



Araştırma Makalesi

Tohuma Uygulanan Bakteriyel Antagonistlerin Biberde Bakteriyel Leke Hastalığına Etkisi

İrem Buse TÜMEN¹, Benian Pınar AKTEPE², Yeşim AYSAN^{1*}

ÖZ

Xanthomonas euvesicatori'nin neden olduğu Bakteriyel Leke Hastalığı biberde önemli verim kayıplarına neden olmaktadır. Bu çalışmada biber tohumlarına uygulanan yerel antagonist bakteriyel izolatların hastalığın biyolojik mücadelesinde kullanılma potansiyeli araştırılmıştır. Yedi farklı ilden yapılan izolasyonlarda 488 aday antagonist bakteri izolatları saflaştırılmıştır. Bu aday antagonistlerin *in vitro* denemeleriyle 9 adeti *in vitro* ikili kültür testinde besi yeri üzerinde 3.0-9.0 mm arasında engelleme zonu oluşturmuştur. Bu antagonistlerin uygulandığı tohumlarda, yedi yerel antagonistik bakteri izolatının fidelerdeki hastalık şiddetini %29-84 oranında azalttığı belirlenmiştir. Bakteri izolatlarının uygulandığı tohumlarda çimlenme oranları incelendiğinde, YL 4-3 ve Suruç 6-1 kodlu iki farklı izolatın başarılı olduğu belirlenmiştir. Tanı çalışmalarına göre YL 4-3 kodlu izolat *Bacillus subtilis* ve Suruç 6-1 kodlu izolat *Bacillus amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* olarak belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Biber, *Xanthomonas euvesicatoria*, Antagonist, *Bacillus* spp., Biyolojik Tohum Uygulamaları

Effect of Bacterial Antagonists Applied to Seed on Bacterial Spot Disease in Pepper

ABSTRACT

Bacterial Spot Disease caused by *Xanthomonas euvesicatoria* causes significant yield losses in pepper. In this study, the effect of seed applications on the biological control of the disease was investigated by using local bacterial antagonists. A total of 488 bacterial colonies were purified from isolations from seven different provinces. By *in vitro* dual culture test studies, 9 different isolates formed inhibition zones between 3.0 and 9.0 mm. When the biological seed treatments with 9 local antagonists were applied to pepper seeds, seven local antagonistic isolates reduced the disease severity in seedlings by 29-84%. When the effect of these applications on seed germination was also examined, it was determined that the YL 4-3 and Suruç 6-1 strain were successful. According to diagnostic studies, YL 4-3 and Suruç 6-1 isolates were determined as *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens* ssp. *plantarum*, respectively.

Keywords: Pepper, *Xanthomonas euvesicatoria*, Antagonist, *Bacillus* spp., Biological Seed Treatments

ORCID ID (Yazar sırasına göre)

0000-0002-4004-2796, 0000-0002-4731-9954, 0000-0003-2647-5111

Yayın Kuruluna Geliş Tarihi: 05.10.2022

Kabul Tarihi: 27.12.2022

¹ Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Sarıçam, Adana

² Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi, Kadirli Uygulamalı Bilimler Fakültesi, Organik Tarım İşletmeciliği Bölümü, Kadirli, Osmaniye

*E-posta: aysanys@gmail.com

Tohuma Uygulanan Bakteriyel Antagonistlerin Biberde Bakteriyel Leke Hastalığına Etkisi

Giriş

Solanaceae familyasına ait olan biber (*Capsicum annuum* L.), sebze olarak tüketilen önemli bir kültür bitkisidir. Türkiye’de üretimi en çok yapılan sebzelerden biri olan biber Tarım Orman Bakanlığı’nın verilerine göre 2021 yılında 3.091.295 ton üretilmiştir (Anonim, 2022). Farklı *Xanthomonas* türleri (*Xanthomonas vesicatoria*, *X. euvesicatoria*, *X. gardneri*, *X. perforans*) tarafından neden olunan Bakteriyel Leke Hastalığı ülkemiz için önemli gelir ve besin kaynağı olan domates ve biberin önemli bakteriyel hastalıklarından biridir. Domates ve biber yetiştiriciliğinin yapıldığı pek çok ülkede bu hastalık sıklıkla görülüp verim ve kalite kaybına neden olmaktadır (Aysan ve Şahin, 2003). Hastalık belirtileri öncelikle yapraklarda küçük, etrafı sarı bir hale ile çevrili lekeler şeklinde görülmektedir, daha sonra lekeler birleşerek merkezde kahverengimsi siyah şekilde genel bir sarılık meydana gelir. Gövde üzerinde ise derin çatlaklar oluşturur. Meyvelerdeki lekeler başlangıçta küçük ve kabarıktır, daha sonra kahverengileşerek siğilimsi bir görünüm alır ve meyve şeklinde bozukluklara neden olur. Bakteriyel Leke Hastalığı bitki büyümesini yavaşlatarak meyvede verim ve kaliteyi düşürür, ayrıca tohumda da zarar meydana getirir (Aysan ve ark., 2019). Hastalık, tohum ve toprak kökenli olmasından dolayı tohumda, çevrede kendiliğinden büyüyen konukçu bitkiler üzerinde, patlıcangiller familyasından yabancı otlarda, bitki artıklarında ve toprakta canlılığını bir sonraki mevsime kadar sürdürebilmektedir. Kimyasal mücadele de kullanılan bakır ve bakır içeren bileşikler, hastalığı 20 yıldan fazla bir süredir kontrol etmek için rutin olarak uygulanmaktadır. Patojenin bu kimyasallara karşı direnç geliştirme sorunu nedeniyle kimyasal mücadele uygulaması zorlaşmaktadır. *Xanthomonas* için bakır bileşiklerine karşı direnç sorunu, Meksika’da (Adaskaveg ve Hine, 1984), ABD’de (Ritchie ve Dittapongpitch 1991) ve ülkemizde (Mirik ve ark., 2007) de rapor edilmiştir. Özellikle bakıra direnç geliştirmiş *Xanthomonas* popülasyonu ile mücadelede, antagonist mikroorganizmaları kullanarak biyolojik mücadele olanakları ve

kültürel önlemleri içeren entegre hastalık yönetimi oldukça önemlidir (Stall, 1993; Kotan, 1998; Tokmak, 2020; Kayaaslan, 2021).

Bu çalışmada *Xanthomonas euvesicatoria*’nın neden olduğu biberde Bakteriyel Leke Hastalığı’nın mücadelesinde antagonist bakteri izolatlarının biyolojik mücadele etmeni olarak kullanılma potansiyellerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Yöntem

Çukurova Üniversitesi Bitki Koruma Bölümü Bakteriyoloji Laboratuvarı kültür koleksiyonunda bulunan daha önce yapılan çalışmalar kapsamında geleneksel testler ve moleküler testlere göre *Xanthomonas euvesicatoria* olarak tanılanan YA-611 kodlu biber izolatı (Horuz ve ark., 2019) patojen bakteri izolatı olarak kullanılmıştır. Patojenite çalışmasında Yalçın F1 çeşidi 3-5 yapraklı dönemdeki biber fideleri kullanılmıştır. Tohum denemelerinde ise kimyasal uygulanmamış yöresel bir çeşit olan Karaisalı Salçalık çeşidine ait standart biber tohumu kullanılmıştır.

Yaprak Lekesine Neden Olan *Xanthomonas euvesicatoria* İzolatının Virülensliğinin Artırılması

Oda sıcaklığında, steril vida kapaklı tüplerde %0.85’lik NaCl içerisinde saklanan YA-611 kodlu *Xanthomonas euvesicatoria* izolatı Tryptic Soy Agar (TSA) besi yerinde 28°C’de 48 saat inkübe edilerek geliştirilmiştir. Uzun süre oda sıcaklığında saklanan *Xanthomonas euvesicatoria* izolatının virülensliğinde artış sağlamak için söz konusu olan bakteriyel etmen yarılarından giriş yapma yeteneğine sahip olmasından dolayı biber yapraklarına püskürtülerek patojenite testi yapılmıştır. Gelişen kültürden saf suyla dansiyometrede 1.27 ölçüm değerinde hazırlanan süspansiyon (2.9x 10⁶ hücre/ml), 3-5 yapraklı dönemdeki biber fidelerinin alt yapraklarına püskürtülmüştür (Mirik, 2005). İklim odasında (28°C’de, %75 nem, 8/16 saat aydınlık/karanlık) muhafaza edilen biber bitkilerinin yapraklarında sarı haleli veya halesiz kahverengi leke belirtileri gözlemlendikten sonra bakteriyolojik tekniklere göre tek bir lekeden patojen bakteri izolasyonu

Tohuma Uygulanan Bakteriye Antagonistlerin Biberde Bakteriye Leke Hastalığına Etkisi

yapılmış ve Koch postulatı aşamaları tamamlanmıştır (Lelliott ve Stead, 1987). Geri izole edilen YA-611 kodlu izolatin farklı kolonileri steril vida kapaklı tüplerde %0.85'lik NaCl içeren sıvı besi yerinde karanlıkta oda sıcaklığında saklanmıştır.

Aday Antagonist Bakterilerin İzolasyonu ve Saflaştırılması

Özellikle hastalığın çok görülmediği ve kimyasal uygulamaların hiç yapılmadığı veya sınırlı sayıda yapılan alanlardan toprak örnekleri almaya dikkat edilerek örneklemeler yapılmıştır. Adana, Adıyaman, Antalya, Gaziantep, Mersin, Osmaniye ve Şanlıurfa illerinde ticari olarak biber yetiştiriciliği yapılan 92 farklı tarla Temmuz-Ekim 2020 arasında ziyaret edilmiştir. Biber üretim alanlarında diğerlerine göre gelişimi daha iyi olan bitkiler sökülmuş ve kök ile kök bölgesi toprağı kese kağıtlarına yerleştirilerek Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Bakterioloji laboratuvarına getirilmiştir. Biber kök bölgesindeki toprak partikülleri temizlenip kılcal köklerden 10 gr parça alınmış ve izolasyonlar için kullanılmıştır. Benzer şekilde, kök bölgesine yakın alandan alınan toprak örnekleri gazete kâğıdı üzerinde oda sıcaklığında kurutulduktan sonra 0.2 mm'lik porluk elekten geçirilerek elenmiştir. Her bir alandan elde edilen 10'ar gr kılcal kök ve toprak örneği 90 ml Saline Buffer (%0.85 NaCl çözeltisi) içerisinde oda sıcaklığında 200 dev/dk'da çalışan çalkalayıcıda en az 3 saat çalkalanmıştır. Çalkalanan örneklerden 1 ml alınarak 9 ml salin buffer içeren tüplere seyreltme serileri hazırlanmış ve her bir seyretmeden 100 µl alınarak iki tekrarlı olacak şekilde TSA besi yerine bagetle yayma yapılmıştır. Petriler 25°C'de 48 saat inkübe edildikten sonra gelişen koloniler incelenmiş ve farklı morfolojik gelişim (şekil ve renk olarak) gösteren kolonilerden TSA besi yerine saflaştırmalar yapılmıştır. Aday antagonistler eğik olarak hazırlanmış Yeast Dextrose Chalk Agar (YDCA) besi yerine çizilerek 25°C'deki inkübatörde 48 saat geliştirildikten sonra 4°C'deki buzdolabında kullanılıncaya kadar saklanmıştır (Kayaaslan, 2021).

Aday Antagonist Bakteri İzolatlarının *Xanthomonas euvesicatoria*'ya Karşı Antibakteriyel Etkisinin Belirlenmesi

Biber yetiştirilen alanlardan izole edilen 488 adet aday antagonistin patojen bakteri *Xanthomonas euvesicatoria*'ya antibakteriyel etkisi *in vitro* ikili kültür petri denemeleriyle araştırılmıştır. Aday antagonistler TSA besi yerine üç nokta ekim yöntemiyle bulaştırıldıktan sonra (Mitchell, 1992; Duman ve Soylu, 2019) petriler inkübatör dolaplarında 25°C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. TSA besi yerinde 48 saat geliştirilen patojen bakteri *Xanthomonas euvesicatoria* dansiyometre yardımıyla 2.9×10^6 hücre/ml yoğunluğundaki süspansiyonu hazırlanmıştır. Besi yerinde gelişmiş olan aday antagonistlerin üzerine 15 cm uzaklıktan el pülverizatörüyle patojen bakteri süspansiyonu püskürtülmüştür. Karşılaştırma amacıyla TSA besi yeri içeren bir petriye herhangi bir aday antagonist bakteri aşılması yapılmamış sadece *Xanthomonas euvesicatoria* püskürtülmüştür. Petriler 25°C'deki inkübatörde 72 saat bekletilmiş ve petrilerde oluşan engelleme zonları mm olarak ölçülerek kaydedilmiştir. Bu deneme üç tekrarlı olacak şekilde yürütülmüştür. İkili kültür testlerinde engelleme zonu oluşturan aday antagonist bakteriler *in vivo* tohum denemeleri için seçilmiştir.

Antagonist Bakteri İzolatlarının Bakteriye Leke Hastalığının Gelişimi Üzerine Etkisi

In vitro koşullarda yapılan petri denemeleri sonuçlarına göre *Xanthomonas euvesicatoria*'ya antibakteriyel etkisi saptanmış 9 adet bakteriye antagonist izolatu çalışmanın *in vivo* etkinlik denemelerinde kullanılmıştır. YA-611 kodlu *Xanthomonas euvesicatoria* izolatu TSA besi yerinde 28°C'de 48 saat geliştirildikten sonra 2.9×10^6 hücre/ml (dansiyometre 1.27 değerinde) yoğunluğunda bir süspansiyon hazırlanmıştır. Karaisalı salçalık biber tohumları hazırlanan bu patojen bakteri süspansiyonuna 30 dakika süreyle daldırılarak bulaştırılmıştır (Horuz ve ark., 2018). Tohumlar bulaştırıldıktan sonra tülbentten geçirilerek süzölmüş ve kurumaya bırakılmıştır. Negatif kontrol uygulaması olarak sadece steril suya daldırılmış pozitif kontrol olarak ise sadece patojenle bulaştırılmış biber tohumlarının ekimi yapılmıştır. Antagonistlerin

Tohuma Uygulanan Bakteriyel Antagonistlerin Biberde Bakteriyel Leke Hastalığına Etkisi

48 saatlik taze kültüründen dansiyometreyle (2.0 değerinde) süspansiyonları ayrı ayrı hazırlanmıştır. Yaklaşık bir saat önce patojenle bulaştırılmış biber tohumları hazırlanan antagonist süspansiyonuna 30 dakika süre ile daldırılarak muamele edilmiştir. Bu süre sonunda süzgeçle süzülen antagonistlerle uygulama görmüş patojenle bulaşık tohumlar kuruduktan sonra steril torfla dolu plastik küvetlere ekilmiştir. Denemede, her bir antagonist uygulaması için 3 tekrar ve her tekrarda 50 tohum olacak şekilde deneme kurulmuştur. Uygulama görmüş tohumların ekildiği küvetler %75 nem ve $28\pm 3^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edilmiştir. Çimlenen tohumlardan gelişen fidelerin kotiledon yaprakları günlük olarak incelenerek pozitif kontrole ait uygulamada gözle görülür Bakteriyel Leke Hastalığı belirtileri oluştuğunda değerlendirme yapılmıştır. Her bir antagonist bakteri uygulamasında hasta bitki sayıları çimlenen bitki sayılarına bölünerek her tekrardaki hastalık oranı % olarak hesaplanmıştır. Bu veriden yararlanılarak antagonist bakterinin hastalığı baskılama oranı yani % etki Abbott formülüne ($\% \text{ etki} = (\text{kontrol} - \text{uygulama}) / \text{kontrol} \times 100$) göre hesaplanmıştır (Karman, 1971). Aday antagonistlerin hastalık şiddetine etkisi 0-3 skalasıyla (0: kotiledon yapraklarda leke yok, 1: kotiledon yapraklarda 1 leke, 2: kotiledon yapraklarda 2-3 leke, 3: Kotiledon yapraklarda 4 ve 4'ten fazla leke) değerlendirilmiştir (Horuz ve ark., 2018). Antagonist bakterilerin hastalık şiddetini azaltma oranı Abbott formülüne % etkisi hesaplanmıştır.

Yapılan uygulamalar arasındaki istatistikî farklar ANOVA istatistikî programında LSD testi ile ($p \leq 0.05$) uygulamalar arasındaki farklılıklar ortaya konulmuştur. Değerlendirme yapıldıktan sonra her uygulamanın bir tekrâründeki hasta bitkilerden bir adet hastalıklı yaprak örneği alınarak bakteri izolasyonu yapılmış ve hastalık belirtilerinin *Xanthomonas euvesicatoria*'dan kaynaklandığı teyit edilmiştir.

Antagonist Bakteri İzolatlarının Tohum Çimlenmesine Etkisi

YA-611 kodlu *Xanthomonas euvesicatoria* izolatu TSA besi yerinde geliştirildikten sonra

2.9×10^6 hücre/ml (dansiyometre 1.27 değerinde) yoğunluğunda bir süspansiyon hazırlanmıştır. Karaisalı salçalık biber tohumları hazırlanan bu patojen bakteri süspansiyonuna 30 dakika süreyle daldırılarak bulaştırılmıştır (Horuz ve ark., 2018). Patojen bulaştırılmış biber tohumları, içerisinde steril torf koyulan küvetlerde uygun ortam koşullarında çimlendirilmiştir. Çimlenme gerçekleşmez, fidelerin kotiledon yaprakları oluştuktan sonra çimlenen fide sayıları not edilmiştir. Antagonistler ile muamele edilmiş tohumların çimlenme %'si ile sadece patojen bakteri uygulanmış tohumların çimlenme yüzdesi karşılaştırılmıştır. Antagonistlerin çimlenmeye % etkisi Abbott formülüne göre hesaplanmıştır. Anova istatistik programında LSD çoklu karşılaştırma testinde $p \leq 0.05$ önem düzeyinde uygulamalar arasındaki istatistikî farklar hesaplanmıştır.

Antagonist Bakteri İzolatlarının Tanısı

Antagonist bakteri izolatlarının tanısı son yıllarda mikroorganizmaların çok daha kolay, güvenilirliği yüksek ve hızlı bir şekilde tanımlanmasını sağlayan MALDI-TOF MS teknolojisi ile Prof. Dr. Soner SOYLU'nun katkılarıyla Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Bitki Sağlığı Kliniği Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde

(http://www.mku.edu.tr/departments.aspx?biri_m=218) yapılmıştır. MALDI-TOF MS yönteminin kullanılmasının amacı; mikroorganizmaların protein yapılarının kütle spektrometresindeki izolasyonu ve m/z değerlerine göre bulunan spektraların grafiksel görüntülerinin sistemin kendi veri tabanındaki referans organizmalara uyumuna göre mikroorganizmaların cins ve türlerini tanımlanması ve kısa sürede verilerin elde edilmesidir. (Pavlovic ve ark., 2012). MALDI-TOF MS'de mikroorganizmalara ait biyomoleküllerin (protein, şeker) ve büyük organik moleküllerin (polimer, dendrimer, makromolekül) iyonizasyonundan sonra manyetik alandan geçirilmesiyle protein profillerinin çıkarılmaktadır (Yılmaz ve ark., 2014). MALDI-TOF MS skor değerleri ≥ 2 ise tür düzeyinde tanı, 1.7 ve 1.9 arasında ise cins düzeyinde tanı ve skor değeri < 1.7 ise güvensiz

Tohuma Uygulanan Bakteriyel Antagonistlerin Biberde Bakteriyel Leke Hastalığına Etkisi

tanı olarak değerlendirilmiştir (Pavlovic ve ark., 2012; Uysal ve ark., 2019).

Bulgular ve Tartışma

Yaprak Lekesine Neden Olan *Xanthomonas* İzolatının Virülenliğinin Artırılması

YA-611 kodlu *Xanthomonas euvesicatoria* izolatının 2.9×10^6 hücre/ml yoğunluğundaki süspansiyonu ile yapılan patojenite testinde biber yapraklarında tipik hastalık belirtisi olan sarı haleli kahverengi yaprak lekeleri inokulasyondan 20 gün sonra gözlenmiştir. Koch postulatları tamamlanan YA-611 kodlu izolatın farklı kolonileri ileriki çalışmalarda kullanılmak üzere steril vida kapaklı tüplerde %0.85'lik NaCl içeren sıvı besi yerinde karanlıkta oda sıcaklığında saklanmıştır.

Aday Antagonist Bakterilerin İzolasyonu

Çizelge 1.'de görüldüğü gibi, 35 adet biber yetiştirilen toprak örneği, 17 adet biber kök örneği, 9 adet yeşil aksam ve 32 adeti tohum örneği olmak üzere Türkiye'nin biber yetiştiriciliğinin yapıldığı önemli illerinden olan Adana'dan 38 adet, Adıyaman'dan 3, Antalya'dan 8, Gaziantep'ten 7, Mersin'den 18 adet, Osmaniye ve Şanlıurfa'dan da 9 örnek olmak üzere yedi farklı ilden aday antagonist bakteri izolasyonu için 92 farklı bitki/toprak örneği toplanmıştır.

Çizelge 1. Aday antagonist izolasyonu için toplanan örnek sayıları

Yer	Toprak	Kök	Yeşil Aksam	Tohum	Toplam
Adana	12	1	7	18	38
Adıyaman	2	1	0	0	3
Antalya	4	0	0	4	8
Gaziantep	0	0	0	7	7
Mersin	8	8	2	1	18
Osmaniye	5	4	0	0	9
Şanlıurfa	4	3	0	2	9
TOPLAM	35	17	9	32	92

Yedi farklı ilden ticari olarak biber yetiştiriciliği yapılan alandan toplanan 92 farklı örnekten yapılan aday antagonist izolasyonunda farklı morfolojik gelişim (şekil ve renk olarak) gösteren 488 adet bakteri elde edilmiştir.

Bu aday antagonistlerin 208 adeti Adana'dan, 152 adeti Mersin'den, 55 adeti Şanlıurfa'dan, 25 adeti Antalya'dan, 22 adeti Osmaniye'den, 20 adeti Adıyaman'dan ve 6 adeti Gaziantep'ten alınan örneklerden izole edilmiştir. İzole edilen aday antagonistlerin 140 adeti topraktan, 161 adeti kökten, 44 adeti yeşil aksamdan ve 143 adeti tohumdan izole edilmiştir (Çizelge 2.).

Çizelge 2. Farklı İllerden ve Biber Bitki Kısımlarından Elde Edilen İzolat Sayıları

Yer	Toprak	Kök	Yeşil Aksam	Tohum	Toplam
Adana	88	10	30	80	208
Adıyaman	6	14	0	0	20
Antalya	0	0	0	25	25
Gaziantep	0	0	0	6	6
Mersin	16	122	14	0	152
Osmaniye	19	3	0	0	22
Şanlıurfa	11	12	0	32	55
TOPLAM	140	161	44	143	488

Aday Antagonistlerin *Xanthomonas euvesicatoria*'ya Antibakteriyel Etkisinin Belirlenmesi

Biber köklerinden ve biber yetiştirilen topraktan izole edilen 488 adet aday antagonistin patojen bakteri *Xanthomonas euvesicatoria*'ya antibakteriyel etkisi *in vitro* ikili kültür petri denemeleriyle araştırıldığında 9 adet aday antagonist TSA içeren petrielerde 3-9 mm arasında engelleme zonu oluşturmuştur. Antimikrobiyal madde üretme yeteneğindeki 9 adet antagonist biyolojik tohum uygulamaları için seçilmiştir.

Bakteriyel Antagonistlerin Tohum Kökenli Bakteriyel Leke Hastalığına Etkisi

Şekil 4'te görüldüğü gibi herhangi bir uygulamanın yapılmadığı pozitif kontrol uygulamasındaki hastalık oranı %98.3 iken hastalığı baskı altına almada başarılı gösteren yedi biyolojik tohum uygulamasında hastalık oranı %83.4 ile %43.5 arasında olduğu saptanmıştır. Adıyaman 6-1, Hsf 4-2, Suruç 4-2, AE 10-6, YL 4-3, Suruç 6-1 ve Sumbas 4-2 kodlu antagonist izolatlarla yapılan tohum uygulamaları hastalık oluşumunu baskılamada başarılı izolatlar olarak belirlenmiştir. Adıyaman ilinde biber yetiştirilen tarla toprağından izole edilen Adıyaman 6-2 ve Adıyaman 4-2 kodlu antagonist izolatlar her ne kadar *in vitro* petri denemelerinde başarılı

Tohuma Uygulanan Bakteriyel Antagonistlerin Biberde Bakteriyel Leke Hastalığına Etkisi

bulunsalar da istatistiksel olarak pozitif kontrolle aynı grupta yer aldığından hastalığı *in vivo* koşullarda baskılamada başarısız olarak değerlendirilmiştir. *In vitro* koşullarda etkinlik gösteren izolatların *in vivo* koşullarda başarısız olduğuna yönelik araştırma bulguları daha önceden yapılmış birçok biyolojik mücadele çalışmalarında bildirilmiştir (Horuz, 2014; Aktepe, 2018). Dokuz izolat içerisinde YL 4-3, Suruç 6-1 ve Sumbas 4-2 kodlu antagonistik bakteri izolatları hastalığı *in vivo* koşullarda en etkili engelleyen izolatlar olmuştur.

Çizelge 3'te görüldüğü gibi, *Xanthomonas euvesicatoria* ile suni olarak bulaştırılmış biber tohumlarına, yerel antagonistlerle biyolojik tohum uygulamaları yapıldığında, fidelerdeki hastalık %7.63-55.75 oranında baskılarken hastalık şiddeti %9.23-83.69 oranında azalmıştır.

Çizelge 3. Antagonist bakteri izolatlarının biberde bakteriyel leke hastalığına etkisi

İzolat Kodu	Hastalık Oranı (%)	% Etki	Hastalık Şiddeti (Skala değeri Ort.)	% Etki
Pozitif Kontrol	98.3 a	0	2.6 a	0
Adıyaman 6-2	100.0 a	-1.73	2.8 a	-5.69
Adıyaman 4-2	90.8 ab	7.63	2.4 a	9.23
Adıyaman 6-1	83.4 bc	15.16	1.8 b	28.57
Hsf 4-2	81.1 bc	17.50	1.9 b	32.87
Suruç 4-2	80.3 c	18.31	1.5 bc	32.87
AE 10-6	78.2 c	20.45	1.6 bc	40.33
YL 4-3	67.9 d	30.93	1.8 b	45.01
Suruç 6-1	63.1 d	35.81	1.1 c	57.65
Sumbas 4-2	43.5 e	55.75	0.4 d	83.69

Negatif kontrol olarak sadece steril suya uygulaması yapılmış fidelerde herhangi bir hastalık tespit edilmemiştir. Bu durum denemede kullanılan biber tohumlarının Bakteriyel Leke Hastalığı yönünden bulaşık olmadığına göstergesidir. Pozitif kontrol olarak, sadece patojenle bulaştırılmış herhangi bir biyolojik tohum uygulamasının yapılmadığı biber tohumları yetiştirildiğinde, gelişen fidelerin %98.3'ünde tipik Bakteriyel Leke Hastalığının varlığı saptanmıştır. Hasta fidelerin kotiledon yapraklarındaki lekeler 0-3 skalasına göre değerlendirildiğinde, hastalık şiddetinin ortalama 2.8 değerinde olduğu belirlenmiştir. Bu lekelerden yapılan izolasyonlarda TSA besiyerinde mukoid ve sarı renkli koloniler

gelişmiş ve patojenite testiyle hastalık yapma yeteneğinde oldukları belirlenmiştir. Sonuçta kotiledon lekelerinin *Xanthomonas euvesicatoria* ile ilişkili olduğu kanıtlanmıştır.

Adıyaman 6-2 ve Adıyaman 4-2 kodlu antagonistler hariç yedi adet yerel antagonist (Adıyaman 6-1, Hsf 4-2, Suruç 4-2, AE 10-6, YL 4-3, Suruç 6-1 ve Sumbas 4-2) hastalığı engellemede etkili tohum uygulamaları olarak belirlenmiştir.

Osmaniye ili Sunbas ilçesinde yetiştirilen biber tarla toprağından izole edilen Sumbas 4-2 kodlu yerel antagonistin uygulandığı tohumlardan gelişen fidelerin %43.5'in hasta olduğu hastalık şiddetinin de ortalama 0.4 skala değerinde olduğu saptanmıştır. Bu verilere göre, tohum kökenli *Xanthomonas euvesicatoria*'nın neden olduğu Bakteriyel Leke Hastalığını %55.75 oranında baskılanmış ve hastalık şiddetinde %83.69 oranında azalış meydana gelmiştir. İstatistiksel olarak incelendiğinde, Sumbas 4-2 kodlu yerel antagonist uygulaması ayrı bir istatistik grupta yer alan en etkili tohum uygulaması olarak belirlenmiştir.

Diğer bir başarılı biyolojik tohum uygulaması da Şanlıurfa ili Suruç ilçesinde biber tarla toprağından izole edilen Suruç 6-1 kodlu ve biber tarla toprağından izole edilen YL 4-3 kodlu yerel antagonist uygulamasında saptanmıştır. Bu antagonistlerle muamele görmüş tohumlardan gelişen fidelerin %63.1 ve %67.9'unda hastalık saptanmış ve hastalığın engelleme oranı %35.81 ve %30.93 olarak hesaplanmıştır. Benzer şekilde hastalık şiddetinde %57.65 ve %45.01 azalış belirlenmiş ve bu başarı istatistik analizleriyle de doğrulanmıştır.

Adana ilinden biber yetiştirilen tarla toprağından izole edilen AE 10-6 kodlu ve Şanlıurfa ili Suruç ilçesinde biber tarla toprağından izole edilen Suruç 4-2 kodlu antagonist izolatlar istatistik analizlerinde ayrı bir gruba oluşturan diğer başarılı tohum uygulamaları olmuştur. AE 10-6 ve Suruç 4-2 kodlu yerel antagonistler hastalığı %20.45-18.31 oranında, hastalık şiddetini %40.33-32.87 oranında baskılamıştır.

Adıyaman ilinden biber yetiştirilen tarla toprağından izole edilen Hsf 4-2 kodlu ve Adıyaman 6-1 kodlu antagonist izolatlar *Xanthomonas euvesicatoria*'nın neden olduğu Bakteriyel Leke Hastalığını %17.50-15.16

Tohuma Uygulanan Bakteriye Antagonistlerin Biberde Bakteriye Leke Hastalığına Etkisi

oranında baskılanmış ve hastalık şiddetinde %32.87-28.57 oranında azalış sağlamıştır. İstatistiksel olarak ayrı bir grupta yer alan etkili tohum uygulaması olarak değerlendirilmiştir. Farklı *Xanthomonas* türleri (*Xanthomonas vesicatoria*, *X. euvesicatoria*, *X. gardneri*, *X. perforans*) tarafından neden olunan Bakteriye Leke Hastalığı domates ve biberin önemli bakteriye hastalıklarından biridir. Bu hastalığın mücadelesinde yeşil aksama püskürtülen bakır ve bakır içeren bileşiklere *Xanthomonas* türlerinin ülkemizde direnç geliştirme problemi (Mirik ve ark., 2007) nedeniyle kimyasal mücadele kullanılamaz hale gelmektedir. Yeşil aksama bakırlı preparatlar uygulanmadığında iki önemli mücadele şekli ön plana çıkmaktadır. Bunlardan biribiyojik mücadelenin kullanımı, diğeri ise tohumdaki patojen miktarını baskılayarak fidelerdeki hastalık oranını azaltan tohum uygulamalarının kullanımınıdır. Bu çalışmada tohumdaki patojen popülasyonu, yerel bakteriye antagonistlerle biyolojik tohum uygulamalarıyla baskılanarak fidelerdeki hastalık oranını azaltmak hedeflenmiş ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Ülkemizden izole edilen yerel antagonist bakteri izolatlarının ülkemiz ekolojik koşullarına adapte olmuş izolatlar olmaları nedeniyle kültür bitkilerinde sorun bakteriye ve fungal kökenli hastalıkların baskılanmasında başarıyla kullanılabilmesi hem bu çalışmada hem de daha önce yapılan biyolojik mücadele çalışmalarında (Kotan, 1998; Soylu ve ark., 2005; Mirik ve ark., 2007; Bozkurt ve Soylu, 2019; Duman ve Soylu, 2019; Kayaaslan, 2021; Soylu ve ark., 2021; Soylu ve Kara, 2022) ortaya konulmuştur. Ayrıca ticari bazı biyolojik mücadele preparatlarının da ülkemizde biber bakteriye leke hastalığını baskı altına aldığını gösteren araştırma sonuçları (Tokmak, 2020) da biyolojik mücadelenin başarısını kanıtlamaktadır.

Bakteriye Antagonistlerin Tohum Çimlenmesine Etkisi

Çizelge 4'te görüldüğü üzere, *Xanthomonas euvesicatoria* ile suni olarak bulaştırılmış biber tohumlarının %71.3'ü çimlenmiştir. İstatistiksel olarak değerlendirildiğinde, pozitif kontrol, Adıyaman 6-2, Adıyaman 4-2, Adıyaman 6-1, Hsf 4-2, Suruç 4-2, AE 10-6, YL 4-3 ve Suruç

6-1 uygulamaları kontrol ile aynı grupta yer almış ve çimlenmeye olumsuz bir etki yapmadıkları belirlenmiştir. Sadece Sumbas 4-2 kodlu antagonist ile muamele görmüş biber tohumlarında çimlenme oranı %37.4 düzeyinde azalmış ve istatistiksel olarak da çimlenmedeki azalış farklı olarak bulunmuştur. Sumbas 4-2 kodlu antagonist hastalığı baskılamada en etkili uygulama olsa da çimlenmeyi azalttığı için başarılı bir biyolojik tohum uygulaması olmadığı belirlenmiştir.

Çizelge 4. Biyolojik Tohum Uygulamalarının Çimlenmeye Etkisi

İzolat Kodu	Çimlenme Oranı (%)	Çimlenmedeki Değişim (%)
Pozitif Kontrol	71.3 a	0.0
Adıyaman 6-2	60.3 ab	15.4
Adıyaman 4-2	58.7 ab	17.7
Adıyaman 6-1	68.3 a	4.2
Hsf 4-2	75.0 a	-5.2
Suruç 4-2	74.7 a	-4.7
AE 10-6	69.0 a	3.3
YL 4-3	74.3 a	-4.2
Suruç 6-1	73.0 a	-2.3
Sumbas 4-2	44.7 b	37.4

Antagonistlerin tanısı

MALDI TOF MS ile yapılan tanı sonucunda, YL 4-3 kodlu izolat 1.976 indeks değeri ile *Bacillus subtilis* ile tür düzeyinde tam eşleşme sağlanmıştır. Suruç 6-1 kodlu izolat ve Sumbas 4-2 kodlu izolat 2 indeks değeri ile *Bacillus amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* olarak tanılanmıştır. Bu bakteri türlerinin antimikrobiyal etkiye sahip olduğunu gösteren farklı çalışmalar bulunmaktadır (Aktepe, 2018; Duman ve Soylu, 2019; Soylu ve Kara, 2022; Djatmiko ve ark., 2022). Mikroorganizmaları içeren biyolojik preparatlar, kimyasal pestisitlerden farklı etki mekanizmalarına sahip hastalık yönetimi alternatifleri sunarak dünya pestisit pazarında oldukça önemli bir yere sahiptirler. Örneğin lipopeptid metabolizma üretmek antimikrobiyal aktivite gösteren *Bacillus subtilis* QST 713 (AgraQuest, USA), çürükler ve yanıklıklara neden olan patojenler ve yaprak patojenlerine karşı birçok ülkede yaygın olarak kullanılan ruhsatlı bir biyolojik preparattır (Fravel, 2005; Alexandrova ve ark., 2002).

Tohuma Uygulanan Bakteriyel Antagonistlerin Biberde Bakteriyel Leke Hastalığına Etkisi

Sonuç

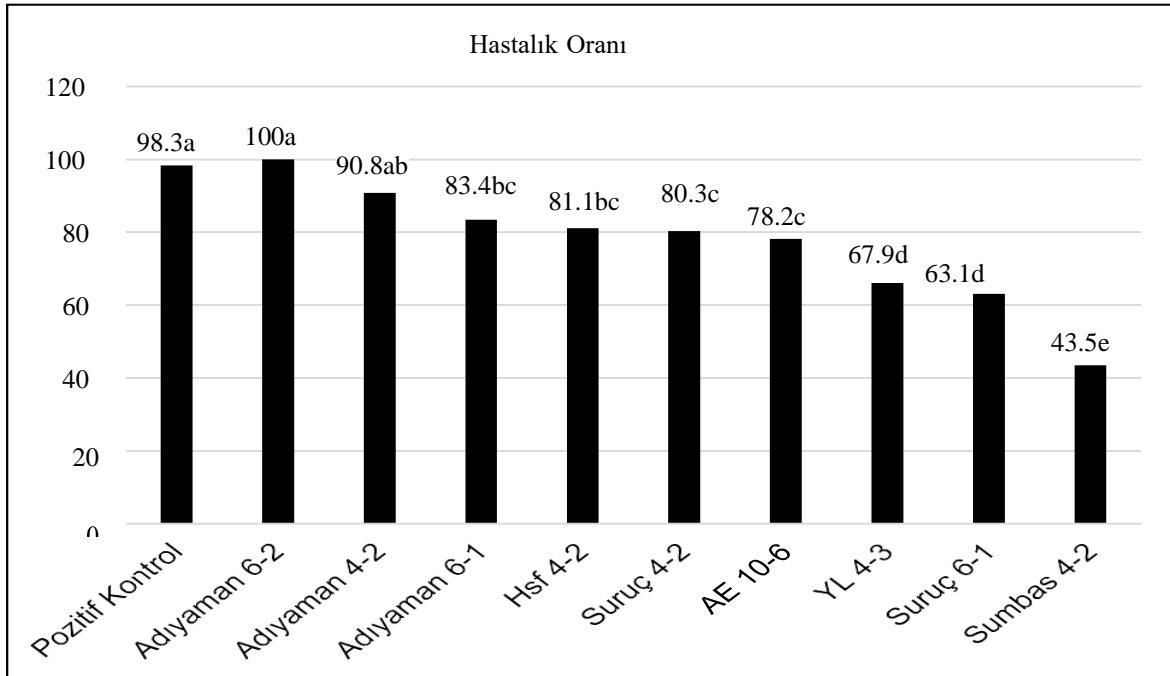
Bu çalışma, *Xanthomonas euvesicatoria*'nın tohum kaynaklı bulaşıklığını azaltmak için yerel antagonistler kullanılarak yapılan biyolojik tohum uygulamalarını kapsamaktadır.

Yedi farklı ilde (Adana, Adıyaman, Antalya, Gaziantep, Mersin, Osmaniye ve Şanlıurfa) biber yetiştirilen topraktan, biber köklerinden, yeşil aksamından ve tohumdan izole edilen 488 adet aday antagonist bakteriyle yapılan *in vitro* petri denemelerinde, dokuz izolatan *Xanthomonas euvesicatoria*'ya antibakteriyel etkisi saptanmıştır. Patojenle suni olarak bulaştırılmış biber tohumlarına dokuz bakteriyel antagonisten uygulandığı denemede, Bakteriyel Leke Hastalığı, yedi antagonist (Adıyaman 6-1, Hsf 4-2, Suruç 4-2, AE 10-6, YL 4-3, Suruç 6-1 ve Sumbas 4-2 kodlu) tarafından %15-56 oranında baskılanırken hastalık şiddeti %29-84 oranında engellenmiştir. Çimlendirme denemeleri de değerlendirildiğinde, YL 4-3 ve Suruç 6-1 kodlu antagonistler en başarılı olarak saptanmıştır. MALDI TOF MS ile yapılan tanı sonucunda, YL 4-3 ve Suruç 6-1 kodlu izolatlarda *Bacillus subtilis*, ve *Bacillus amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* olarak tanılanmıştır.

Bu hastalığın mücadelesinde yeşil aksama püskürtülen bakır ve bakır içeren bileşiklere *Xanthomonas* türlerinin direnç geliştirme problemi nedeniyle biyolojik mücadele ön plana çıkmaktadır. Ülkemizden izole edilen yerel antagonistler ülkemiz ekolojik koşullarına uyum sağlamış izolatlardan olmaları nedeniyle başarıyla kullanılabilirliği bu araştırma ile kanıtlanmıştır. Biber tohumlarındaki *Xanthomonas euvesicatoria* popülasyonunu azaltmak için gelecekte YL 4-3 ve Suruç 6-1 kodlu yerel antagonistlerle biyolojik tohum uygulamaları başarılı olacaktır. Bu antagonistlerin sadece biberde değil domatesteki etkisi ve pratikte kullanımı ile ilgili daha detaylı yapılacak araştırmalara (diğer antagonistlere, patojenlere, insanlara etkisi, kitle üretimleri, uygulama dozu ve zamanı ruhsat ve patent alma vb) gereksinim olduğu açıktır.

Teşekkür

Antagonist bakteri izolatlarının MALDI-TOF MS ile tanısını yapılmasında katkı sağlayan Prof. Dr. Soner SOYLU'ya ve FYL-2021-13395 nolu projeye maddi desteğinden dolayı Çukurova Üniversitesi BAP birimine teşekkür ederiz.



Şekil 4. Biyolojik tohum uygulamaları sonucu oluşan hastalık oranları

Tohuma Uygulanan Bakteriyel Antagonistlerin Biberde Bakteriyel Leke Hastalığına Etkisi

Kaynaklar

- Adaskaveg J.E., Hine R.B., 1984. Resistance of field strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* to copper bactericides. *Phytopathology* 74: 858.
- Aktepe, B.P. 2018. *Erwinia amylovora*'nın biyolojik mücadelesinde epifitik bakteri ve mayaların etkilerinin araştırılması. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Alexandrova, M., Bazzi, C. and Lameri, P. 2002. *Bacillus subtilis* strain Bs-F3: colonization of pear organs and its action as a biocontrol agent. *Acta Horticulturae*, 590: 291-297.
- Anonim, 2022. https://adana.tarimorman.gov.tr/Belgeler/SUBELER/bitkisel_uretim_ve_bitki_sagligi_sube_mudurlugu/sebze_yetistiriciligi_ve_mucadelesi/Domates.pdf. Erişim Tarihi: 06.06.2022.
- Aysan, Y. and F. Sahin, 2003. Occurrence of Bacterial Spot Disease, Caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*, on Pepper in the Eastern Mediterranean Region of Turkey. *Plant Pathology*, 52 (6), 781.
- Aysan Y., Üstün, N., Mirik, M., Saygılı, H., ve Şahin, F., 2019. Domates Bakteriyel Benek Hastalığı, sayfa 159-165. In: Bitki Bakteri Hastalıkları (Ed: Saygılı, H., Aysan, Y., Şahin, F., Soylu, S., Mirik, M.), Toprak Ofset Matbaacılık, Tekirdağ. 382 sayfa.
- Bozkurt, İ.A., Soylu S. 2019. Elma kök uru hastalığı etmeni *Rhizobium radiobacter*'e karşı epifit ve endofit bakteri izolatlarının antagonistik potansiyellerinin belirlenmesi. *Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 16, 348-361.
- Djatkiko, H. A., Kurniawan, D. W., and Prihatiningsih, N. (2022). Potential of *Bacillus subtilis* potato isolate as biocontrol agent of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and candidate for nanosuspension formula. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 23 (7) 3313-3317.
- 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.
- Fravel, D. R. (2005). Commercialization and implementation of biocontrol. *Annual Reviews. Phytopathology*, 43:337–59.
- Horuz, S., 2014. Karpuzda Bakteriyel Meyve Lekesi Hastalığı Etmeni *Acidovorax citrulli*'nin Tanısı, Moleküler Karakterizasyonu ve Bakteriyel Antagonistlerle Biyolojik Mücadelesi. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Adana, 203s
- Horuz, S., Ocal, A. and Aysan, Y. 2018. Efficacy of hot water and chemical seed treatments on bacterial speck of tomato in Turkey. *Fresenius Environmental Bulletin*, 27(5), 3185-3190p.
- Horuz, S., Aktepe, B.P., and Aysan, Y. 2019. Identification of bacterial spot (*Xanthomonas euvesicatoria*) on pepper and tomatoes. 1st International Molecular Plant Protection Congress, Adana, Turkey.92.
- Kara, M., ve 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.
- Karman, M., 1971. Bitki Koruma Araştırmalarında Genel Bilgiler, Demelerin Kuruluşu ve Değerlendirme Esasları. T. C. Tarım Bakanlığı Zirai Mücadele ve Karantina Genel Müdürlüğü Yayınları, 279 s
- Kayaaslan, Z. 2021. Tokat İli Biber Üretim Alanlarında Bakteriyel Leke Hastalığı Etmeni (*Xanthomonas euvesicatoria*)'nın Tanılanması, Epidemiyolojisi ve Biyolojik Mücadelesi. Doktora Tezi, Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 148s
- Kotan R., 1998. Biber ve Domatesteki Bakteriyel Leke Hastalığı (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Doidge) Dye.)'nın Biyolojik ve Kimyasal Kontrolü. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 47 s.
- Lelliott, R.A., and Stead, D.E., 1987. Methods for The Diagnosis of Bacterial Diseases of

Tohuma Uygulanan Bakteriyel Antagonistlerin Biberde Bakteriyel Leke Hastalığına Etkisi

- Plants. Methods in Plant Pathology, (T. F. Preece, Series editor), Volume 2, Published on behalf of the British Society for Plant Pathology by Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK., 219p
- Mirik, M., 2005. Biberde Bakteriyel Leke Etmeni *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*'nın Tanılanması ve Bitki Büyüme Düzenleyici Rizobakterilerle Biyolojik Mücadele Olanakları. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilim Dalı, 162s.
- Mirik, M., Aysan, Y., and Cinar, O. 2007. Copper-resistant strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (Doidge) Dye in the Eastern Mediterranean region of Turkey. *Journal of Plant Pathology*, 89(1), 153-154
- Mitchell, R. E., 1992. Metabolites from pseudomonads that inhibit the growth of *Erwinia amylovora*. Sixth Int. Workshop on Fire Blight, Athens, Greece 21
- Pavlovic, N., Zdravkovic, J., Cvikic, D., Zdravkovic, M., Adzic, S., Pavlovic, S., and Surlan-Momirovic, G., 2012. Characterization of onion genotypes by use of RAPD markers. *Genetika*, 2, 269-278
- Ritchie, D.F., and Dittapongpitch, V. 1991. Copper- and Streptomycin-Resistant Strains and Host Differentiated Races of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in North Carolina. *Plant Dis.*, 75:733-736.
- Soylu, S., Soylu, E.M., Kurt, Ş. and 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.
- Soylu, S., Kara, M., Uysal, A., Kurt, Ş. Soylu, 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.
- Stall, R.E., 1993. *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*: cause of bacterial spot of tomato and pepper. In: *Xanthomonas* (Edts; J.G. Swing and E.L. Civerelo. Great Britain by St.
- Tokmak, A.T. 2020. Bazı Biyopreparatların Domateste Bakteriyel Leke (*Xanthomonas euvesicatoria*) ve Bakteriyel Benek (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) Hastalık Etmenlerine Etkilerinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilim Dalı, 46s.
- Uysal, A., Kurt, Ş., Soylu, S., Soylu, E. M., ve Kara, M. 2019. Yaprığı Yenen Sebzelelerdeki Mikroorganizma Türlerinin MALDI-TOF MS (Matris Destekli Lazer Desorpsiyon/İyonizasyon Uçuş Süresi Kütle Spektrometresi) Tekniği Kullanılarak Tanılanması. *Yuzuncu Yıl University Journal of Agricultural Sciences*, 29 (4), 595-603.
- Yılmaz, S., Duyan, S., Artuk, C., Diktaş, H. 2014. Mikrobiyolojik tanımlamada MALDI-TOF MS uygulamaları. *TAF Preventive Medicine Bulletin*, 13(5), 421-426.