



Bazı endofitik ve rizosferik bakterilerin fasulyede *Macrophomina phaseolina*'ya karşı etkinliklerinin *in vitro* koşullarda belirlenmesi

In vitro determination of efficacies of some endophytic and rhizospheric bacteria against *Macrophomina phaseolina* in beans

Raziye KOÇAK^{1*} , Özden SALMAN² 

¹Selçuk Üniversitesi, Çumra MYO, Bitkisel ve Hayvansal Üretim Bölümü, Konya

²Selçuk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Konya

¹<https://orcid.org/0000-0002-8221-0452>; ²<https://orcid.org/0000-0002-7871-4105>

To cite this article:

Koçak, R. & Salman, Ö. (2023). Bazı endofitik ve rizosferik bakterilerin fasulyede *macrophomina phaseolina*'ya karşı etkinliklerinin *in vitro* koşullarda belirlenmesi. Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi, 27(1): 42-51.
DOI:10.29050/harranziraat.1195672

*Address for Correspondence:

Raziye KOÇAK
e-mail:
rkocak@selcuk.edu.tr

Received Date:

27.10.2022

Accepted Date:

27.12.2022

© Copyright 2018 by Harran University Faculty of Agriculture. Available on-line at www.dergipark.gov.tr/harranziraat



This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.

ÖZ

Macrophomina phaseolina (Tassi) Goid. geniş konukçu aralığına sahip toprak kökenli bir hastalık olup mücadelesi oldukça zordur. Bundan dolayı, çalışmamızda 2021 yılında Konya'nın Çumra ilçesinden alınan fasulye bitkilerinin farklı kısımlarından (çiçek, gövde, kök ve yaprak) ve topraktan elde edilen toplam 71 bakterinin hastalığa karşı *in vitro* etkinliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. İkili kültür testlerinde %60 ve üzerinde etki gösteren bakteriler için bazı biyokimyasal testler (Hidrojen siyanid aktivitesi, fosforu çözme yeteneği, siderofor sentez kabiliyeti, indol asetik asit üretebilme yetenekleri ve ACC deaminaz aktivitelerinin belirlenmesi) uygulanmıştır. Deneme sonucunda değerlendirmeler yapılmış ve bu testler puanlandırılarak en yüksek etkiyi gösteren bakteriler daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere seçilmiştir. *Macrophomina phaseolina*'ya karşı ikili kültür denemelerinde başarılı olan izolatlar; yapraktan izole edilen *Bacillus pumilus* DP 25 (%91), rizosferik *Bacillus subtilis* DP 143.6 (%86) ve rizosferik *Bacillus cereus* DP 145.1 (%100) olmuştur. Yüksek düzeyde etkili olan bu izolatların fosforu çözme kabiliyetleri, siderofor sentez yetenekleri ve indol asetik asit kabiliyetleri pozitif olarak belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Bacillus*, *Macrophomina*, Siderofor, *In vitro*, Fasulye

ABSTRACT

Macrophomina phaseolina (Tassi) Goid is a soil-borne disease with a wide host range and is very difficult to control. In our study, a total of 71 bacteria were obtained from different parts (flower, stem, root and leaf) of bean plants and soil taken from Çumra district of Konya in 2021 and *in vitro* efficacies of bacteria against disease were determined. Some biochemical tests (hydrogen cyanide activity, phosphorus solubilization ability, siderophore synthesis ability, indole acetic acid production ability and determination of ACC deaminase activities) were applied for bacteria that had an effect of 60% or more in double culture tests. At the end of the experiment, we were evaluated our data and these tests were scored and the bacteria showing the highest effect were selected for use in further studies. Isolates that were successful in dual culture tests against *Macrophomina phaseolina* were *Bacillus pumilus* DP 25 (91%), rhizospheric *Bacillus subtilis* DP 143.6 (86%), and rhizospheric *Bacillus cereus* DP 145.1 (%100) isolated from leaves. Phosphorus solubility, siderophore synthesis abilities and indole acetic acid abilities of these highly effective isolates were determined as positive.

Key Words: *Bacillus*, *Macrophomina*, Siderophore, *In vitro*, Bean

Giriş

Macrophomina Phaseolina (Tassi) Goid, hastalık seyri ve konukçu ile etkileşimi nedeniyle birçok bitki türünde kömür çürüklüğü hastalığına neden olan polifag bir fungal hastalık etmenidir (Schwartz ve ark., 2005; Reznikov ve ark., 2019). Fasulyede özellikle fidelerin kök, yaprak ve gövde gibi kısımlarında dayanıklı yapılar meydana getirdiği için kimyasal olarak mücadelesinin oldukça zor olmasının yanında kullanılan pestisitler toprağın mikrobiyal dengesini bozmaktadır. Bundan dolayı entegre mücadelede biyolojik mücadele tekniklerinin kullanılması sürdürülebilir tarıma bir alternatif oluşturmaktadır (Marquez ve ark., 2021). Ayrıca, *M. phaseolina* enfeksiyonu fasulyenin tane veriminde %10,8 ve protein içeriğinde %12,3 azalmaya neden olmaktadır (Kaushik ve ark., 1987). Hastalık etmeninin ülkemizde fasulye yetiştiriciliğinin yapıldığı alanlarda varlığı yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur (Vural ve Soylu, 2012).

Biyolojik yaklaşımlar arasında toprakta veya bitkilerde bulunan mikroorganizmaların antagonistik etkileri ile bitkilerde hastalıkların önlenmesine yardımcı olmaları popüler hale gelmiştir. Biyokontrol etkisi, bazı bakteri türleri tarafından hidrojen siyanür (HCN), siderofor, siklik lipopeptitler, indol-3-asetik asit (IAA) üretimi ve fosfat çözünürlüğü gibi antifungal aktivite sergileyen çeşitli mekanizmalar tarafından harekete geçirilmektedir. (Keshavarz-Tohid ve ark., 2017; Bahroun ve ark., 2018) ve bu özellikler uygun bakterinin seçim şemasında yüksek performans olarak kabul edilmektedir.

Bojorquez-Armenta ve ark. (2021) fasulyenin rizosfer (kök) bölgesinden elde edilen 37 bakteri izolatının *M. phaseolina*'ya karşı antagonistik aktivitelerini araştırmışlar ve 4 *Bacillus* spp. izolatının (BA97, BN17, BN20 ve BR20) *M. phaseolina* gelişimini %62.5-85 oranında etkilediğini belirlemişlerdir. Sendi ve ark. (2020) Tunus'ta fasulye ekim alanlarından 90 endofitik ve rizosferik bakteri izolatı toplamıştır. 12 bakteri izolatının patojen olarak kullanılan *Fusarium* sp.,

Macrophomina sp. ve *Alternaria* sp. gelişimlerini %71 oranında engellediğini ve en etkili türlerin ise *Bacillus amyloliquefaciens*, *Agrobacterium fabrum* ve *Pseudomonas lini* olduğunu bildirmişlerdir. Antagonist bakterilerin kök çürüklüğünü azaltmadaki başarısının yanı sıra fasulye üretimini iyileştirme potansiyeli de yapılan çalışmalarda görülmüştür (Siddiqui ve ark., 2001).

Tarımda *Bacillus* cinsinin *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. pumilus* ve *B. subtilis* gibi farklı türleri potansiyel biyokontrol ajanları olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Bu bakteriler çok çeşitli metabolitleri (lipopeptitler, iturinler, fengisinler, polimiksinler, kurstakinler, basitrasinler gibi) sentezleme özellikleri sayesinde antagonistik aktiviteye sahip olmakta ve böylece patojenik mikroorganizmalara karşı engelleyici etkinlik göstermektedirler (Banat ve ark., 2010; Béchet ve ark., 2012; Cawoy ve ark., 2014; Soylu ve ark., 2022). Ayrıca olumsuz çevre koşullarına karşı dayanıklılık sağlayan dirençli sporlar üretme yeteneklerinden dolayı ticari ürünlerin depolanmasında kullanılmalarını mümkün hale getirmektedir (Francis ve ark., 2010).

Bu çalışmada Konya'nın Çumra ilçesinden alınan fasulye bitkilerinin farklı aksamlarından (çiçek, gövde, kök ve yaprak) ve topraktan elde edilen bakterinin *M. phaseolina*'ya karşı *in vitro* da antagonistik etkinlikleri ve biyokimyasal testler uygulanarak gösterdikleri etki mekanizmasının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Test patojeni

Test patojeni olarak kullandığımız *Macrophomina phaseolina* izolatı (daha önce patojenisite denemeleri yapılarak patojen olduğu tespit edilen) Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Mikoloji laboratuvarı kültür koleksiyonundan temin edilmiştir.

Endofitik ve rizosferik bakteriler

Fasulye bitkisinin farklı dokularından (yaprak, çiçek, kök ve gövde) ve topraktan izole edilen biyoajanlar denememizde kullanılmıştır.

Çalışmamızda etkili olduğu tespit edilen bakterilerin tür isimleri ve kodları Çizelge 1’de verildiği gibidir.

Çizelge 1. Teşhis edilen bakteriler ve kodları
Table 1. Diagnosed bacteria and their codes

Bakterinin Kodu <i>Bacteria's Code</i>	Bakterinin Tür adı <i>Species name of bacteria</i>
DP 25	<i>Bacillus pumilus</i>
DP 143.6	<i>Bacillus subtilis</i>
DP 145.1	<i>Bacillus cereus</i>

Biyolojik bakterilerin izolasyonu

Topraktan izolasyonda 10 gr elenen toprak üzerine 90 ml saf su eklenmiş ve ardından çalkalayıcıda 30 dakika boyunca çalkalanmıştır. Oluşan solüsyon 10^5 - 10^6 oranında seyreltikten sonra 35 µl nütrient agar içeren petrilere yayılmıştır.

Bitki dokularından izolasyonda bitki materyali iyice çeşme suyunda yıkandıktan sonra %1 lik NaOCl solüsyonunda 1 dakika boyunca bekletilmiş, ardından bir pens yardımıyla 3 kez steril saf sudan geçirilmiştir. Bitki dokuları steril kurutma kağıtlarında kurutulduktan sonra nütrient agar üzerine belirli aralıklarla yerleştirilmiştir. 24-48 saatlik inkübasyon süresi sonunda kontrol edilen petrilere gelişen bakteri kolonileri saf kültür elde edilene kadar nütrient agara çizilmiştir. Hem rizosferik hem de endofitik bakteriler saflaştırıldıktan sonra %30'luk gliserolde -20°C 'de saklanmıştır.

Biyokimyasal Testler

Bakterilerin antifungal aktivitelerinin belirlenmesi

Bakterilerin antifungal aktivitelerinin tespitinde ikili kültür (dual kültür) yöntemi kullanılmıştır. Denemede kullanılan *Macrophomina* izolatu, *Macrophomina*'nın mikrosklerotlarının steril kürdanlara sardırılması suretiyle uzun süreli olarak saklanmıştır. Bu nedenle taze kültürler elde edilirken bu kürdanlardan *Streptomycin* sülfat içeren PDA ortamına bir pens yardımıyla alınarak yerleştirilmiş ve 7 gün boyunca 27°C 'de inkübe edilmiştir. Elde edilen bu fungal kültürler dual kültür çalışmalarında kullanılmıştır.

İkili kültürde kullanılacak bakteriler ise 27°C 'de 24-48 saat boyunca inkübe edilmiştir. İkili kültür

yönteminde patojen, petrinin merkezine yerleştirilmiş, ardından bakteriler patojenin etrafına 3 cm'lik bir çember oluşturacak şekilde çizilmiştir. 7 gün 27°C 'de gelişen *Macrophomina* ve bakteri kültürlerinin gelişimleri hesaplanmıştır. Hesaplama;

$$\% \text{ Engelleme} = (1 - (\text{Muamelenin gelişimi} / \text{Kontrol gelişimi})) \times 100$$

formülü kullanılmıştır (Tariq ve ark., 2010).

Bakterilerin fosfatı çözme yeteneklerinin belirlenmesi

Elde ettiğimiz bakterilerin fosfatı çözme yeteneklerini belirlemek amacıyla trikalsiyum fosfat içeren Pikovskaya (1948) besiyeri kullanılmıştır. Nütrient agarda 24-48 saat inkübe edilen bakteri kültürlerinden hazırlanan 10^8 hücre/ml yoğunluktaki solüsyonlardan petrilere merkezine ekim yapılmıştır. İnkübatörde 27°C 'de 3 gün boyunca bekletildikten sonra petrilere meydana gelen açık renkli alan pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Bakterilerin Indol-3-asetik asit (IAA) sentez yeteneklerinin belirlenmesi

Indol -3- asetik asit testi çeşitli araştırmacıların kullandığı yöntemlerden düzenlenerek uygulanmıştır (Akbaba, 2014; Ambrosini ve Passaglia, 2017; Babier ve Akköprü, 2017; Aktan ve Soylu, 2020; Kaya Özdoğan, 2020). Bakterileri geliştirmek amacıyla kullanılan 1g/l oranında L-triptofan içeren LB besiyerine 10^8 hücre/ml yoğunlukta bakteri eklenmiştir. Bakteriler 30°C 'de 3 gün 200 rpm'de inkübe edilmiş, 5000 rpm'de 30 dakika santrifüj edildikten sonra 1 ml supernatant üzerine 2 damla ortofosforik asit damlatılmıştır. Ardından bu karışım üzerine 4 ml Salkowski ayracı eklenmiştir. 30 dakika sonunda meydana gelen pembe renk pozitif olarak değerlendirilmiştir.

HCN üretiminin belirlenmesi

Elde edilen bakterilerin hidrojen siyanid aktiviteleri Bakker ve Schippers (1987)'a göre yapılmıştır. Tryptic Soy Agar içeren besiyerinin

kapak kısmına Pikrik asit- karbonat solusyonuna batırılan filtre kağıtları yerleştirilmiş bakteriler 3-5 gün 28 °C'de geliştirilmiştir. Kâğıdın renginin kahverengi-turuncuya dönüştüğü petrilerdeki bakterilerin siyanid aktivitesi pozitif olarak değerlendirilmiştir.

ACCD aktivitelerinin belirlenmesi

Bu test Ambrosini ve Passaglia (2017)'ya göre yapılmıştır. Testte DF besiyeri kullanılmıştır. Petrilerin üzerine 50 µl 0.5 M ACC yayılmıştır. Her bir bakteri izolatu hem ACC içeren hem de içermeyen DF besiyerine çizilmiştir. 27 °C'de 48-72 saatlik inkübasyonu takiben ACC'li besiyerinde, ACC içermeyen besiyerine göre daha iyi bakteri gelişiminin gözlemlenmesi pozitif olarak kabul edilmiştir.

Siderofor sentez yeteneklerinin belirlenmesi

Bakterilerin siderofor üretimine ilişkin testler Schwyn ve Neillands (1987)'e göre yapılmıştır. 10⁸ hücre/ml yoğunlukta hazırlanan bakterilerden Blue-CAS Agara nokta ekim yapılmıştır. Gelişen bakteri kolonilerinin çevresindeki turuncu-sarı renkli zonlar pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Tartılı derecelendirme sistemine göre bakterilerin değerlendirilmesi

8 farklı tarladan alınan fasulye örnekleri ve toprak örneklerinden yapılan izolasyonlar sonucunda elde edilen bakteriler öncelikle dual kültür çalışmalarında patojene karşı etkili olan örneklerden seçilmiştir. Çizelge 2'de belirtildiği gibi tartılı derecelendirme sistemindeki diğer parametrelere göre değerlendirilen bakterilerden bu sisteme göre en yüksek puanlamaya sahip olan bakteriler daha etkili olarak değerlendirilmiştir.

Çizelge 2. Tartılı derecelendirme puan tablosu
Table 2. Weighed grading score table

In Vitro Testler In vitro Tests	Test Sonuçlarına Verilen Puan Score Given to Test Results
Indol Asetik Asit (IAA) Salgılama Testi	15
Fosfatın (P) Çözünürlüğü Testi	10
Siderofor Salgılama Testi	20
ACC Aktivite Testi	20
İn vitro Biyokontrol Etki Testi	25
HCN Üretimi	10
Toplam	100

Araştırma Bulguları ve Tartışma

Fasulyenin farklı aksamaları ve topraktan elde edilen bakteriler

Bakteri elde etmek amacıyla 8 farklı tarladan toprak ve sağlıklı fasulye örnekleri alınmıştır. Yapılan izolasyonlar sonucunda fasulyenin farklı aksamalarından (yaprağından 24, çiçeğinden 14, gövdesinden 17, kökünden 8 bakteri izolatu) ve topraktan (8 adet bakteri izolatu) toplam 71 bakteri saflaştırılmıştır.

İn vitro çalışma sonuçlarına göre etkililiği yüksek olan üç bakterinin teşhisleri yapılmış ve *Bacillus* cinsine ait bu bakteriler *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis* ve *Bacillus cereus* olarak tanımlanmıştır.

İzolatların antagonistik aktiviteleri

Tüm izolatların antagonistik aktivitelerini belirlemek amacıyla ikili kültür testleri uygulanmıştır. Toplam 71 bakteriden 25'i *Macrophomina* gelişimini farklı düzeylerde etkilemiş olup 6'sı fungal gelişimi tamamen baskılamıştır. 25 bakteriden 24'ü %70 in üzerinde etkili olurken, 4'ü ise %60-70 arasında etkili olmuştur. Bakteriler değerlendirilirken yapılan tüm biyokimyasal testlerin sonuçları bir bütün olarak değerlendirildiğinden %100 etki gösteren bakterilerde etki düzeyleri arasında farklılıklar gözlemlenmiştir. İkili kültürlerde %60-100 arasındaki oranlarda patojeni inhibe etme yeteneği görülmüştür (Çizelge 3). 6 izolatu en yüksek (%100) etkiye sahip olduğu kömür çürütmesini durdurabilecek başarıyı gösterdiği tespit edilmiştir. Bitkilerin farklı kısımlarından elde edilen bakterilerin dual kültürde engelleme yüzdelerinin ortalamaları değerlendirildiğinde gövdeden elde edilen bakteriler %94.17 oranında çiçekten elde edilenler ise %92 etkili olmuştur. Kökten izole edilen bakteriler inhibisyon zonu oluşturmamıştır. Rizosferik bakteriler yaklaşık %81 oranında etki göstermişlerdir.

Çizelge 3. En iyi 25 bakterinin ikili kültür (Dual) testi
Table 3. Dual culture (Dual) test of the best 25 bacteria

	Bakteri Kodu Bacteria Code	Elde Edildiği Bitki Aksamı ya da toprak Plant Part or soil from which it is obtained	%Engelleme Oranı Blocking Rate%	%Ortalama Engelleme Oranı Average Blocking Rate%
1	DP25	Çiçek	91	92
2	DP64		93	
3	DP6	Yaprak	64	78.29
4	DP31		81	
5	DP32		92	
6	DP33		60	
7	DP55		86	
8	DP56		65	
9	DP68		100	
10	DP81		100	
11	DP 102	Gövde	86	94.17
12	DP105		79	
13	DP107		100	
14	DP122		100	
15	DP123		100	
16	DP141.1	Toprak	92	80.7
17	DP 143.1		72	
18	DP143.2		65	
19	DP143.5		79	
20	Dp143.6		86	
21	DP145.1		100	
22	DP145.3		88	
23	DP 146.2a		73	
24	DP148.1		74	
25	DP148.3		78	

İndol-3-asetik asit (IAA) üretimi

Farklı düzeylerde antifungal aktivite gösteren 25 bakterinin IAA üretim durumları ve miktarları test edildiğinde 13 izolatin IAA ürettiği belirlenmiştir. Üretim miktarları 1.4- 9.8 ppm arasında değişim göstermiştir. Maksimum IAA

üretimi 9.8 ppm ile DP 143.2 izolatu iken, bu izolatu DP 122 (8.1 ppm), DP 6 (8 ppm) ve DP 56 (8 ppm) takip etmektedir (Çizelge 4). 12 izolat ise IAA üretimi yönünden negatif olarak değerlendirilmiştir.

Çizelge 4. IAA üreten Bakteri izolatları ve üretim miktarları
Table 4. Bacterial isolates producing IAA and their production amounts

Sıra No Sequence No.	Bakteri Kodu Bacteria Code	IAA testi (ppm) IAA test (ppm)	Sıra No Sequence No.	Bakteri Kodu Bacteria Code	IAA testi (ppm) IAA test (ppm)
1	DP6	8	14	DP122	8.1
2	DP25	7.3	15	DP123	-
3	DP31	-	16	DP141.1	-
4	DP32	-	17	DP 143.1	-
5	DP33	6.5	18	DP143.2	9.8
6	DP55	6.7	19	DP143.5	-
7	DP56	8	20	Dp143.6	7.1
8	DP64	1.4	21	DP145.1	6.7
9	DP68	-	22	DP145.3	-
10	DP81	-	23	DP 146.2a	-
11	DP 102	-	24	DP148.1	6.8
12	DP105	6.9	25	DP148.3	6.9
13	DP107	-			

Siderofor üretimi

Denememizde kullandığımız bakterilerin siderofor üretilip üretilmediğini ve miktarını belirlemek amacıyla CAS Blue agar kullanılmıştır. Bakterilerin nokta ekimleri yapılmış ve bakteri gelişiminin çevresinde meydana gelen turuncu-

sarı renkli zon pozitif olarak değerlendirilmiştir. Buna göre 22 bakterinin 2-32 mm çapında zon oluşturduğu ve sonuç olarak siderofor üretebildikleri gözlenmiştir (Çizelge 5). Elde edilen bakterilerin ortalama siderofor üretimi ise 11.77'dir.

Çizelge 5. Siderofor üreten bakteri izolatları ve siderofor üretme düzeyleri
Table 5. Siderophore producing bacterial isolates and siderophore production levels

Sıra No Sequence No.	Bakteri Kodu Bacteria Code	Siderofor Üretimi (mm) Siderophore Production (mm)	Sıra No Sequence No.	Bakteri Kodu Bacteria Code	Siderofor Üretimi (mm) Siderophore Production (mm)
1	DP6	6	14	DP122	8
2	DP25	4	15	DP123	-
3	DP31	14	16	DP141.1	15
4	DP32	13	17	DP 143.1	15
5	DP33	4	18	DP143.2	11
6	DP55	8	19	DP143.5	9
7	DP56	32	20	Dp143.6	11
8	DP64	-	21	DP145.1	3
9	DP68	13	22	DP145.3	14
10	DP81	17	23	DP 146.2a	12
11	DP 102	10	24	DP148.1	2
12	DP105	-	25	DP148.3	27
13	DP107	11			
Ortalama			11.77		

HCN belirleme

Hidrojen siyanid aktivitesi değerlendirilen 25 bakteriden 4'ü (DP 123, DP141.1, DP143.2 ve DP143.5) filtre kağıdının rengini kahverengi-turuncuya değiştirdiğinden HCN ürettiği gözlenmiş ve pozitif olarak kabul edilmiştir (Çizelge 6).

ACC deaminaz aktivitesi

Taranan izolatlar arasında sadece DP68 ve DP 31'in ACC deaminaz üretimi pozitif olarak belirlenmiştir (Çizelge 6).

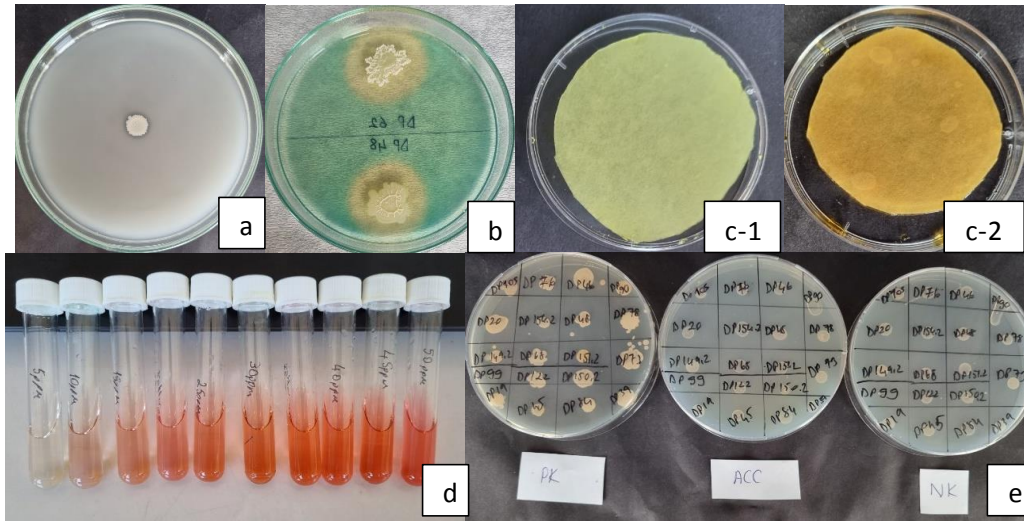
Fosfat çözünürlüğü

Elde edilen bakterilerden 14'ü fosfor çözünürlüğü açısından pozitif olarak değerlendirilmiştir (Çizelge 6).

Bakteriyel izolatların biyokimyasal testlerde gösterdikleri aktivitelere örnek teşkil eden görseller Şekil 1'de verilmiştir.

Tartılı derecelendirme sistemine göre değerlendirme

Tartılı derecelendirme sisteminde biyokimyasal ve dual kültür test sonuçları puanlanarak bir tablo oluşturulmuştur (Çizelge 6). Buna göre 70 puan baz alınmış ve DP 25, DP 143.6, DP 145.1 izolatları en yüksek aktiviteyi göstererek teşhisleri yapılmıştır. Buna göre sırasıyla *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis* ve *Bacillus cereus* olarak tanımlanan bakterilerin dual kültür testlerinin yanında genel olarak biyokimyasal deneme (siderofor üretme, fosforu çözme ve IAA üretimi) sonuçları da pozitif çıkmıştır.



Şekil 1. Bakteriyel izolatların örnek biyokimyasal aktivite görünüşleri. a) Fosfor çözünürlüğü, b) Siderofor oluşumunu, c-1) HCN oluşumu negatif, c-2) HCN oluşumu pozitif, d) IAA üretim skalası, e) ACC deaminaz aktivitesi

Figure 2. Sample biochemical activity views of bacterial isolates. a) Phosphorus solubility, b) Siderophore formation, c-1) HCN formation negative, c-2) HCN formation positive, d) IAA production scale, e) ACC deaminase activity

Çizelge 6. Tartılı derecelendirme sistemine göre 60 puan ve üzerinde etki gösteren bakteriler

Table 6. Bacteria showing 60 points or more according to the scaled grading system

	Bakteri Kodu <i>Bacteria Code</i>	ACC ACC	Siderofor üretme kabiliyetleri <i>Siderophore generation capabilities</i>	Fosforu Çözme Testi <i>Phosphorus Dissolving Test</i>	IAA testi <i>IAA testi</i>	HCN HCN	Dual Dual
1	DP6	-	+	-	+	-	+
2	DP25	-	+	+	+	-	+
3	DP31	+	+	-	-	-	+
4	DP32	-	+	-	-	-	+
5	DP33	-	+	+	+	-	+
6	DP55	-	+	-	+	-	+
7	DP56	-	+	+	+	-	+
8	DP64	-	-	-	+	-	+
9	DP68	+	+	-	-	-	+
10	DP81	-	+	+	-	-	+
11	DP 102	-	+	+	-	-	+
12	DP 105	-	-	-	+	-	+
13	DP 107	-	-	-	-	-	+
14	DP122	-	+	-	+	-	+
15	DP 123	-	-	-	-	+	+
16	DP141.1	-	+	+	-	+	+
17	DP143.1	-	+	+	-	-	+
18	DP143.2	-	+	-	+	+	+
19	DP143.5	-	+	+	-	+	+
20	Dp143.6	-	+	+	+	-	+
21	DP145.1	-	+	+	+	-	+
22	DP145.3	-	+	+	-	-	+
23	DP146.2a	-	+	+	-	-	+
24	DP148.1	-	+	+	+	-	+
25	Dp148.3	-	+	+	+	-	+

Araştırmamızda yapmış olduğumuz tüm testler değerlendirilerek bakteri izolatlarından en yüksek etkiyi gösterenler MALDI-MS analizi (Uysal ve ark, 2019) ile *Bacillus* cinsi olarak tanımlanmıştır. Sağlıklı sebze bitkilerinin yanısıra meyve ağaçlarının farklı bitki kısımlarından izole edilen *Bacillus* cinsine dahil bakteri türlerinin toprak ve yaprak kökenli bitki hastalık etmenlerine karşı yüksek düzeyde antifungal etkilerinin farklı kimyasal yapısında metabolitleri sentezleme yeteneğinden kaynaklandığı, bu yüzden bu türlere ait izolatların tarımda hastalıkla biyolojik mücadelede önemli bir öneme sahip olduğu önceden yapılmış çalışmalarla ortaya konulmuştur (Sabaté ve ark., 2020; Kara & Soylu, 2022). Potansiyel biyokontrol ajanı olmalarının yanında bu türler bitki büyümesini teşvik eden oksinler, IAA, siderofor ve lipopeptitler gibi metabolitleri sentezleyerek, fosforu çözerek de bitki sağlığını iyileştirdikleri bilinmektedir (Sabaté ve ark., 2018; Aktan & Soylu, 2019). Çok sayıda çalışma bu etkinin lipopeptit sentezinden kaynaklandığını bildirmiştir (Singh ve ark., 2008; Cawoy ve ark., 2014; Li ve ark., 2014; El Arbi ve ark., 2016; Kumar ve ark., 2016; Torres ve ark., 2017). Correa ve arkadaşları (2014) fasulyede *M. phaseolina* ile enfekteli topraklarda biyokontrol ajanı olarak *B. cereus*'un etkisini incelemişler ve kontrole kıyasla bitki üzerindeki patojenin şiddetini ve ilerlemesini %14 ve %28 oranında azalttığını belirlemişlerdir. Çalışmamızda bakteri izolatlarının yüksek antifungal (%100) aktivite göstermeleri potansiyel biyoajan olabileceklerini göstermektedir. Başka bir çalışmada da *B. subtilis* BN1'inde fasulye kök çürüklüğü hastalığı ile ilişkili *M. phaseolina*' ya karşı biyokontrol potansiyelinin olduğu tespit edilmiştir (Singh ve ark., 2008).

Bacillus spp. çok çeşitli faydalı maddeleri sentezleyebilmeleri nedeniyle güvenli mikroorganizmalar olarak kabul edilir (Stein, 2005). Bu bakteriler kök büyümesini ve doku farklılaşmasını etkileyen önemli fitohormonlardan biri olan indol-3-asetik asidi (IAA) sentezlerler (Babalola, 2010). *Bacillus* spp. *in vitro* da önemli düzeyde IAA üretmektedir (Singh ve ark., 2008).

Çalışmamızdaki tüm izolatlar (üç tanesi hariç) L-triptofan içeren LB besiyerinde IAA üretimi geliştirildiklerinden benzer bulgular gözlenmiştir.

Bitki beslemede temel diğer bir besin maddesi de demirdir, bitki doğal ortamlarda bu elementin bitki tarafından alınımı oldukça zordur. *Bacillus* cinsi bakteriler özellikle demiri tutabilen ve onu çözümlürebilen, ardından bitkiye çözünür demir sağlayan, böylece büyümesini teşvik ederken aynı zamanda fitopatojen fungus ve bakterilerin büyümesini sınırlandıran şelat gibi davranan sideroforları sentezlemektedirler (Babalola, 2010; Atay ve ark., 2020; Soylu ve ark., 2021). Çalışmamızda DP56 tarafından daha yüksek miktarda siderofor üretimi (32 mm) bitki büyümesini teşvik edici özelliklerini ve çeşitli fitopatojenlere karşı antagonistik doğasını kanıtlamaktadır. Hedef fitopatojenlerin radyal büyümesinde azalmaya bağlı inhibisyon bölgelerinin oluşumu kitinolitik enzimler, laminarinaz, selülaz, HCN, antibiyotikler, siderofor ve besin rekabeti gibi antimikrobiyal maddelerin üretiminden kaynaklanabilmektedir (Chung ve ark., 2008; Singh ve ark., 2008).

Sonuçlar

Sonuç olarak çalışmamızda yapılan IAA, fosfor çözme, ACCD üretimi ve siderofor üretebilme yeteneklerinin tespiti bitkilerin belirli savunmalarını tetikleyerek fasulyede *M. phaseolina* enfeksiyonuna karşı bitki bağışıklığının geliştirilmesinin yanı sıra doğal, kalıcı, dayanıklı ve sistemik koruma sağladığı sonucuna varılabileceğimizi göstermiştir. Elde ettiğimiz rizosferik ve endofik bakterilerin büyük bir çoğunluğunun ticari fasulye yetiştiriciliğinde fitopatojen funguslara karşı biyokontrol ajanı olarak hareket edebileceği aynı zamanda sağlıklı toprak, besin ve faydalı mikroorganizmalar açısından faydalı olabileceği ve böylece tarımsal üretimi iyileştirmek için gerekli toprak kalitesinin iyileştirilmesine de katkıda sağlayacağı görülmüştür.

Ekler

Bu çalışma, Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiş olan 21401059 nolu proje kapsamında yapılmıştır.

Çıkar Çatışması: Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

Yazar Katkısı: Arazi ve laboratuvar çalışmaları Raziye KOÇAK ve Özden SALMAN tarafından yürütülmüştür. Makalenin yazımı Özden SALMAN ve Raziye KOÇAK katkısı ile gerçekleştirilmiş olup, makalenin son hali yazarlar tarafından okunarak onaylanmıştır.

Kaynaklar

- Akbaba, M. (2014). Bitki gelişimini artıran bakteriyel endofitlerin hıyar bakteriyel köşeli yaprak leke hastalığının (*Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*) önlenmesinde kullanılabilecek olanakları. Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma ana Bilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi.
- Aktan, Z.C. ve Soylu, S. (2020). Diyarbakır ilinde yetişen badem ağaçlarından endofit ve epifit bakteri türlerinin izolasyonu ve bitki gelişimini teşvik eden mekanizmalarının karakterizasyonu. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi, 23(3), 641-654.
- Ambrosini, A. & Passaglia, L.M. (2017). Plant growth-promoting bacteria (PGPB): isolation and screening of PGP activities. Current Protocols in Plant Biology, 2(3), 190-209.
- 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.
- Babalola, O.O. (2010). Beneficial bacteria of agricultural importance. Biotechnol. Lett., 32, pp. 1559-1570.
- Babier, Y. ve Akköprü, A. (2020). Çeşitli kültür bitkilerinden izole edilen endofitik bakterilerin karakterizasyonu ve bitki patojeni bakterilere karşı antagonistik etkilerinin belirlenmesi. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi, 30(3), 531-534.
- Bahroun, A., Jousset, A., Mhamdi, R., Mrabet, M. & Mhadhbi, H. (2018). Anti-fungal activity of bacterial endophytes associated with legumes against *Fusarium solani*: assessment of fungi soil suppressiveness and plant protection induction. Applied soil ecology, 124, :131-140.
- Bakker, A.W. & Schippers, B. (1987). Microbial cyanide production in the rhizosphere in relation and

Pseudomonas spp-mediated plant growth-stimulation. Soil Biology and Biochemistry, 19, pp. 451-457.

- Banat, I.M., Franzetti A., Gandolfi, I., Bestetti, G., Martinotti, M.G., Fracchia, L., ... Marchant R. (2010). Microbial biosurfactants production, applications and future potential. Applied Microbiology and Biotechnology, 87, pp. 427-444.
- Béchet M., Caradec T., Hussein W., Abderrahmani A., Chollet M., Leclère V., ... Jacques, P. (2012). Structure, biosynthesis, and properties of kurstakins, nonribosomal lipopeptides from *Bacillus* spp. Applied Microbiology and Biotechnology, 95, pp. 593-600.
- Bojorquez-Armenta, Y.D.J., Mora-Romero, G.A., Lopez-Meyer, M., Maldonado-Mendoza, I.E., Castro-Martinez, C., Romero-Urias, C.D.L.A. & Martinez-Alvarez, J.C. (2021). Evaluation of *Bacillus* spp. isolates as potential biocontrol agents against charcoal rot caused by *Macrophomina phaseolina* on common bean. Journal of General Plant Pathology, 87(6), 377-386.
- Cawoy, H., Debois D., Franzil, L., De Pauw, E., Thonart, P. & Ongena, M. (2014). Lipopeptides as main ingredients for inhibition of fungal phytopathogens by *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens*. Microbial Biotechnology, 8, pp. 281-295.
- Chung, S., Kong, H., Buyer, J.S., Lakshman, D.K., Lydon, J. & Kim, S.D. (2008). Isolation and partial characterization of *Bacillus subtilis* ME488 for suppression of soilborne pathogens of cucumber and pepper. Applied Microbial Biotechnology, 80 (1), pp. 115-123.
- Correa, B.O., Shafer, J.T. & Moura, A.B. (2014). Spectrum of biocontrol bacteria to control leaf, root and vascular diseases of dry bean. Biological. Control, 72, pp. 71-75.
- El Arbi, A., Rochex, A., Chataign, G., Béchet, M., Lecouturier, D., Arnauld, S., ... Jacques, P. (2016). The Tunisian oasis ecosystem is a source of antagonistic *Bacillus* spp. producing diverse antifungal lipopeptides. Research in Microbiology, 167, pp. 46-57.
- Francis I., Holsters M. & Vereecke D. (2010). The Gram-positive side of plant-microbe interactions. Environ. Microbiol., 1, pp. 1-12.
- 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.
- Kaushik, C.D., Chand J. & Saryavir, N. (1987). Seedborne nature of *Rhizoctonia bataticola* causing leaf blight of mung bean. Indian Journal of Mycology and Plant Pathology. 17, pp. 153-157.
- Kaya Özdoğan, D. (2020). Ankara ili topraklarından bitki büyümesini teşvik edici bakterilerin izolasyonu, tanımlanması ve genetik çeşitliliklerinin belirlenmesi. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi.
- Keshavarz-Tohid, V., Taheri P., Muller, D., Prigent-Combaret, C., Vacheron, J., Taghavi, S.M. & Moënne-Loccoz, Y. (2017). Phylogenetic diversity and antagonistic traits of root and rhizosphere

- pseudomonads of bean from Iran for controlling *Rhizoctonia solani*. Research in Microbiology, 168, pp. 760–772.
- Kumar P., Pandey P., Dubey R.C. & Maheshwari D.K. (2016). Bacteria consortium optimization improves nutrient uptake, nodulation, disease suppression and growth of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) in both pot and field studies. Rhizosphere, 2, pp. 13-23.
- 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, pp. 493-499.
- Li, B., Li, Q., Xu, Z., Zhang, N., Shen, Q. & Zhang, R. (2014). Response of beneficial *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 to different soilborne fungal pathogens through the alteration of antifungal compounds production. Front. Microbiol., 5, p. 636.
- Marquez, N., Giachero, M.L., Declerck, S. & Ducasse, D.A. (2021). *Macrophomina phaseolina* general characteristics of pathogenicity and methods of control. Frontiers in Plant Science, 12, pp. 1-16. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.634397>.
- Pikovskaya, R.I. (1948). Mobilization of Phosphorus in Soil Connection with the Vital Activity of Some Microbial Species. Microbiology, 17, 362-370.
- Reznikov, S., De Lisi, V., Claps, P., González, V., Devani, M.R., ... Castagnaro, A.P. (2019). Evaluation of the efficacy and application timing of different fungicides for management of soybean foliar diseases in northwestern Argentina. Crop Protection, 124, 104844. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2019.104844>.
- Sabaté, D.C., Pérez Brandan, C., Petroselli, G., Erra Balsells, R. & Audisio, M.C. (2018). Biocontrol of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary on common bean by native lipopeptide-producer *Bacillus* strains. Microbiological Research, 211, pp. 21-30.
- Sabaté Daniela C., Gabriela Petroselli, Rosa Erra-Balsells, M. Carina Audisio & Carolina Pérez Brandan. (2020). Beneficial effect of *Bacillus* sp. P12 on soil biological activities and pathogen control in common bean, Biological Control, 141, 104131., ISSN 1049-9644. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.104131>.
- Schwartz H.F., Steadman J.R., Hall R. & Foster R.L. (2005). Compendium of Bean Diseases. (second ed.) p. 120.
- Schwyn, B. & Neilands, J.B. (1987). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. Anal Biochem., 160, pp. 47-56.
- Sendi, Y., Pfeiffer, T., Koch, E., Mhadhi, H. & Mrabet, M. (2020). Potential of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) root microbiome in the biocontrol of root rot disease and traits of performance. Journal of Plant Diseases and Protection 127, pp. 453-462.
- Siddiqui, I.A., Ehetshamul-Haque, S. & Shahid Shaukat, S. (2001). Use of rhizobacteria in the control of root rot-knot disease complex of mungbean. J. Phytopathol., 149, pp. 337-346.
- Singh, N., Pandey, P., Dubey, R.C. & Maheshwari, D.K. (2008). Biological control of root rot fungus *Macrophomina phaseolina* and growth enhancement of *Pinus roxburghii* (Sarg.) by rhizosphere competent *Bacillus subtilis* BN1. World J. Microbiol. Biotechnol., 24, pp. 1669-1679.
- Soylu, S., Kara, M., Soylu, 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.
- 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*. Zemdirste-Agriculture, 108, 303-312.
- Stein T. (2005). *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. Mol Microbiol, 56 (4), pp. 845-857.
- Tariq, M., Yasmin, S. & Hafeez, F.Y. (2010). Biological control of potato black scurf by rhizosphere associated bacteria. Brazilian Journal of Microbiology (2010) 41: 439-451.
- Torres, M.J., Pérez, C., Brandan, D., Sabaté, C., Petroselli, G., Erra-Balsells, R. & Audisio, M.C. (2017). Biological activity of the lipopeptide-producing *Bacillus amyloliquefaciens* PGPBacCA1 on common bean *Phaseolus vulgaris* L. Pathogens. Biol. Control, 105, pp. 93-99.
- Uysal, A., Kurt, Ş., Soylu, S., Soylu, E.M. & Kara, M. (2019). Yapağı yenen sebzelerdeki mikroorganizma türlerinin MALDI-TOF MS (Matris Destekli Lazer Desorpsiyon/İyonizasyon Uçuş Süresi Kütle Spektrometresi) tekniği kullanılarak tanınması. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi, 29, 595-603.
- Vural, C. & Soylu, S. (2012). Prevalence and incidence of fungal disease agents affecting bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants. Research on Crops, 13, 634-640.