösterdikleri antagonistik etkinlikleri

Table 1. Antagonistic activity of antagonist bacterial isolates in inhibiting mycelial growth (mm)^a of 3 different fungal agents in *in vitro* dual culture tests

Bakteri İzolatu	Fungal etmenler					
	<i>G. citri-aurantii</i>		<i>C. gloesporioides</i>		<i>F. solani</i>	
	MG (mm)	MGE (%)	MG (mm)	MGE (%)	MG (mm)	MGE (%)
<i>Bacillus vallismortis</i> YGL73ep	13,67 ^{aA}	77,22	17,33 ^{abA}	71,12	26,00 ^{cFB}	56,67
<i>Bacillus cereus</i> YGK25en	14,00 ^{abA}	76,67	17,33 ^{abA}	71,12	18,00 ^{aA}	70,00
<i>Pseudomonas clororapsis</i> YGM82ep	16,00 ^{acA}	73,33	20,67 ^{bcB}	65,55	20,33 ^{abB}	66,12
<i>Bacillus cereus</i> YGK28ep	17,33 ^{b-dA}	71,12	26,33 ^{c-gB}	56,12	27,00 ^{d-gB}	55,00
<i>Bacillus cereus</i> YGM3ep	19,33 ^{c-eA}	67,78	25,33 ^{d-gB}	57,78	21,33 ^{a-eA}	64,45
<i>Bacillus cereus</i> YGS13ep	20,00 ^{d-fA}	66,67	24,00 ^{c-fA}	60,00	34,00 ^{j-IB}	43,33
<i>Bacillus cereus</i> YGK31en	22,00 ^{e-gA}	63,33	30,67 ^{h-jB}	48,88	31,33 ^{g-kB}	47,78
<i>Bacillus thuringiensis</i> YGT22en	22,00 ^{e-gB}	63,33	16,33 ^{aA}	72,78	28,33 ^{e-iC}	52,78
<i>Bacillus cereus</i> YGP6en	23,00 ^{f-hA}	61,67	21,00 ^{b-dA}	65,00	26,00 ^{c-fA}	56,67
<i>Rahnella aquatilis</i> YGP63ep	23,00 ^{f-hAB}	61,67	22,33 ^{c-eA}	62,78	25,33 ^{b-eB}	57,78
<i>Bacillus cereus</i> YGKL16ep	23,33 ^{f-hA}	61,12	26,00 ^{e-gB}	56,67	25,33 ^{b-eAB}	57,78
<i>Bacillus cereus</i> YGP1en	23,33 ^{f-hA}	61,12	25,33 ^{d-gA}	57,78	31,33 ^{g-kA}	47,78
<i>Bacillus mojaviensis</i> YGM15en	23,33 ^{f-hA}	61,12	25,67 ^{e-gB}	57,22	29,33 ^{e-jC}	51,12
<i>Burkholderia cepacia</i> YGM75ep	23,33 ^{f-hA}	61,12	33,33 ^{j-nB}	44,45	52,00 ^{prC}	13,33
<i>Bacillus mojaviensis</i> YGL69ep	24,67 ^{ghA}	58,88	30,67 ^{h-jB}	48,88	24,00 ^{b-eA}	60,00
<i>Acinetobacter johnsonii</i> YGM76en	25,00 ^{ghA}	58,33	35,67 ^{l-oB}	40,55	58,33 ^{tC}	2,78
<i>Bacillus simplex</i> YGS12ep	26,00 ^{hiA}	56,67	22,00 ^{c-eA}	63,33	35,33 ^{k-mB}	41,12
<i>Enterobacter xiangfangensis</i> YGM80ep	26,33 ^{hiA}	56,12	32,33 ^{i-mB}	46,12	32,00 ^{g-kB}	46,67
<i>Rhizobium radiobacter</i> YGM77ep	26,33 ^{hiA}	56,12	31,33 ^{h-lA}	47,78	49,33 ^{opB}	17,78
<i>Bacillus cereus</i> YGM9en	29,00 ^{ijA}	51,67	26,33 ^{e-gA}	56,12	21,00 ^{a-eA}	65,00
<i>Herbaspirillum aquaticum</i> YGM78ep	29,33 ^{k-A}	51,12	31,00 ^{h-kA}	48,33	59,67 ^{tB}	0,55
<i>Bacillus endophyticus</i> YGL74en	31,33 ^{j-lA}	47,78	33,33 ^{j-nA}	44,45	59,00 ^{tB}	1,67
<i>Klebsiella oxycota</i> YGP62en	31,67 ^{j-lA}	47,22	45,00 ^{prB}	25,00	32,67 ^{h-kA}	45,55
<i>Lysinibacillus sphaericus</i> YGM10en	32,67 ^{k-mA}	45,55	36,67 ^{m-oB}	38,88	53,00 ^{pr-sC}	11,67
<i>Bacillus subtilis</i> YGS5en	32,67 ^{k-mC}	45,55	27,33 ^{f-hB}	54,45	17,33 ^{aA}	71,12
<i>Lysinibacillus sphaericus</i> YGM4ep	33,00 ^{lmA}	45,00	35,00 ^{j-oA}	41,67	38,33 ^{l-nB}	36,12
<i>Bacillus safaeensis</i> YGM83ep	33,00 ^{lmB}	45,00	22,33 ^{c-eA}	62,78	55,67 ^{r-tC}	7,22
<i>Lysinibacillus sphaericus</i> YGS35ep	34,33 ^{l-nA}	42,78	34,00 ^{j-rO}	43,33	60,00 ^{tB}	0,00
<i>Lysinibacillus sphaericus</i> YGK24en	36,00 ^{m-oA}	40,00	34,00 ^{j-rO}	43,33	33,33 ^{i-lA}	44,45
<i>Lysinibacillus sphaericus</i> YGKL15en	37,00 ^{noA}	38,33	37,67 ^{noA}	37,22	40,00 ^{mnA}	33,33
<i>Lysinibacillus sphaericus</i> YGP4en	38,33 ^{oA}	36,12	50,00 ^{stB}	16,67	57,67 ^{stC}	3,88
<i>Kosakonia cowanii</i> YGP7en	38,33 ^{oB}	36,12	53,67 ^{tuC}	10,55	25,33 ^{b-eA}	57,78
<i>Pantoea agglomerans</i> YGM81ep	39,33 ^{oB}	34,45	37,67 ^{noB}	37,22	31,00 ^{f-kA}	48,33
<i>Lysinibacillus sphaericus</i> YGP3en	44,67 ^{pB}	25,55	47,33 ^{rsB}	21,12	28,67 ^{e-iA}	52,22
<i>Bacillus megaterium</i> YGT18ep	48,67 ^{rB}	18,88	38,00 ^{oA}	36,67	35,00 ^{klA}	41,67
<i>Pseudomonas koreensis</i> YGL72ep	48,67 ^{rB}	18,88	35,33 ^{k-oA}	41,12	36,00 ^{k-nA}	40,00
<i>Siccibacter colletis</i> YGP67ep	55,33 ^{sC}	7,78	42,67 ^{pB}	28,88	27,67 ^{e-hA}	53,88
<i>Bacillus megaterium</i> YGM12en	56,67 ^{stA}	5,55	49,67 ^{stA}	17,22	59,00 ^{tA}	1,67
<i>Bacillus megaterium</i> YGL68ep	56,67 ^{stB}	5,55	35,33 ^{koA}	41,12	59,33 ^{tC}	1,12
<i>Cronobacter sakazakii</i> YGKL12ep	57,00 ^{stB}	5,00	60,00 ^{vC}	0,00	40,67 ^{nA}	32,22
<i>Acinetobacter lwoffii</i> YGL60en	60,00 ^{stA}	0,00	59,33 ^{vA}	1,12	59,67 ^{tA}	0,55
<i>Raoultella ornithinolytica</i> YGP64en	60,00 ^{stA}	0,00	60,00 ^{vA}	0,00	59,33 ^{tA}	1,12
<i>Acinetobacter lwoffii</i> YGS37en	60,00 ^{stB}	0,00	43,67 ^{prA}	27,22	45,33 ^{oA}	24,45
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> YGS25en	60,00 ^{stB}	0,00	56,67 ^{uvA}	5,55	57,67 ^{stA}	3,88
<i>Kosakonia cowanii</i> YGKL17en	60,00 ^{stB}	0,00	60,00 ^{vB}	0,00	49,33 ^{opA}	17,78
<i>Staphylococcus succinus</i> YGL55ep	60,00 ^{stB}	0,00	51,67 ^{tA}	13,88	57,33 ^{stB}	4,45
<i>Bacillus megaterium</i> YGM5ep	60,00 ^{stC}	0,00	43,33 ^{prA}	27,78	51,67 ^{prB}	13,88
<i>Bacillus subtilis</i> YGS19ep	60,00 ^{stC}	0,00	28,67 ^{giB}	52,22	22,33 ^{adA}	62,78
Kontrol	60,00 ^x	0,00	60,00 ^v	0,00	60,00 ^z	0,00

MG:

Misel gelişimi (mm); MGE: Misel gelişiminin engellenme oranı (%)

^a Aynı sütun içerisinde yer alan misel gelişim çaplarının ortalama değerlerin yanındaki benzer küçük harfler ile aynı satır içerisinde yer alan ortalama değerlerin yanındaki benzer büyük harfler izolatlar arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığını gösterir (Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi, P<0.05). Koyu renkli olarak yazılmış izolatlar testlerde yüksek etkinlik gösteren izolatlardır



Şekil 2. Bakteri izolatlarının ikili kültür testlerinde *G. citri-aurantii* (A), *C. gloeosporioides* (B) ve *F. solani* (C) etmenlerinin misel gelişimlerinin engellenmesi üzerine antagonistik etkinlikleri
Figure 2. Antagonistic activities of bacterial isolates on inhibition of mycelial growth of *G. citri-aurantii* (A), *C. gloeosporioides* (B) and *F. solani* (C) in dual culture tests

Yapılan biyokimyasal ve moleküler analizlerde *Bacillus* spp. ve *Pseudomonas* spp. ait antagonist BCA izolatların fungal hastalık etmenlerine karşı antagonistik etkinliklerinin 2,4-diacetylphloroglucinol, pyrrolnitrin, pyoluteorin, bacillomycin D, fengycin, hydrogen cyanide, ve litik enzim gibi antifungal bileşiklerden kaynaklandığı belirlenmiştir (Tariq ve ark., 2020).

Bakterilerin Fungal Patojenin Misel Gelişimini Engellemede Rol Oyanayan (Antagonistik) Mekanizmaların Belirlenmesi

Siderofor üretim potansiyelleri: Siderofor üretimi CAS besi yeri kullanılarak belirlenmiştir. CAS besi yeri üzerinde bakteriler tarafından oluşturulan engelleme zonunun bakteri çapına oranlanmasıyla elde edilen siderofor etkinlik indeks değerlerine bakılmıştır (Şekil 2). Test edilen tüm izolatlar arasından en fazla siderofor üretimi 3.78 indeks değeri ile *Pseudomonas koreensis* YGL72ep tarafından gösterilmiş olup bu izolatı sırasıyla 2.33 ve 2.30 indeks değerleri ile sırasıyla *Pseudomonas koreensis* YGL72ep, *Bacillus simplex* YGS12ep ve *Burkholderia cepacia* YGM75ep izolatları izlemiştir (Çizelge 2; Şekil 3A).

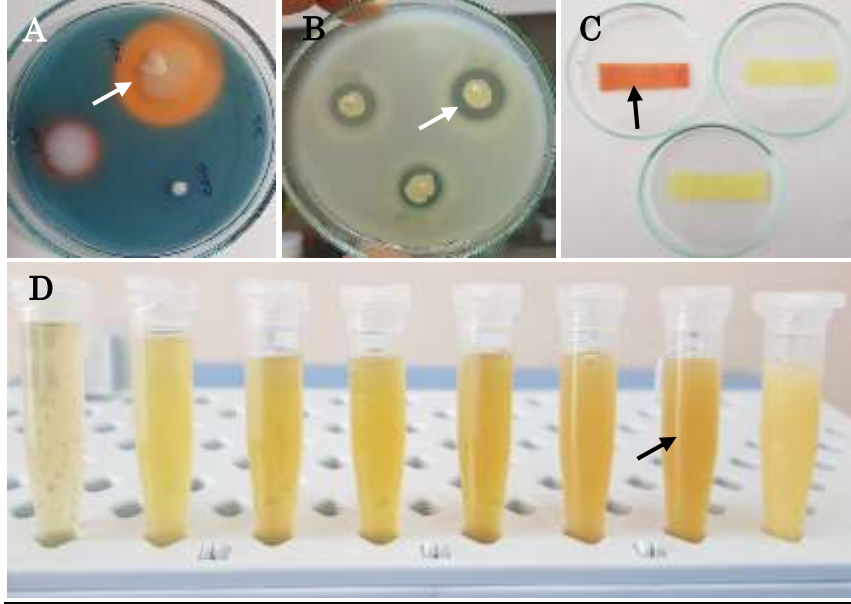
Proteaz üretim potansiyelleri: Mikolitik bir enzim olan proteaz, bazı biyokontrol etmeni antagonist bakteriler tarafından üretilebilen, fungal hastalık etmenlerinin hücre duvarı yapısında bozulmalara ve erimelere neden olan proteolitik enzimlerden biridir (Şekil 3B). Test edilen izolatlar arasında en yüksek proteaz aktivitesi 1.78 indeks değeri ile *Bacillus mojavensis* YGM15en izolatı tarafından gösterilmiştir. Bu izolatı sırasıyla 1.61 indek değeri ile *B. simplex* YGS12ep, 1.59 indeks değeri ile *B. cereus* YGM3ep izolatları takip edilmiştir (Çizelge 2; Şekil 3B).

Hidrojen siyanür (HCN) üretim potansiyelleri: Yapılan gözlemlere göre 25 izolat arasında sadece 5 izolatın değişen oranlarda HCN ürettiği belirlenmiştir. En yüksek HCN üretimi *Bacillus megaterium* YGT18ep tarafından üretilirken, bu izolatı *Pseudomonas chlororaphis* YGM82ep ile *Raoultella ornithinolytica* YGP64en izolatları izlemiştir. Bu bakterileri nispeten daha düşük HCN üretimine sahip olan *B. vallismortis* YGL73ep ve *P. koreensis* YGL72ep izolatları takip etmiştir. Aralarında yüksek oranda antagonistik etkinlik gösteren *B. cereus* YGM3ep ve *B. thuringiensis* YGT22en gibi birçok izolatın HCN üretme

potansiyelinin bulunmadığı tespit edilmiştir (Çizelge 2; Şekil 3C).

Amonyak üretim potansiyelleri: Yapılan gözlemlere göre test edilen 25 izolattan *Acinetobacter johnsonii* YGM76en dışında tamamı pepton içeren besiyerinde

değişen şiddetlerde amonyak üretmiştir. En yüksek amonyak üretimi *Burkholderia cepacia* YGM75ep izolatinca üretilirken, antagonistik etkiye sahip birçok türün yüksek oranlarda amonyak ürettiği tespit edilmiştir (Çizelge 2; Şekil 3D).



Şekil 3. Bakterilerin (A) CAS Agar üzerinde siderofor, (B) SMLBA besi yeri üzerinde protease enzim, (C) TSA besi yerinde hidrojen siyanür, (D) Pepton Water besi yerinde amonyak üretme etkinlikleri. Etkinlikler bakteri kolonisi etrafında ortaya çıkan zonlar (ok), filtre kâğıdının turuncuya, besi yerinin koyu sarı renge dönüşmesiyle (ok) karakterize edilmiştir.

Figure 3. Potential of bacteria to produce siderophore on CAS agar (A), protease enzyme on SMLBA medium (B), production of hydrogen cyanide on TSA medium (C), production of ammonia on Pepton Water medium. Efficiencies of bacterial isolates were evident as inhibition zone around bacterial colony (arrow), changes of colour on filter paper to orange, changes of colour of medium to dark yellow (arrow).

Bakterilerin Bitki Gelişimini Teşvik Etmede (PGP) Rol Oyanayan Mekanizmalarının Belirlenmesi

Fosfor çözme potansiyelleri: Bakteri izolatların PVK besiyeri üzerinde fosfor çözme etkinlikleri tüm izolatlar açısından değerlendirildiğinde Gram negatif bakteri izolatlarının Gram pozitif izolatlara oranla daha yüksek etkinlik gösterdiği belirlenmiştir. Test edilen izolatlar arasında en yüksek fosfor çözme etkinliği 2.57 fosfor çözme indeks değeri ile *Rahnella aquatilis* YGP63ep izolatı tarafından gösterilmiş olup, bu izolatı 2.50 indeks değeri ile *Raoultella ornithinolytica* YGP64en, 2.27 indeks değeri ile *Pseudomonas koreensis* YGL72ep izolatları izlemiştir (Çizelge 2; Şekil 4A). İkili kültür testlerinde yüksek antagonistik etkinliğe sahip olan *R. aquatilis* YGP63ep izolatının aynı zamanda yüksek düzeyde fosfor çözme yeteneğinde (2.57) olduğu belirlenmiştir. Diğer yandan *R. ornithinolytica* YGP64en izolatının ikili kültür testlerinde antagonistik etkinliğini çok düşük seviyede olmasına rağmen, fosfor çözme yeteneğinin yüksek düzeyde (2.27) olduğu belirlenmiştir. Bu durum antagonistik etkinliği yüksek olan tür/izolatların aynı anda bitki gelişimini teşvik etmede etkin olamayabileceğini göstermiştir (Çizelge 2; Şekil

4A). Kakao ağaçlarının kök bölgesinden izole edilen bakterilerin, kök çürüklüğü hastalığı etmeni olan *Phytophthora palmivora*'ya karşı antagonistik etkinlikleri araştırıldığı çalışmalarda, *Pseudomonas chlororaphis* olarak teşhisi yapılan 3 izolatın fungal etmene karşı yüksek antagonistik etkinlik gösterdiği, gösterilen antagonistik etkinliklerinin, siderofor ve HCN'den kaynaklandığı bildirilmiştir (Acebo-Guerrero ve ark., 2015). Ghazy ve ark., (2021) Mısır bitkisinde *Cephalosporium maydis*'in neden olduğu geç solgunluk hastalığına karşı PGP kök bakterilerinin potansiyelini araştırmışlardır. Altı izolatın (*Bacillus subtilis*, *B. circulance*, *B. coagulans*, *B. licheniformis*, *Pseudomonas fluorescens* ve *P. koreensis*) hem *in vitro* hem de *in vivo* koşullarda antagonistik etkinlikleri ile bakterilerin siderofor üretme potansiyelleri belirlemişlerdir. Sonuçta, en yüksek antagonistik etki ve siderofor üretimini yapan bakterilerin *B. subtilis* ve *P. koreensis* olduğunu bildirmişlerdir. Söz konusu çalışmada belirlenen *P. koreensis* izolatının siderofor üretiminin yüksek seviyede olması mevcut çalışmadaki sonuçları destekler nitelikte olmuştur.

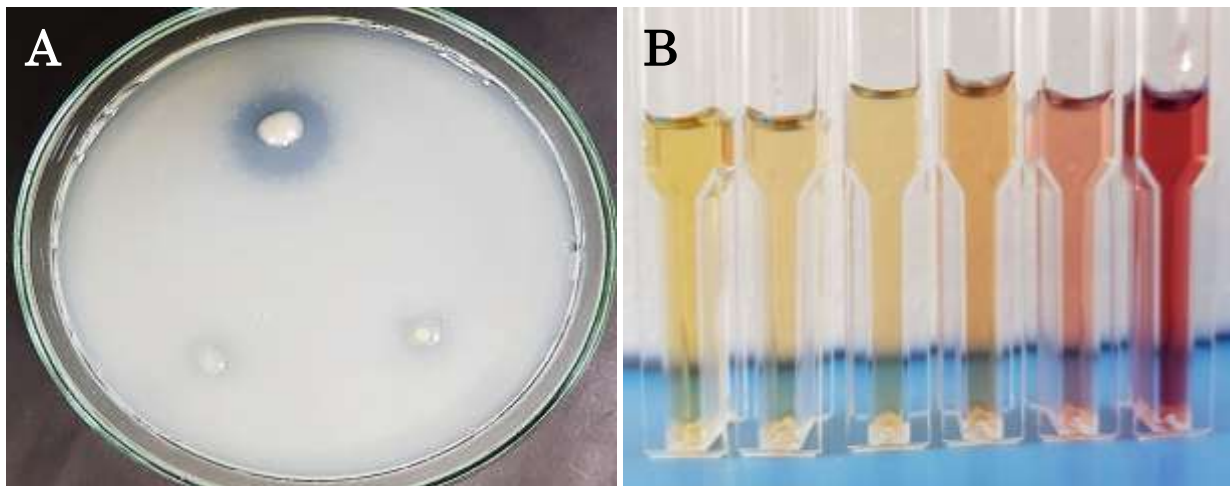
Çizelge 2. Seçilmiş antagonist bakteri izolatların fungal etmenlere karşı gösterdikleri olası biyokontrol ve bitki gelişimini teşvik eden etkinlik mekanizmalarının belirlenmesi^a

Table 2. Determination of possible mechanisms of biocontrol and plant growth promoting activities of selected antagonist bacterial isolates against fungal agents^a

Bakteri izolatı	Misel gelişimi engelleyici antagonist mekanizmalar				Bitki gelişimini teşvik eden mekanizmalar	
	Sid-İnd	Pro-İnd	HCN	NH ₃	Fosfor Çözme İndeksi	IAA (µg/ml)
<i>Pseudomonas koreensis</i> YGL72ep	3.78 ^g	1.23 ^{b-d}	+	+	2.27 ^c	69.68 ^o
<i>Bacillus simplex</i> YGS12ep	2.33 ^f	1.61 ^{f-g}	++	-	0.00 ^a	16.88 ^m
<i>Burkholderia cepacia</i> YGM75ep	2.30 ^f	1.09 ^b	+++	-	1.19 ^b	4.46 ^d
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> YGM82ep	2.15 ^f	1.31 ^{b-e}	++	++	0.00 ^a	49.83 ⁿ
<i>Raoultella ornithinolytica</i> YGP64en	1.73 ^{d-e}	1.51 ^{d-g}	++	++	2.50 ^d	0.01 ^a
<i>Lysinibacillus sphaericus</i> YGP3en	1.56 ^{c-e}	0.00 ^a	++	-	0.00 ^a	10.97 ^k
<i>Bacillus cereus</i> YGM3ep	1.55 ^{c-e}	1.59 ^{e-g}	+	-	0.00 ^a	10.51 ^{jk}
<i>Bacillus mojavensis</i> YGM15en	1.55 ^{c-e}	1.78 ^g	++	-	0.00 ^a	11.36 ^k
<i>Bacillus cereus</i> YGK25en	1.49 ^{b-d}	1.47 ^{c-f}	+	-	0.00 ^a	10.31 ^{jk}
<i>Bacillus megaterium</i> YGT18ep	1.45 ^{b-d}	1.22 ^{b-d}	+	+++	0.00 ^a	6.96 ^{sh}
<i>Rahnella aquatilis</i> YGP63ep	1.42 ^{b-d}	1.19 ^{b-c}	++	-	2.57 ^d	9.16 ^j
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> YGS25en	1.34 ^{b-d}	1.09 ^b	+	-	0.00 ^a	0.59 ^{ab}
<i>Rhizobium radiobacter</i> YGM77ep	1.24 ^{bc}	0.00 ^a	++	-	0.00 ^a	1.84 ^{bc}
<i>Pantoea agglomerans</i> YGM81ep	1.22 ^{b-c}	1.20 ^{b-c}	+	-	0.00 ^a	13.93 ^l
<i>Bacillus vallismortis</i> YGL73ep	1.20 ^{b-c}	1.08 ^b	++	+	0.00 ^a	2.39 ^c
<i>Bacillus subtilis</i> YGS5en	1.16 ^{b-c}	1.15 ^b	+	-	0.00 ^a	7.93 ^{hi}
<i>Staphylococcus succinus</i> YGL55ep	1.14 ^{b-c}	1.22 ^{b-d}	++	-	0.00 ^a	13.53 ^l
<i>Bacillus cereus</i> YGP1en	1.10 ^{b-c}	1.36 ^{b-f}	++	-	0.00 ^a	5.96 ^{e-g}
<i>Cronobacter sakazakii</i> YGKL12ep	1.05 ^b	0.00 ^a	++	-	1.09 ^b	7.46 ^h
<i>Acinetobacter johnsonii</i> YGM76en	0.00 ^a	0.00 ^a	-	-	0.00 ^a	5.38 ^{d-f}
<i>Acinetobacter lwoffii</i> YGS37en	0.00 ^a	0.00 ^a	+	-	0.00 ^a	7.73 ^{hi}
<i>Bacillus thuringiensis</i> YGT22en	0.00 ^a	1.47 ^{c-f}	++	-	0.00 ^a	6.75 ^{f-h}
<i>Klebsiella oxycota</i> YGP62en	0.00 ^a	0.00 ^a	+	-	0.00 ^a	4.87 ^{de}
<i>Siccibacter colletis</i> YGP67ep	0.00 ^a	0.00 ^a	++	-	1.14 ^b	1.45 ^{a-c}
<i>Kosakonia cowanii</i> YGP7en	1.93 ^{e-f}	1.13 ^b	++	-	1.16 ^b	0.02 ^a

Sid-İnd: Siderofor; **Pro-İnd:** Protease; **NH₃:** Amonyak; **HCN:** Hidrojen Siyanür; -, renk değişimi olmadığını, ±, +, ++, +++ ise HCN veya amonyak konsantrasyonunun artışına paralel renk değişim şiddetindeki artışı gösterir. Kalın olarak yazılmış izolatlar testlerde yüksek etkinlik gösteren izolatlardır.

^a Aynı sütun içerisinde yer alan ortalama değerlerin yanındaki aynı harfler izolatlar arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığını gösterir (Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi, P<0.05)



Şekil 4. Antagonist bakteri izolatlarının (A) PVK besi yerinde fosforu çözme, (B) L-tryptophane içeren LB besi yerinde IAA üretim potansiyelleri (ok).

Figure 4. Potentials of bacterial isolates to solubilise of phosphorus on PVK media (A) and production of IAA in LB medium containing L-tryptophane (arrow)

Gusain ve ark., (2015) Himalaya dağlarındaki yağmur ormanlarından izole ettikleri ve *Pseudomonas koreensis*, *Arthrobacter nitroguajacolicus* YB4 ve *Klebsiella oxytoca* olarak tanımladıkları bakteri izolatlarının fosforu çözme, IAA ve siderofor üretme potansiyellerinin belirlenmesine yönelik yaptıkları çalışmalarında, 4 izolatında yüksek düzeylerde siderofor ve IAA üretme yeteneğinde olduklarını, *P. koreensis*, *A. nitroguajacolicus* ve *K. oxytoca* izolatlarının fosforu çözme etkinliğinde bulunduğunu, 5 izolatın uygulandığı bitkilerde fosfor alımının arttığı, bitki biyokütlelerinde (yaş ve kuru ağırlık olarak) ciddi ağırlık artışlarının olduğu belirlenmiştir. Aralarında *P. chloropsis* ve *Pseudomonas* spp., ait izolatların fungal hastalık etmenlerinin misel gelişimlerini yüksek düzeyde engellediği, engellemede özellikle fenazin, HCN, siderofor ve IAA ürettikleri, ancak topraktaki bağlı fosforu çözmede etkili olmadıkları, fakat aralarından 5 izolatın toprakta bağlı çinkoyu çözebildiklerini böylece bitki gelişimini önemli düzeyde teşvik ettikleri bildirilmiştir (Shahid ve ark., 2017; Nandi ve ark., 2017). Türkiye’de farklı konukçu-patojen ilişkilerin irdelendiği benzer biyolojik mücadele çalışmalarında *Pseudomonas* ve *Bacillus* türlerine ait olan PGPB ve PGPR izolatlarının başta toprak kökenli olmak üzere bir çok önemli fungal hastalık etmenlerinin engellenmesinde ve bitki gelişimini teşvik etmede siderofor, proteaz, amonyak, HCN gibi antagonistik; fosforu çözme, IAA üretme gibi mekanizmalar ile etkili olduğuna yönelik çalışmalar bulunmaktadır (Soylu ve ark., 2005; Yıldız ve ark. 2012; İmriz ve ark., 2014; Atay ve ark., 2020; Aktan ve Soylu, 2020; Kara ve ark., 2020; Soylu ve ark., 2020; Soylu ve ark., 2021; Soylu ve ark., 2022; Kara ve Soylu, 2022).

Bakteri İzolatlarının Uçucu Bileşen(ler)inin *in vitro* Antagonistik Etkinliğinin Belirlenmesi

Bakteri izolatlarının uçucu bileşen(ler)inin *in vitro* antagonistik etkinliğinin belirlenmesine yönelik yapılan çalışmalarda ikili kültür testlerinde 3 farklı fungal etmene karşı “yüksek” etkinlik gösteren *B. cereus* YGK25en, *B. thuringiensis* YGT22en, *B. vallismortis* YGL73ep, ve *P. chlororaphis* YGM82ep izolatları ile çalışmalar yapılmıştır (Çizelge 3, Şekil 5). Yapılan kapalı ikili kültür test sonuçlarına göre 3 farklı fungal etmene karşı en yüksek antifungal etkinlik *P. chlororaphis* YGM82ep izolatı tarafından gösterilmiştir. *P. chlororaphis* YGM82ep izolatı tarafından üretilen uçucu bileşenler *G. citri-aurantii*, *C. gloeosporioides* ve *F. solani*’nin misel gelişimini sırasıyla %89.2, %82.6, %57.1 oranında engellediği belirlenmiştir. Test edilen *Bacillus thuringiensis* YGT22en izolatı ise *G. citri-aurantii*’nin misel gelişimini %77.7 gibi yüksek oranda engellediği gözlenmiştir (Şekil 5). Çizelge 3’de sunulan izolatların uçucu bileşenlerinin antagonistik etkinlikleri, Çizelge 2’de sunulan *in vitro* ikili kültür test sonuçlarıyla karşılaştırıldığında, *Pseudomonas chlororaphis* YGM82ep izolatının uçucu bileşenlerinin *G. citri-aurantii* ve *C. gloeosporioides*’e, *Bacillus thuringiensis* YGT22en izolatının uçucu bileşenlerinin *G. citri-aurantii*’ye, *Bacillus vallismortis* YGL73ep izolatının uçucu bileşenlerinin ise *F. solani*’ye karşı daha yüksek düzeylerde etkinlik gösterdiği tespit edilmiştir. Diğer izolatların uçucu bileşenlerinin antifungal etkinliklerinde *in vitro* ikili kültür test sonuçlarıyla kıyaslandığında daha düşük etkinlik göstermiştir (Çizelge 3).

Çizelge 3. Antagonist etkinliği yüksek izolatlar tarafından üretilen uçucu organik bileşenlerinin *in vitro* ikili kültür testlerinde fungal etmenlerin misel gelişiminin engellenmesi üzerine olan antifungal etkinlikleri
Table 3. Antifungal activity of volatile organic compounds produced by isolates with high antagonist activity on inhibition of mycelial growth of fungal agents in vitro dual culture tests

Antagonist bakteri izolatları	Fungal etmenler					
	<i>F. solani</i>		<i>G. citri-aurantii</i>		<i>C. gloeosporioides</i>	
	MG (mm)	MGE (%)	MG (mm)	MGE (%)	MG (mm)	MGE (%)
<i>Kontrol</i>	81.67 ^d	-	90.00 ^e		86.33 ^e	
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> YGM82ep	35.00 ^a	57.15 ^D	9.67 ^a	89.26 ^Y	15.00 ^a	82.63 ^Y
<i>Bacillus vallismortis</i> YGL73ep	34.33 ^a	57.97 ^Y	46.67 ^c	48.14 ^D	73.67 ^c	14.67 ^D
<i>Bacillus thuringiensis</i> YGT22en	60.00 ^c	26.54 ^D	20.00 ^b	77.78 ^Y	79.67 ^d	7.72 ^D
<i>Bacillus cereus</i> YGK25en	50.00 ^b	38.78 ^D	63.33 ^d	29.63 ^D	58.33 ^b	32.44 ^D

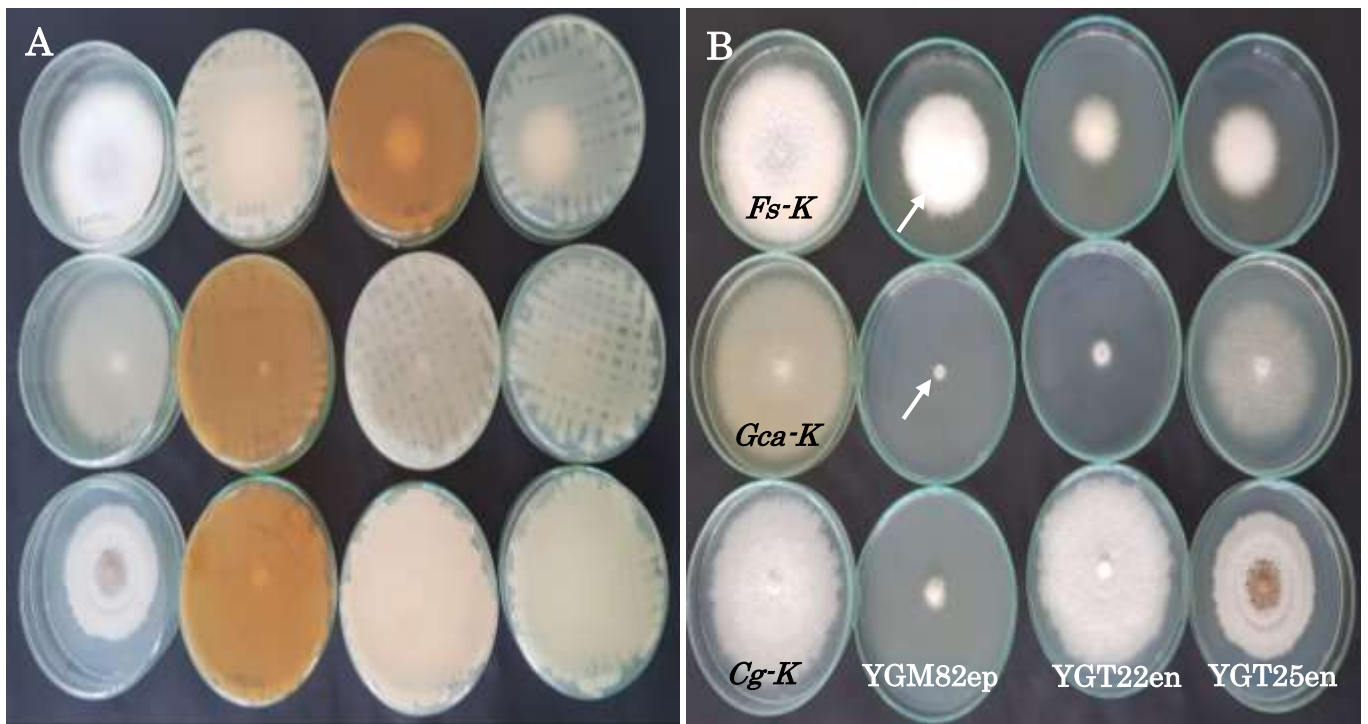
MG: Misel gelişimi (mm); MGE: Misel gelişiminin engellenme oranı (%)

Sütun içinde yer alan ortalama değerlerin yanındaki farklı küçük harfler uygulamalar arasındaki farkın istatistiksel olarak Duncan Çoklu Karşılaştırma testine göre önemli olduğunu gösterir (P<0.05).

D ve Y: Uçucu bileşen(ler)in antagonist etkinliğinin ikili kültür testlemesine göre daha düşük (D) veya daha yüksek (Y) düzeyde olduğunu gösterir.

Farklı *Pseudomonas* ve *Bacillus* türlerine ait antagonist bakteri izolatları tarafından besiyerlerine difüze olabilen (2,4-diacetylphloroglucinol, phenazine-1-carboxylic acid, phenazine-1-carboxamide, pyoluteorin, pyrrolnitrin, iturin, surfactin, fengycin vb.) antimikrobiyal etkinliğe sahip bileşenlerin yanısıra uçucu organik metabolitler (VOCs, Volatile Organic Compounds) üreterek patojen gelişimini engellediği/baskıladığına yönelik bir çok çalışma bulunmaktadır (Raio & Puopolo, 2021; Dimkic ve ark., 2022). Çalışmalarda etkili olarak belirlenen *P. chlororaphis* izolatının ürettiği oldukları 3-Methyl-1-butanol, Methanethiol, ve Butanediol gibi uçucu bileşenlerin sedir ağaçlarında fungal etmenlerden *S.*

cardinale, tatlı patatesten *Ceratocystis fimbriata*, tütün bitkisinde *E. caratovora*'ya karşı yüksek düzeyde antifungal ve antibakteriyel etkinlik gösterdiği, *Arabidopsis thaliana* bitkisinde ise kuraklığa karşı bitkinin dayanıklılığını artırdığı bildirilmiştir (Han ve ark., 2006; Cho ve ark., 2008; Zhang ve ark., 2019; Raio ve ark., 2020). Benzer şekilde, farklı *Bacillus* spp. ait antagonist izolatlar tarafından üretilen uçucu organik metabolitlerin yapılan *in vitro* ve *in vivo* testlerle farklı bitkilerinde hastalık etmeni olan *Fusarium* spp. karşı antifungal etkiye sahip oldukları bildirilmiştir (Khalaf ve Raizada, 2018; Baez-Vallejo ve ark., 2020; Toloza-Moreno ve ark., 2020; Ezrari ve ark., 2021).



Şekil 5. Farklı antagonist bakteri izolatların ait uçucu bileşenlerin fungal etmenlerin misel gelişimi üzerine antagonistik etkinlikleri. (A) Kapalı ikili kültür testinde üst petri kapağında bakteri, (B) alt kapaktaki besiyerinde uçucu bileşenlere maruz kalmış fungal etmenlerin misel gelişimi (ok).

Figure 5. Antagonistic activity of volatile components produced by different antagonist bacterial isolates on mycelial growth of fungal agents. Mycelial growth of fungal agents (arrow) exposed to bacterial isolates in the upper petri dish (A) and volatile components in the lower dish in a closed dual culture test (B).

SONUÇ ve ÖNERİLER

Sağlıklı turuncgil ağaçlarının kök, gövde, sürgün ve meyvelerinde izole edilen endofit ve epifit BCA izolatlarının *Colletotrichum gloeosporioides*, *Geotrichum citri-aurantii* ve *Fusarium solani*ye karşı antifungal etkinliğinin yanısıra, BCA izolatların antagonistik ve bitki gelişimini teşvik eden olası bazı mekanizmaları yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur. Test edilen bakteri izolatlarının sahip oldukları antagonistik ve bitki gelişimini teşvik eden mekanizmaları değerlendirildiğinde *Bacillus* ve bazı *Pseudomonas* spp. ait BCA izolatların oldukça etkili

olduğu görülmüştür. İzolatların test edildikleri mekanizmalardaki etkinlikleri türlere veya izolatlara bağlı değişiklik göstermiştir. Antagonistik etkinliği yüksek olan izolatların göstermiş oldukları biyoetkinliklerinde birden fazla antagonistik mekanizmaların rol oynadığı tespit edilmiştir. Gelecekte bitki hastalıklarıyla mücadelede biyopreparat ve/veya biyogübre olarak kullanılacak ticari tarımsal üründe yüksek etkinlik gösteren bu izolatların karışım halinde biyoformüle edilmesinin en uygun seçenek olduğu değerlendirilmiştir.

Araştırmacıların Katkı Oranı Beyan Özeti

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan eder.

Çıkar Çatışması Beyanı

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

Teşekkür

Bu çalışma Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından finansal olarak desteklenmiştir (Proje Numarası: 20.YL.022).

KAYNAKÇA

- Acebo-Guerrero, Y., Hernandez-Rodriguez, A., Vandeputte, O., Miguelez-Sierra, Y., Heydrich-Perez, M., Cornelis, P., Bertin, P. & El Jaziri, M. (2015). Characterization of *Pseudomonas chlororaphis* from *Theobroma cacao* L. rhizosphere with antagonistic activity against *Phytophthora palmivora* (Butler). *Journal of Applied Microbiology*, 119, 1112-1126. <https://doi.org/10.1111/jam.12910>
- Aktan, Z.C. & Soylu, S., (2020). Diyarbakır ilinde yetişen badem ağaçlarından endofit ve epifit bakteri türlerinin izolasyonu ve bitki gelişimini teşvik eden mekanizmalarının karakterizasyonu. *KSU Tarım ve Doğa Dergisi*, 23, 641-654. <https://doi.org/10.18016/ksutarimdog.vi.659802>
- Al-Sadi, A.M., Al-Ghaithi, A.G., Al-Fahdi, N. & Al-Yahyai, R. (2014). Characterization and pathogenicity of fungal pathogens associated with root diseases of citrus in Oman. *International Journal of Agriculture and Biology*, 16, 371-376.
- Atay, M., Kara, M., Uysal, A., Soylu, S., Kurt, Ş. & Soylu, E.M. (2020). *In vitro* antifungal activities of endophytic bacterial isolates against postharvest heart rot disease agent *Alternaria alternata* in pomegranate fruits. *Acta Horticulturae*, 1289, 309-314. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2020.1289.44>
- Baez-Vallejo, N., Camarena-Pozos, D.A., Monribot-Villanueva, J.L., Ramirez-Vazquez, M., Carrion-Villarnovo, G.L., Guerrero-Analco, J.A., Partida-Martinez, L.P. & Reverchon, F., (2020). Forest tree associated bacteria for potential biological control of *Fusarium solani* and of *Fusarium kuroshium*, causal agent of Fusarium dieback. *Microbiological Research*, 235, 126440.
- Bueno, C.J., Fischer I.H., Rosa, D.D., Firmino, A.C., Harakava, R., Oliveira, C.M.G. & Furtado, E.L. (2014). *Fusarium solani* f. sp. *passiflorae*: a new forma specialis causing collar rot in yellow passion fruit. *Plant Pathology*, 63, 382-389. <https://doi.org/10.1111/ppa.12098>
- Cappuccino, J.C. and Sherman, N., 2013. In: *Microbiology: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Benjamin Cummings Pub. Co, New York, pp. 125-179.
- Castric, P.A. (1977). Glycine metabolism by *Pseudomonas aeruginosa*: hydrogen cyanide biosynthesis. *Journal of Bacteriology*, 130, 826-831. <https://doi.org/10.1128/jb.130.2.826-831.1977>
- Chaves-Lopez, C., Serio, A., Ginotti, G., Sacchetti, G., Ndagijimana, M., Ciccarane, C., Stellarini, A., Corsetti, A. & Paparella, A. (2015). Diversity of food-borne *Bacillus* volatile compounds and influence on fungal growth. *Journal of Applied Microbiology*, 119, 487-499. <https://doi.org/10.1111/jam.12847>
- Chen, K., Tian, Z., Luo, Y., Cheng, Y. & Long, C., (2018). Antagonistic activity and the mechanism of *Bacillus amyloliquefaciens* dh-4 against citrus green mold. *Phytopathology*, 108, 1253-1262.
- Chenniappan, C., Narayanasamy, M., Daniel, G.M., Ramaraj, G.B., Ponnusamy, P., Sekar, J. & Ramalingam, P.V. (2019). Biocontrol efficiency of native plant growth promoting rhizobacteria against rhizome rot disease of turmeric. *Biological Control*, 129, 55-64. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.07.002>
- Cho, S.M., Kang, B.R., Han, S.H., Anderson, A.J., Park, J.Y., Lee, Y.H., Cho, B.H., Yang, K.Y., Ryu, C.M. & Kim, Y.C., (2008). 2R, 3R-butanediol, a bacterial volatile produced by *Pseudomonas chlororaphis* O6, is involved in induction of systemic tolerance to drought in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21(8), 1067-1075.
- Dimkic, I., Janakiev, T., Petrovic, M., Degrassi, G. & Fira, D. (2022). Plant-associated *Bacillus* and *Pseudomonas* antimicrobial activities in plant disease suppression via biological control mechanisms-A review. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 117, 101754. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.07.002>
- Duman, K. & Soylu, S. (2019). Characterization of plant growth-promoting traits and antagonistic potentials of endophytic bacteria from bean plants against *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Bitki Koruma Bülteni*, 59, 59-69. <https://doi.org/10.16955/bitkorb.597214>
- Ezrari, S., Mhidra, O., Radouane, N., Tahiri, A., Polizzi, G., Lazraq, A. & Lahlali, R., (2021). Potential role of rhizobacteria isolated from citrus rhizosphere for biological control of citrus dry root rot. *Plants-Basel*, 10, 872.
- FAO (2021). FAOSTAT, Word Production Data. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize> (Erişim Tarihi: 25.03.2024)
- Ghazy & N. & El-Nahrawy, S. (2021). Siderophore production by *Bacillus subtilis* MF497446 and *Pseudomonas koreensis* MG209738 and their efficacy in controlling *Cephalosporium maydis* in

- maize plant. *Archives of Microbiology*, 203, 1195–1209. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-02113-5>
- Glickman, E. & Dessaux, Y. (1995). A critical evaluation of the specificity of salkowski reagent for indole compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 793–796. <https://doi.org/10.1128/aem.61.2.793-796.1995>
- Guarnaccia, V., Groenewald, J.Z., Polizzi, G. & Crous, P.W. (2017). High species diversity in *Colletotrichum* associated with citrus diseases in Europe. *Persoonia*, 39, 32-50. <https://doi.org/10.3767/persoonia.2017.39.02>
- Gusain, Y.S., Kamal, R., Mehta, C.M., Singh, U.S. & Sharma, A.K. (2015). Phosphate solubilizing and indole-3-acetic acid producing bacteria from the soil of Garhwal Himalaya aimed to improve the growth of rice. *Journal of Environmental Biology*, 36, 301-307.
- Güney, İ.G., Tekin, F., Günen, T.U., Özer, G. & Derviş, S. (2023). *Alternaria alternata* causing inner black rot of lemon (*Citrus limon*) fruits in Turkey: Genetic diversity and characterisation. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 125, 101998. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2023.101998>
- Han, S.H, Lee SJ, Moon JH, Park KH, Yang KY, Cho BH, Kim KY, Kim YW, Lee MC, Anderson AJ & Kim YC., (2006). GacS-dependent production of 2R, 3R-butanediol by *Pseudomonas chlororaphis* O6 is a major determinant for eliciting systemic resistance against *Erwinia carotovora* but not against *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* in tobacco. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19, 924–930.
- Hong, P., Hao, W.N., Luo, J.J., Chen, S.H., Hu, M.Y. & Zhong, G.H., (2014). Combination of hot water, *Bacillus amyloliquefaciens* HF-01 and sodium bicarbonate treatments to control postharvest decay of mandarin fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 88, 96-102.
- İmriz, G., Özdemir, F., Topal, İ., Ercan, B., Taş, M. N., Yakışır, E. & Okur, O. (2014). Bitkisel üretimde bitki gelişimini teşvik eden rizobakteri (PGPR)'ler ve etki mekanizmaları. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi*, 12(2), 1-19.
- Kara, M. & Soylu, E.M. (2020). Assessment of glucosinolate-derived isothiocyanates as potential natural antifungal compounds against citrus sour rot disease agent *Geotrichum citri-aurantii*. *Journal of Plant Pathology*, 168 (5), 279-289. <https://doi.org/10.1111/jph.12889>
- Kara, M., Soylu, S., (2022). Isolation of endophytic bacterial isolates from healthy banana trees and determination of their *in vitro* antagonistic activities against crown rot disease agent *Fusarium verticillioides*. *Mustafa Kemal Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 27(1), 36-46. <https://doi.org/10.37908/mkutbd.1021349>
- Kara, M., Soylu, S., Kurt, Ş., Soylu, E.M. & Uysal, A. (2020). Determination of antagonistic traits of bacterial isolates obtained from apricot against green fruit rot disease agent *Sclerotinia sclerotiorum*. *Acta Horticulturae*, 1290, 135-142. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2020.1290.25>
- Kara, M., Soylu, S., Soylu, E.M., Uysal, A., Kurt, Ş., & Türkmen, M. (2024). Determination of the antifungal activity of wood vinegar (pyroligneous acid) against the onion bulb rot disease agent *Fusarium proliferatum*, chemical composition and its effect on the bacterial community in the soil. *Gesunde Pflanzen*, 76, 75-85. <https://doi.org/10.1007/s10343-023-00931-3>
- Khalaf, E.M. & Raizada, M.N., (2018). Bacterial seed endophytes of domesticated cucurbits antagonize fungal and oomycete pathogens including powdery mildew. *Frontiers in Microbiology*, 9, 42. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00042>
- Krasnov, H., Ezra, D., Bahri, B.A., Cacciola, S.O., Meparishvili, G. & Migheli, Q. & Blank. L. (2023). Potential distribution of the citrus Mal Secco disease in the Mediterranean basin under current and future climate conditions. *Plant Pathology*, 72, 765–773. <https://doi.org/10.1111/ppa.13692>
- Kumar, P., Dubey, R.C. & Maheshwari, D.K. (2012). *Bacillus* strains isolated from rhizosphere showed plant growth promoting and antagonistic activity against phytopathogens. *Microbiological Research*, 167, 493–499. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2012.05.002>
- Kurbetli, İ., Sülü, G., Aydoğdu, M., Özdemir, M., Sülü, S.M. & Polat, İ. (2016). First Report of Kumquat Shoot Blight Caused by *Phytophthora citrophthora* in Turkey. *Plant Disease*, 100(5), 1023-1023. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-15-1154-PDN>
- Kurt, Ş., Uysal, A., Soylu, E.M., Kara, M. & Soylu S. (2020). Characterization and pathogenicity of *Fusarium solani* associated with dry root rot of citrus in the eastern Mediterranean region of Turkey. *Journal of General Plant Pathology*, 86 (4), 326-332. <https://doi.org/10.1007/s10327-020-00922-6>
- Lelliot, R.A. & Stead, D.E. (1987). Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. (T.F. Preece, Editör). In: *Methods in Plant Pathology*, Black well Scientific Publications, Oxford, pp.176-177.
- Leslie, J.F. & Summerell B.A. (2006). *The Fusarium laboratory manual*. Blackwell Publishing, Ames, IA, USA. 388p.
- Nandi, M., Selin, C., Brawerman, G., Fernando, W.G.D. & de Kievit, T. (2017). Hydrogen cyanide, which contributes to *Pseudomonas chlororaphis* strain PA23 biocontrol, is upregulated in the presence of glycine. *Biological Control*, 108, 47-54.
- Patten, C.L. & Glick, B.R. (2002). Role of *Pseudomonas putida* indole acetic acid in development of the host

- plant root system. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 3795-3801. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.8.3795-3801.2002>
- Perneel, M., Heyrman, J., Adiobo, A., De Maeyer, K., Raaijmakers, J. M., De Vos, P. & Höfte, M. (2007). Characterization of CMR5c and CMR12a, novel fluorescent *Pseudomonas* strains from the cocoyam rhizosphere with biocontrol activity. *Journal of Applied Microbiology*, 103, 1007-1020. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03345.x>
- Raio, A. & Puopolo, G. (2021). *Pseudomonas chlororaphis* metabolites as biocontrol promoters of plant health and improved crop yield. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 37(6), 99. <https://doi.org/10.1007/s11274-021-03063-w>
- Raio, A., Brilli, F., Baraldi, R., Neri, L. & Puopolo, G. (2020). Impact of spontaneous mutations on physiological traits and biocontrol activity of *Pseudomonas chlororaphis* M71. *Microbiological Research*, 239, 126517.
- Schwyn, B. & Neilands, J.B. (1987). Universal chemical assay for detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry*, 160, 47-56. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90612-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90612-9)
- Shahid, I., Rizwan, M., Baig, D.N., Saleem, R.S., Malik, K.A., & Mehnaz, S. (2017). Secondary metabolites production and plant growth promotion by *Pseudomonas chlororaphis* and *P. aurantiaca* strains isolated from cactus, cotton, and para grass. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27, 480-491.
- Shivas, R.G., Tan, Y.P., Edwards, J., Dinh, Q., Maxwell, A., Andjic, V., Liberato, J.R., Anderson, C., Beasley & D.R., Bransgrove, K. (2016). *Colletotrichum* Species in Australia. *Australasian Plant Pathology*, 45, 447-464. <https://doi.org/10.1007/s13313-016-0443-2>
- Soliman, K. M. & Badeaa, R. I. (2002). Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. *Food and Chemical Toxicology*, 40(11), 1669-1675. [https://doi.org/10.1016/s0278-6915\(02\)00120-5](https://doi.org/10.1016/s0278-6915(02)00120-5)
- Soylu, E.M., Soyly, S., Kara, M. & Kurt, Ş. (2020). Sebzelelerde sorun olan önemli bitki fungal hastalık etmenlerine karşı verimkomposttan izole edilen mikrobiyomların *in vitro* antagonistik etkilerinin belirlenmesi. *KSU Tarım ve Doğa Dergisi*, 23, 7-18. <https://doi.org/10.18016/ksutarimdog.vi.601936>
- Soylu, S., Kara, M., Soyly, E.M., Uysal, A. & Kurt, Ş. (2022). *Geotrichum citri-aurantii*'nin sebep olduğu turuncgil ekşi çürüklük hastalığının biyolojik mücadelesinde endofit bakterilerin biyokontrol potansiyellerinin belirlenmesi. *Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 19, 177-191. <https://doi.org/10.33462/jotaf.944704>
- Soylu, S., Kara, M., Uysal, A., Kurt, Ş. & Soyly, E.M. (2021). Determination of antagonistic potential of endophytic bacteria isolated from lettuce against lettuce white mould disease caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Zemdirbyste-Agriculture*, 108, 303-312. <https://doi.org/10.13080/z-a.2021.108.039>
- Soylu, S., Soyly, E.M., Kurt, Ş. & Ekici, Ö.K. (2005). Antagonistic potentials of rhizosphere-associated bacterial isolates against soil-borne diseases of tomato and pepper caused by *Sclerotinia sclerotiorum* and *Rhizoctonia solani*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 8, 43-48.
- SPSS (2008). SPSS Statistics for Windows, Version 17.0. Chicago: SPSS Inc.
- Sturz, A.V., Christie, B.R. & Nowak, J. (2000). Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable systems of crop production. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 19(1), 1-30. <https://doi.org/10.1080/07352680091139169>
- Tariq, M., Khan, A., Asif, M., Khan, F., Ansari, T., Shariq, M. & Siddiqui, M.A. (2020). Biological control: a sustainable and practical approach for plant disease management. *Acta Agriculturae Scandinavica Section B-Soil and Plant Science*, 70, 507-524.
- Tekiner, N., Tozlu, E., & Kotan, R. (2019). Portakalda Antraknoz Hastalığı Etmeni *Colletotrichum gloeosporioides*'in Biyolojik Mücadele İmkanlarının Araştırılması. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 50(3), 282-291. <https://doi.org/10.17097/ataunizfd.544964>
- Tian, D. D., Zhou, W., Li, C. S., Wei, D., Qin, L. Y., Huang, S. M., Wei, L.P., Long, S. F., He, Z. F., & Wei, S. L. 2020. Isolation and identification of lipopeptide antibiotic produced by *Bacillus amyloliquefaciens* GKT04 antagonistic to banana Fusarium wilt. *Journal of South China Agricultural University*, 51, 1122-1127.
- Tolozza-Moreno, D.L., Lizarazo-Forero, L.M. & Uribe-Velez, D., (2020). Antagonist capacity of bacteria isolated from cape gooseberry cultures (*Physalis peruviana* L.) for biological control of *Fusarium oxysporum*. *Tropical Plant Pathology*, 45, 1-12.
- Uysal, A. and Kurt, Ş., 2019. First report of *Colletotrichum karstii* causing anthracnose on citrus in the Mediterranean region of Turkey. *Journal of Plant Pathology*, 101, 753. <https://doi.org/10.1007/s42161-018-00215-0>
- Uysal, A., Kurt, Ş. & Guarnaccia, V. (2022). Distribution and characterization of *Colletotrichum* species associated with Citrus anthracnose in eastern Mediterranean region of Turkey. *European Journal of Plant Pathology*, 163, 125-141. <https://doi.org/10.1007/s10658-022-02462-5>
- Vazquez, P., Holguin, G., Puente, M.E., Lopez-Cortes, A. & Bashan, Y. (2000). Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. *Biology and Fertility of Soils*, 30, 460-468. <https://doi.org/10.1007/s003740050024>

- Wang, W., de Silva, D.D., Moslemi, A., Edwards, J., Ades, P.K., Crous, P.W. & Taylor, P.W.J. (2021). *Colletotrichum* species causing anthracnose of citrus in Australia. *Journal of Fungi*, 7, 47. <https://doi.org/10.3390/jof7010047>
- Yaseen, T. & D'Onghia, A.M. (2012). *Fusarium* spp. associated to citrus dry root rot: an emerging issue for Mediterranean citriculture. *ISHS Acta Horticulturae*, 940, 647-655. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2012.940.89>
- Yıldız, H.N., Altınok, H.H. & Dikilitas, M. (2012). Screening of rhizobacteria against *Fusarium oxysporum* f.sp. *melongenae*, the causal agent of wilt disease of eggplant. *African Journal of Microbiol. Research*, 6 (15), 3700-3706. <https://doi.org/10.5897/AJMR12.307>
- Zhang, Y., Li, T., Liu, Y., Li, X., Zhang, C., Feng, Z., Peng, X., Li, Z., Qin, S. & Xing, K., (2019). Volatile organic compounds produced by *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens* SPS-41 as biological fumigants to control *Ceratocystis fimbriata* in postharvest sweet potatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(13), 3702–3710. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b00289>