

Sardunya (*Pelargonium* spp.) bakteriyel yanıklık etmeni *Xanthomonas axonopodis* pv. *pelargonii*'nin biyolojik mücadelesi üzerine araştırmalar¹

Sencan ÜNLÜ², Yeşim AYSAN²

Research on biological control of *Xanthomonas axonopodis* pv. *pelargonii*, geranium (*Pelargonium* spp.) bacterial blight disease agent

Abstract: *Xanthomonas axonopodis* pv. *pelargonii* is a bacterium causing leaf spots and necrosis, bacterial blight and rot on stem, wilting on geranium (*Pelargonium peltatum* and *Pelargonium hortorum*) plants. In the biological control studies of the disease, 16 soil samples were taken from geranium rhizosphere in Adana for isolating candidate plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). Totally 234 candidate PGPRs were isolated from samples. Among 60 PGPR strains were solubilized phosphorus on solid NBRIP medium. Five selected PGPR strains were tested to reduce disease by pot studies. Two PGPR strains reduced disease incidence at 88-100 % for leaf infections and one PGPR strain significantly reduced disease incidence at 63 % for stem infections.

Key words: *Pelargonium*, bacteria, *Xanthomonas*, PGPR, phosphorus

Özet: *Xanthomonas axonopodis* pv. *pelargonii* adlı bakteri, Sardunya (*Pelargonium peltatum* ve *Pelargonium hortorum*) bitkilerinde yaprak lekesi ve yaprak yanıklığı, bakteriyel gövde çürüklüğü ve solgunluk belirtilerine neden olur. Bu hastalığın biyolojik mücadelesi ile ilgili çalışmalarda, Adana'da sardunya yetiştirilen farklı alanlardan bitki büyümesini teşvik eden rizobakterileri (PGPR) izole etmek için toplam 16 adet toprak örneği alınmıştır. Örneklerden toplam 234 adet aday PGPR izole edilmiştir. Katı NBRIP besi yeri kullanılarak bu bakteri izolatlarından 60'nun fosforu çözdüğü belirlenmiştir. En yüksek fosfor çözen 5 izolat seçilerek saksı çalışmasında hastalığı engelleme yeteneği araştırılmıştır. Yaprak enfeksiyonunu iki PGPR izolatı % 88-100 oranında, bir PGPR izolatı gövde enfeksiyonunu % 63 oranında engellemiştir.

Anahtar sözcükler: *Pelargonium*, bakteri, *Xanthomonas*, PGPR, fosfor

Giriş

Süs bitkileri sahip oldukları çeşitli özellikleriyle yaşantımızın hemen her alanında yerini almıştır. Çevre estetiği ve güzelliği açısından olduğu kadar insan sağlığı ve milli ekonomiye katkılarından dolayı ülkemizde süs bitkileri üretimi yeni gelişen ve hızla büyüyen tarımsal bir sektör olarak karşımıza çıkmaktadır. Kesme çiçek

¹Bu çalışma, ZF.2006.YL58 nolu projeye Çukurova Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenen yüksek lisans tezinin bir bölümüdür.

²Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, 01330, Sarıçam, Adana
Sorumlu yazar (Corresponding author) e-mail: aysanys@.edu.tr

Alınış (Received): 06.05.2011

Kabul ediliş (Accepted): 28.09.2011

üretiminde Antalya, dış mekan süs bitkileri üretiminde İzmir, Yalova ve Sakarya, iç mekan süs bitkileri üretiminde ise Yalova ve Adana illeri ilk sıralarda yer almaktadır (Sözen et al. 1991).

Süs bitkileri sektörü hızla büyümesine rağmen bu konuda giderek çeşitlenen ve artan ihtiyaçları tam olarak karşılayacak bir yurt içi üretim kapasitesine ve teknolojik seviyeye henüz ulaşamamıştır. Ortaya çıkan süs bitkileri açığı yurt dışı kaynaklı çelik, fide, fidan ve yetişkin bitkilerle kapatılmaya çalışılmaktadır (Sözen et al. 1991; Zencirkıran 2004). İthalatı yapılan türler iç ve dış mekanda farklı amaçlar için kullanılmaktadır. Yurtdışı kaynaklı iç mekan bitki türlerinin fideleri sera koşullarında büyütülerek pazarlanmaktadır. Süs bitkileri sektörünün gelişmesiyle beraber üretim materyali ithalatı ile ülkemize yeni hastalıkların girişi de olabilmektedir.

Son yıllarda ev balkonları ve bahçe düzenlemelerinde en fazla kullanılan süs bitkilerinden biri de sardunyalardır. Bu süs bitkisi halk arasında nerdane olarak da adlandırılmaktadır. En yaygın yetiştirilen sardunyalar, dik gelişimli çalı tipindekiler (*Pelargonium x hortorum* ve *Pelargonium x zonale*), sarkıcı formlu sakız sardunyalar (*Pelargonium peltatum*), yaprakları ve çiçekleri katmerli olan Şükriye hanım (*Pelargonium x domesticum*) ve ıtır (*Pelargonium graveolens*)'dır. Sardunya, *Pelargonium* takımından *Geraniaceae* familyasından olan bir süs bitkisidir. Yaprakları parçalı, orta kısımları açık, kenarları koyu; çiçekleri yalınkat veya katmerli ve değişik renklerde (kırmızı, mor, pembe, beyaz vb) olan bir süs bitkisidir. Vejetatif üretimle (çelikle) ve tohumla tüm dünyada yetiştiriciliği yapılmaktadır. 1996 yılında sardunyaların satışından elde edilen gelir sadece Amerika Birleşik Devletlerinde 205 milyon \$ civarındadır (Nameth et al. 1999). Sardunya türlerinin 1632'de Güney Afrika'dan Avrupa'ya getirildiğine inanılır ve 1700'lü yılların başlarında bahçelerde kullanılmaya başlanmış, 1800'lü yıllarda hibritleme çalışmaları da başlamıştır. Yoğun hibritleme sonucu oluşan yeni genotiplerde hastalıklara karşı duyarlılığın da arttığı gözlenmiştir (Nameth et al. 1999). Bakteriyel etmen olarak da *Xanthomonas axonopodis* pv. *pelargonii*, *Ralstonia solanacearum*, *Pseudomonas cichorii*, *Pseudomonas syringae*, *Rhodococcus fascians*, *Acidovorax* sp. ve *Agrobacterium tumefaciens* türleri hastalık yapmasına rağmen tüm dünyada Sardunya'ların en yıkıcı hastalığı *Xanthomonas axonopodis* (synonim: *campestris*) pv. *pelargonii* (Brown) Starr & Burkholder'in neden olduğu bakteriyel gövde çürüklüğü, yaprak lekesi ve solgunluk hastalığıdır (Nameth et al. 1999).

Kısaca "Sardunya Bakteriyel Yanıklığı veya Bakteriyel Leke Hastalığı" olarak bilinen bu hastalık 1800'lü yılların sonu ile 1900'lü yılların başından beri Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde bilinmektedir. ABD dışında Avrupa'da pek çok ülkede ve İsrail'de de yaygın bir hastalıktır. Patojen bakterinin tek konukçusu sardunyanıdır. Etmen enfekteli bitkinin iletim demetlerinde yaşar ve çelikle taşınır. Tohumlardan gelişen hibrit sardunyalar bakteriyel yanıklığa duyarlı olmalarına rağmen yeşil kısımdan çelikle vejetatif olarak çoğaltılan sardunyalar ve sakız sardunyalar en fazla etkilenenlerdendir (Nameth et al. 1999).

Xanthomonas axonopodis pv. *pelargonii*'nin yaprak belirtileri sardunya gruplarına göre değişiklik göstermektedir. Sakız sardunyaların (*Pelargonium peltatum*) yapraklarında hastalık küçük, karakteristik, su emmiş lekeler şeklindedir. Başlangıçta 1-2 mm çapındaki bu lekeler zamanla büyüyüp genişler ve 2-3 mm boyutuna ulaşırlar. Lekeler düzensiz şekillidir, lekeli alanların etrafında sararma oluşur, zamanla lekeler nekrotik bir hal alır ve lekeler birleşirler. Enfekteli yaprak kahverengileşir ve inceler. Bitki gövdesinde enfeksiyondan dolayı sınırı olmayan kahverengi-siyah lekeli alanlar oluşur, iletim demetleri renklenir, gövde içi çürüyerek boşalır ve solan yapraklar dökülmeden kuru sert olarak dalda asılı kalır. Dik büyüyen çalı formundaki sardunyalarda (*Pelargonium x hortorum* ve *Pelargonium zonale*) hastalık belirtileri genel bir sararma ve solgunluk şeklinde başlar. Bu çeşitte yapraklarda "V" şeklinde başlayan sararma zamanla nekrotik bir hal alır ve bu etmenin tipik semptomudur. Eğer bakteri hidadotlar aracılığı ile bitki içine giriş yaparsa da bu tip belirtiler oluşur. Enfeksiyon iletim demetlerinde olduğu zaman ayrı dallar üzerindeki yapraklar solar, bu aşamada bitkide diğer semptomlar görülmeyebilir. Gövde belirtileri ise sakız sardunyalarda (*Pelargonium peltatum*) olduğu gibidir.

Hastalık gelişimi için uygun olmayan koşullar altında bakteri bitki yüzeyinde epifitik olarak veya bitki içerisinde latent olarak yaşamını sürdürebilir. Semptom göstermeyen bitkilerin seralardan diğer seralara nakli ile patojen yayılır (Nameth et al. 1999). Üreticiler enfekteli olduğu bilinmeyen çelikleri kullandıkları zaman hastalık tohum yatağından diğerlerine yayılmaktadır. Sardunya üretim alanlarında *Xanthomonas axonopodis* pv. *pelargonii*'ye karşı kimyasal mücadelenin yetersiz olduğu bilinmektedir (Flaherty et al. 2001). Bu yüzden hastalığın mücadelesi için kültürel önlemlerden biri olan hastaliksız üretim materyalinin kullanımı ilk şarttır. Uygun testleme yöntemleriyle hastalık yönünden incelenmiş, hastaliksız olduğu bilinen ana bitkiden alınmış çelikler üretim materyali olarak kullanılmalıdır (Nameth et al. 1999).

Tohum ve çelik ithalatı ile farklı Sardunya tür ve çeşitleri de ülkemize girmiştir. Son birkaç yıldır Doğu Akdeniz Bölgesi'nde Sardunya bitkilerinde yaprak lekesi, gövde çürüklüğü ve yanıklığı belirtilerini içeren bu hastalık problem olmaktadır. Ayrıca İstanbul ve Manisa illerindeki üretim yerlerinde de benzer şikayetler olmuş ve hasta bitki örneklerinden bu patojen izole edilmiştir (Ünlü & Aysan 2006; Mirik et al. 2010).

Bitki hastalıklarıyla mücadelede yoğun kimyasal kullanımı sonucu ortaya çıkan olumsuzluklarının fark edilmesi, kimyasalların çevreye ve insan sağlığı üzerine olumsuz etkileri, kimyasallara karşı oluşan dayanıklılık sorunları ve bazı hastalıkların kimyasallarla yeterli ve etkili mücadele yönteminin olmayışı biyolojik mücadele çalışmalarını öncelikli bir konu haline getirmiştir. Son yıllarda entegre mücadele programları içerisine biyolojik mücadele yöntemlerinin dahil edilmesi kaçınılmaz olmuştur. Bitki büyümesini teşvik eden rhizobakteriler (Plant Growth Promoting Rhizobacteria: PGPR) biyolojik mücadele elemanı olarak kullanıldığında bitkilerde bir çok hastalığa karşı dayanıklılığı teşvik etmekte ve

bunun yanında verim artışına sebep olmaktadır (Weller 1988). Bu bakteriler bitkilerin gelişimine katkıda bulunurken aynı zamanda bitkilerin stres koşullarına direncini artırır (van Loon 1997; van Loon et al. 1998). Bitki gelişimi açısından azottan sonra gelen en önemli besin elementlerinden birisi de fosfordur. Tarım yapılan alanlarda fosfor yeterli miktarda bulunmasına rağmen bitkiler tarafından alınmaz formdadır. Topraktaki alınamayan fosforu çözerek bitkilerin alabileceği forma dönüştürmek, PGPR'ların etki mekanizmaları arasında yer almaktadır. Bu çalışmada, Sardunya'da *Xanthomonas axonopodis* pv. *pelargonii*'nin neden olduğu bakteriyel leke ve yanıklık hastalığının biyolojik mücadelesinde fosforu çözen PGPR izolatlarının kullanım olanakları araştırılmıştır.

Materyal ve yöntem

Materyal

Patojen izolat

Ünlü & Aysan (2006) tarafından Adana'dan izole edilen *Xanthomonas axonopodis* pv. *pelargonii*'nin Sar 3-2/c (re) kodlu izolatu kullanılmıştır.

Çalışmada kullanılan patojen bakteri yoğunluğu

Xanthomonas axonopodis pv. *pelargonii*'nin Sar 3-2/c (re) kodlu izolatının sardunya çeliklerinde hastalık belirtisi oluşturan en düşük bakteri yoğunluğu olan 3×10^5 hücre/ml saksı çalışmalarında kullanılmıştır.

ISR-2000

Improcrop firması tarafından üretilen ISR-2000; *Lactobacillus acidophilus* fermentasyon ürünü, yucca bitki ekstraktı, maya ekstraktı, riboflavin, benzoik asit, nikotinamid ve thiamine içermektedir. Formülasyon solüsyon SL'dir ve 100ml/da dozunda uygulanmıştır. Bitki aktivatörü olarak ruhsatlıdır.

Sardunya bitkileri

Syngenta firmasından (Syngenta Tarım San. ve Tic. A.Ş. Seed/Flowers Deneme İstasyonu, Cihadiye Köyü Aksu-Antalya) temin edilen, 4-5 yapraklı dönemdeki dik büyüme gösteren *Pelargonium x hortorum* grubu Sardunya bitkileri kullanılmıştır.

Toprak ve saksı özellikleri

Saksı denemelerinde, fosforca fakir özelliğe sahip (% 2.7 kireç, 3.75 kg/da fosfor, pH 7.54) toprak torf ile, 3:2 oranında karıştırılarak 12 cm çapındaki plastik saksılara doldurularak kullanılmıştır.

İklim odasının özellikleri

Deneme, Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü'nde bulunan 25 °C sıcaklık, % 70-80 nem ve 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık koşullardaki iklim odasında yürütülmüştür.

Yöntem

PGPR izolasyonu ve aday PGPR izolatlarının seçimi

Fosforu çözme yeteneğindeki PGPR'lerin izolasyonu ve seçiminde Mirik (2005) tarafından belirtilen yöntemlerden yararlanılmıştır. PGPR'lerin izolasyonu için Adana ve çevresindeki sardunya yetiştirilen farklı alanlardan, bitki kök bölgesi toprağından örnekler alınmıştır. Örnek alırken üretim alanında diğer bitkilere göre daha iyi gelişmiş görünümde olan bitkiler dikkate alınmıştır. Seçilen bitkilerin kök boğazından kılcal kökler de dâhil olmak üzere toprak örnekleri alınmıştır.

Toprak ve kök izolasyonu için toplanan toprak örnekleri laboratuvar koşullarında kurutulmuş ve 0.2 mm delik büyüklüğüne sahip toprak eleğinden geçirilmiştir. Bu şekilde hem yabancı maddeler topraktan uzaklaştırılmış hem de üretim alanından alınan topraklar homojen bir şekilde karıştırılmıştır. Homojen olarak karıştırılan elenmiş toprak örneklerinden 10 gr alınarak 90 ml Nutrient broth (Lelliott & Stead 1987) içerisinde oda sıcaklığında 100 dev./dak.'da çalışan çalkalayıcılarda iki saat çalkalanmıştır. Süspansiyondan seyreltme serileri hazırlanmış ve her seyreltmelerden 100µl alınarak 3 tekrarlı olarak King B besi yerine (Lelliott & Stead 1987) ekimler yapılmıştır. 25 °C'de 48 saat inkübasyondan sonra petrilerdeki koloni gelişmeleri incelenerek farklı morfolojik gelişim gösteren kolonilerden saflaştırma yapılmıştır.

Elde edilen aday PGPR izolatları arasında seçim, fosfatı indirgeme özelliklerine göre yapılmıştır. Toprakтан izole edilen bakterilerin fosforu (P) çözme yeteneklerini belirlemek için katı NBRIP (Nautiyal 1999) ve sıvı NBRIP (Nautiyal et al. 2000) olmak üzere iki farklı besi yeri kullanılmıştır. Toprakтан saf olarak izole edilen bakterilerin fosforu çözebilme yeteneklerini belirlemek için steril kürdan ile katı NBRIP besi yeri içeren her bir petriye 9 izolat olacak şekilde ekim yapılmıştır. Deneme 3 tekrarlı olarak kurulmuştur. Bir hafta sonra besi yerinde bakteri kolonisinin etrafındaki şeffaf zonun çapı ve bakteri kolonisinin çapı ölçülüp çıkan değerler birbirine oranlanarak fosfor çözme indeksi belirlenmiştir (Johri et al. 1999). Fosfor çözme indeksi yüksek bakteriler ileriki çalışmalar için seçilmiştir.

Bu izolatlardan fosfor çözme indeksi en yüksek olan 30 izolat seçilerek NBRIP sıvı besi yerinde çözebildiği fosfor miktarları Barton (1948) yöntemine göre belirlenmiştir. Çalışmanın bu kısmı, Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Toprak Bölümü laboratuvarında Yrd. Doç. Dr. Selim EKER danışmanlığında yapılmıştır.

Seçilen aday PGPR izolatlarının antagonistik ve siderefor etkileri

Fosforu indirgeme kabiliyetlerine göre seçilen 30 adet PGPR izolatların *Xanthomonas axonopodis pv. pelargonii*'ye karşı antagonistik etkileri Krishnamurthy & Gnanamarickam (1998) göre ve siderefor etkisi ise Kloepper et al. (1980) ile Bora & Özaktan (1998)'a göre belirlenmiştir.

NA besi yerine aday PGPR izolatları çizilmiş ve 25°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Aday PGPR izolatları çok hızlı gelişme gösterdikleri için aynı gün içinde aday PGPR'ye dik olacak şekilde dört farklı noktadan patojen bakterinin çizimi yapılmış ve petriyer 25°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyondan 96 saat sonra

aday PGPR izolatlarının patojenin gelişimine olan etkileri engelleme zonları ölçülerek değerlendirilmiştir. Bu deneme üç tekrarlı olarak yürütülmüştür. PGPR izolatlarının siderefor etkisi yukarıda anlatılan antibiyosis etkisini belirleme yönteminde olduğu gibi belirlenmiştir. Fakat burada aynı besi yeri içerisine 80 µM Fe⁺³ ilave edilmiştir.

Aday PGPR'lerin Sardunya'da bakteriyel yanıklık hastalığının gelişimine etkisi

Sıvı besi yerinde en fazla fosfor çözen 4 izolat (12-12b, 13-1a, 10-4b, 13-10) ve katı NBRIP besi yerinde en geniş zon çapı oluşturan 1 izolat (14-2a) seçilerek toplam 5 aday PGPR izolatın, 3x10⁵ hücre/ml yoğunluğundaki *Xanthomonas axonopodis* pv. *pelargonii*'nin inokuluma etkisi saksı çalışmasıyla araştırılmıştır.

PGPR izolatlarının 24 saatlik taze kültüründen 1.5x10⁹ hücre/ml yoğunluğunda hazırlanan süspansiyonun içerisine sardunya bitkilerinin kökleri 15 dak. süreyle daldırılmıştır. Köklere bakteri kolonizasyonu sağlandıktan sonra uygulama görmüş bitkiler saksı toprağına şaşırtılmıştır. Ticari bitki aktivatörü olan ISR 2000, firmanın önerdiği kullanım talimatına göre süspansiyon haline getirilmiş ve sardunya bitkilerinin kökleri 15 dak. süreyle bu süspansiyona batırılmıştır. Pozitif ve negatif kontrol olarak kullanılacak bitkilerin kökleri de steril suya aynı sürede batırılmıştır. Bir hafta sonra aday PGPR izolatlarıyla ve ISR-2000 ile uygulama görmüş ve pozitif kontrole ait bitkilerin gövdesine steril bir enjektör yardımıyla patojen bakterinin 3x10⁵ hücre/ml yoğunluğunda hazırlanan süspansiyondan 10µl inokule edilmiştir. Negatif kontrole ait bitkilerin gövdesine aynı yöntemle steril su injekte edilmiştir. Uygulama görmüş bitkiler iklim odasında muhafaza edilmiştir. Değerlendirme; Pozitif kontrol bitkilerinde hastalık belirtileri gözlemlendikten sonra yapraklardaki enfeksiyon 0-5 skalasına (0: hastalık yok; 1: toplam yaprakların % 1-20'inde solgunluk ve/veya kuruma; 2: toplam yaprakların % 21-40'ında solgunluk ve/veya kuruma; 3: toplam yaprakların % 41-60'ında solgunluk ve/veya kuruma; 4: toplam yaprakların % 61-80'inde solgunluk ve/veya kuruma; 5: toplam yaprakların % 81-100'ünde solgunluk ve/veya kuruma) göre değerlendirilmiştir. Tüm bitkiler boyuna kesilerek gövdedeki enfeksiyon 0-4 skalasına (0: hastalık yok; 1: 0.1-1.0 cm gövde içi kahverengilik; 2: 1.1-2.0 cm gövde içi kahverengilik; 3: 2.1-3.0 cm gövde içi kahverengilik; 4: 3.1 cm ve üstü gövde içi kahverengilik) göre değerlendirilmiştir. Pozitif kontroldeki hastalık şiddeti ile PGPR izolatları ile uygulama görmüş bitkilerdeki skala değerine ait hastalık şiddeti karşılaştırılarak PGPR izolatlarının *Xanthomonas axonopodis* pv. *pelargonii*'yi engelleme oranı ABBOTT formülüyle ortaya konmuştur.

Beş aday PGPR izolatı, ISR-2000, pozitif ve negatif kontroller olmak üzere 8 uygulama ve her uygulama için 10 sardunya bitkisi olacak şekilde deneme planı hazırlanmıştır. Çalışma toplamda 80 sardunya bitkisiyle yapılmıştır. Uygulamalar arasındaki istatistik farklar Anova istatistik programında Duncan çoklu karşılaştırma testinde p≤0.05 önem düzeyine göre yapılmıştır. Aynı istatistik grupta yer alan uygulamalar aynı harfle işaretlenmiş ve sonuçlar yorumlanmıştır.

Bulgular ve tartışma

PGPR bakterilerin izolasyonu ve aday PGPR izolatlarının seçimi

PGPR'lerin izolasyonu için Adana ve çevresindeki sardunya yetiştirilen farklı alanlardan, bitki kök bölgesi toprağından toplam 16 adet örnekten 234 koloni seçilerek saflaştırılmıştır. Toprakta izole edilen 234 aday PGPR izolatlarının katı NBRIP besi yerinde 60'ın zon oluşturduğu belirlenmiştir. Fosfor çözen bakterilerin seçiminde sadece fosfor çözme indeksi yeterli değildir, bakterinin

Çizelge 1. Seçilen 30 izolatın katı NBRIP besi yerindeki zon çapı, koloni çapı, fosfor çözme indeksi ve sıvı NBRIP besi yerinde çözünen fosfor miktarı

Table 1. Zone diameter, colony diameter, solubilizing phosphorus on solid and in liquid NBRIP medium of selected 30 strains

İzolatlar	Zon çapı (mm)	Koloni çapı (mm)	P çözme indeksi	P miktarı (ppm)
Kontrol	0.00	0.00	0.00	079.96
12-12b	1.40	0.40	3.50	439.49
13-1a	1.00	0.30	3.30	408.40
10-4b	1.00	0.40	2.50	386.11
13-10	0.88	0.36	2.44	378.45
16-5	1.10	0.45	2.44	377.52
9-14	1.00	0.50	2.00	376.99
7-18	1.20	0.40	3.00	373.95
9-17	0.85	0.30	3.83	370.29
2-6	1.86	0.43	4.32	367.60
5-12	1.83	0.40	4.57	358.43
15-5	0.93	0.23	4.04	357.15
6-4	1.10	0.33	3.33	350.69
13-11	1.66	0.30	6.66	332.72
7-11	1.12	0.30	3.88	320.03
15-2	1.13	0.20	5.66	319.57
10-6	1.90	0.30	6.33	311.39
7-2	1.23	0.30	4.10	293.52
11-1	0.80	0.25	3.20	289.65
11-6	0.90	0.25	3.60	276.93
3-2	1.46	0.56	2.61	267.28
14-3	1.28	0.42	3.04	252.11
16-14	0.85	0.30	2.83	249.07
14-7	1.71	0.50	3.42	233.01
2-5	1.30	0.30	4.33	218.29
5-6	0.93	0.23	4.04	211.36
1-1	0.60	0.26	2.30	177.92
2-4	1.46	0.23	6.35	173.60
2-7	1.40	0.33	4.24	166.83
14-2a	2.13	0.48	4.47	133.20
3-1	0.70	0.20	3.50	131.49

çözdüğü fosfor miktarı kadar koloni çapı da önemli olmaktadır. Bu nedenle aday PGPR bakterilerin sıvı besi yerinde çözdüğü fosfor miktarının belirlenmesi gerekmektedir. Katı NBRIP besi yerinde fosfor çözdüğü belirlenen 60 izolatın fosfor çözme indeksi en yüksek olan 30 izolat seçilerek, sıvı NBRIP besi yerindeki fosfor çözme miktarı belirlenmiştir (Çizelge 1).

Çizelge 1'de görüldüğü üzere sıvı NBRIP besi yerinde 439.49 ppm ile en fazla fosfor çözen bakteri izolatu 12-12b izolatıdır. Saksı çalışmalarında kullanılmak üzere fosfor çözme indeksi en yüksek (439.49, 408.40, 386.11 ve 378.45 ppm) olan 12-12b, 13-1a, 10-4b ve 13-10 kodlu ilk dört izolat ile fosfor çözme indeksi çok düşük (133.20 ppm) olmasına rağmen katı NBRIP besi ortamında diğer izolatlarla göre daha geniş zon çapına (2.13 mm) sahip olan 14-2a izolatı seçilmiştir.

Seçilen aday PGPR izolatlarının antagonistik ve siderefor etkileri

Fosforu indirgeme kabiliyetlerine göre seçilen 30 adet PGPR izolatının siderefor ve antagonistik etkilerini belirlemek için yapılan petri denemelerinde PGPR bakterilerin *Xanthomonas axonopodis* pv. *pelargonii*'nin gelişimini engelleyemedikleri ve bu nedenle zon oluşturamadıkları belirlenmiştir. Bu çalışma ile etmenin gelişiminin engellenmesinde 30 aday PGPR izolatının siderefor yada antagonistik etki mekanizmasına sahip olmadıkları da saptanmıştır.

Aday PGPR'lerin Sardunya'da bakteriyel yanıklık hastalığının gelişimine etkisi

İklim odası koşullarında 2007 yılının Mart-Nisan ayları arasında kurulan saksı çalışmasında, kontrol olarak kökleri suya daldırılan gövdeden *Xanthomonas axonopodis* pv. *pelargonii* (Sar 3-2/c kodlu re-izolatı) ile bulaştırılan bitkilerde inokulasyondan 15 gün sonra yaprak belirtileri gözlenmeye başlanmıştır. Pozitif kontrol uygulamasındaki bitkilerin tümünde yaprak ve gövde belirtileri

Çizelge 2. PGPR izolatlarının sardunyada bakteriyel leke hastalığının şiddetine etkisi
Table 2. Effect of PGPR strains on geranium bacterial blight disease incidence

Uygulamalar	Yaprak enfeksiyonu		Gövde enfeksiyonu	
	Hastalık şiddeti	% etki	Hastalık şiddeti	% etki
Negatif Kontrol	0.00	-	0.00	-
Pozitif Kontrol	2.67 ^{a,*}	-	1.83 ^{a,**}	-
14-2a	2.67 ^a	0.00	1.83 ^a	0.00
13-1a	2.67 ^a	0.00	1.67 ^a	8.74
ISR-2000	2.33 ^a	12.73	1.67 ^a	8.74
10-4b	1.50 ^a	43.82	1.50 ^a	18.03
12-12b	0.33 ^b	87.64	0.67 ^b	63.38
13-10	0.00 ^b	100.00	1.00 ^a	45.35

*:Duncan's Multiple Range Test, Hata Kareler Ortalaması = 0.919047619, Serbestli Derecesi= 35, Önem Seviyesi = 5 %, LSD .05 = 1.1236408175

**Duncan's Multiple Range Test, Hata Kareler Ortalaması = 0.8761904762, Serbestli Derecesi = 35, Önem Seviyesi = 5 %, LSD .05 = 1.0971291751

gözlemlenenden sonra (inokulasyondan sonraki 21. günde) değerlendirme yapılmış ve 0-5 skalasına göre pozitif kontrolde yapraklarda hastalık şiddetinin ortalamasının 2.67, 0-4 skalasına göre gövdede hastalık şiddetinin ortalamasının 1.83 skala değerinde olduğu saptanmıştır.

Yaprak enfeksiyonunun göre yapılan değerlendirmede pozitif kontrol, 14-2a ve 13-1a kodlu PGPR uygulamalarında hastalık şiddeti 2.67, ticari bitki aktivatörü olan ISR 2000 2.33, 10-4b kodlu PGPR izolatında 1.50, 12-12b kodlu izolatında 0.33 ve 13-10 kodlu izolatta ise hastalık şiddeti 0.00 olarak saptanmıştır. Pozitif kontrole göre belirlenen etki %'sinde ise en etkili uygulamanın % 100 oranıyla 13-10 kodlu izolatta olduğu belirlenmiştir (Çizelge 2 ve Şekil 1). Bu izolat yaprak enfeksiyonlarının oluşumunu tamamen önlemiştir. 12-12b kodlu PGPR izolatı da yaprak belirtilerinin ortaya çıkışını % 88 oranında engellemiştir. 10-4b kodlu izolat % 44 ve ISR-2000 % 13 oranında hastalık şiddetini azaltmıştır. 14-2a ve 13-1a kodlu izolatlarda hastalığı engellemede herhangi bir başarı gösterememiştir. Negatif kontrol olarak hiçbir uygulama yapılmayan bitkilerde ise herhangi bir hastalık belirtisi gözlenmemiştir. İstatistikî olarak da incelendiğinde ISR-2000, 14-2a, 13-1a ve 10-4b kodlu izolatlarda pozitif kontrol ile aynı grupta yer alarak hastalığın yaprak belirtilerini engellemede başarısız izolatlarda değerlendirilmiştir. 12-12b ve 13-10 kodlu izolatlarda pozitif kontrolden farklı bir grupta yer alarak etkili uygulamalar olduğu saptanmıştır.

Çizelge 2'de görüldüğü gibi, gövde enfeksiyonuna göre yapılan değerlendirmede pozitif kontrol ve 14-2a kodlu PGPR uygulamasında hastalık şiddeti 1.83; ISR 2000 ve 13-1a kodlu izolatta 1.67, 10-4b kodlu izolatta 1.50, 13-10 kodlu izolatta 1.00 ve 12-12b kodlu izolatta ise hastalık şiddeti 0.67 olarak tespit edilmiştir. Pozitif kontrole göre belirlenen etki %'sinde gövde enfeksiyonlarını azaltmada en etkili uygulamanın % 63 oranıyla 12-12b kodlu izolatta olduğu belirlenmiştir (Şekil 2). 13-10 kodlu izolat gövde enfeksiyonunu % 45, 10-4b kodlu izolat % 18, 13-1a kodlu izolat ve ISR-2000 % 9 oranında azaltmıştır. 14-2a kodlu izolat hastalığı engellemede herhangi bir başarı gösterememiştir. İstatistikî olarak incelendiğinde 12-12b kodlu izolat pozitif kontrolden farklı bir grupta yer alarak gövde enfeksiyonunu azaltmada etkili bir uygulama olduğu saptanmıştır. 14-2a, 13-10, 13-1a, 10-4b kodlu izolatlarda ve ISR-2000 pozitif kontrol ile aynı grupta yer alarak hastalığın gövde belirtilerini engellemede başarısız izolatlarda belirlenmiştir.

Elde edilen verilere göre yaprak enfeksiyonlarını engellemede 12-12b ve 13-10 izolatlarda, gövde enfeksiyonlarını engellenmede ise 12-12b izolatı etkili olmuştur. Bu izolatlarda ayrıca bitki büyümesine de olumlu etkide bulunmuştur. Sardunya'da *Xanthomonas axonopodis* pv. *pelargonii*'nin kontrolünde PGPR'lerin kullanımına dair ümit var sonuçları olduğu bu çalışmayla ortaya konmuştur.



Şekil 1. Yaprak enfeksiyonu engelleyen 13-10 kodlu etkili PGPR izolatı (solda) ve pozitif kontrol (sağda).

Figure 1. Effective PGPR strain, 13-10 on leaf infections (left), and positive control plant (right).



Şekil 2. Pozitif kontrol (üstte) ve gövde enfeksiyonunun engelleyen 12-12b kodlu PGPR izolatı (altta).

Figure 2. Positive control (above) and effective PGPR strain, 12-12b on stem infections (below).

Dış mekanlarda, balkon, pencerelerde saksılar içinde yetiştirilen ve bahçe düzenlemelerinde kullanılan sardunyalarda görsel kalite kriterleri çok önemlidir. Satın alma sırasında bitkilerin formunu almış olmalarının yanı sıra hastaliksız görünüme sahip olmaları gerekmektedir. Çünkü süs bitkileri çevre estetiğine katkıları ve dış güzellikleri sayesinde bir pazar payına sahiptir. Üretim, satış ve kullanım aşamalarında bitkilerin sağlıklı kalabilmesi için maksimum düzeyde hastalık ve zararlı kontrolü yapılmalıdır.

Bitki hastalıklarıyla mücadelede yoğun kimyasal kullanımının çevreye ve insan sağlığı üzerine olumsuzluklarının fark edilmesi, kimyasal kullanımından bir süre sonra hastalık etmenlerinin dayanıklılık kazanması ve bazı hastalıkların mücadelesinde kimyasalların yeterli olmayışı biyolojik mücadele çalışmalarına hız kazandırmıştır ve öncelikli bir konu haline getirmiştir. Yapılan bu çalışmada PGPR'ler ile Sardunya'da *Xanthomonas axonopodis* pv. *pelargonii*'nin biyolojik mücadele olanakları araştırılmıştır.

PGPR'lar sahip oldukları mekanizmalarla patojen mikroorganizmaların bitkilerde hastalık oluşturmalarını engelleyebilirler. Floresan *Pseudomonas*'lar toprak kökenli hastalıkların engellenmesinde en etkili rizosfer bakterileri arasında bulunur (van Loon 1997; van Loon et al. 1998). Bu bakteriler siderefor özellikleri ile patojen mikroorganizmaların topraktaki demiri kullanmalarını engelleyerek ya da antibiyotik üreterek bitkileri patojen saldırılarına karşı korurlar. Ayrıca sistemik dayanıklılığı teşvik edebilme yeteneğine sahiptirler (Pieterse et al. 2000).

Nautiyal (1999), topraktan izole edilen mikroorganizmaların fosfor çözme yeteneklerini belirleyebilmek için PVK besiyeri yerine daha etkili olan NBRIP besiyerini geliştirmiştir. Bu amaçla daha önceden fosfor çözdüğü bilinen bakteriler her iki besiyerinde de geliştirilmiştir. Petri denemelerinde katı NBRIP besiyeri PVK besiyerine kıyasla daha etkili bulunurken sıvı NBRIP besiyerinin PVK'ya oranla 3 kat daha etkili olduğu kanıtlanmıştır.

Sonuç olarak; topraktan izole edilen bakterilerin fosfor çözme kabiliyetlerini belirleyebilmek için sıvı NBRIP ortamının daha avantajlı olduğu saptanmıştır. Sistemik dayanıklılığı (ISR) ve uyarılmış dayanıklılığı (SAR) teşvik eden rizobakterilerin bitkilerde hastalık gelişimini azalttığı bildirilmiştir. Her iki dayanıklılık da bitkileri birden fazla bitki patojeninin saldırılarına karşı dayanıklı kılmaktadır. Bazı rizobakteriler ISR oluşumunu kök yüzeyinde salisilik asit üretimiyle tetiklerler, bazı rizobakteriler ise salisilik asite gereksinim duymadan ISR oluşumunu başlatabilmektedirler. Jasmonoik asit ve etilenin de bitkilerde SAR benzeri savunma durumunu harekete geçirebildikleri gözlenmiştir (Pieterse et al. 2000; Pieterse et al. 2001).

Biyolojik mücadele ile ilgili çalışmalar çok emek isteyen, uzun zaman alan, sonuçları kısa sürede ortaya çıkmayan, farklı üretim alanları ve bölgelerde etkisinin belirlenmesi gereken araştırmalardır. Her araştırmanın sonunda etkili biyolojik mücadele elemanları bulunamayabilir. Bu durum göz önüne alınarak araştırmalar devam etmelidir. Henüz sardunyada bu hastalığa karşı ruhsat almış bir biyolojik preparat olmasa da ümit verici araştırmalar bulunmaktadır. Flaherty et al. (2001), *Xanthomonas axonopodis* pv. *pelargonii*'ye spesifik 16 adet bakteriyofaj (patojen bakteriyi eriten virüsler) izole etmişlerdir. Fajların günlük uygulamasıyla ancak başarı elde edildiğinden pratikte kullanımının ekonomik olamayacağı belirtilmiştir. Hoitink et al. (2005) ise, *Xanthomonas axonopodis* pv. *pelargonii*'nin biyolojik mücadelesi üzerine yaptıkları araştırmada sadece özel torf (Hindistan cevizi kabuğu) kullanılan saksı çalışmasında az bir başarı elde etmişlerdir. Bizim bu

çalışmamızda, PGPR izolatları kök uygulaması olarak bitkilere verildiğinde; 12-12b ve 13-10 kodlu izolatlar yaprak enfeksiyonlarını %88-100 oranında engellemişlerdir. Bununla birlikte 12-12b kodlu izolat gövde enfeksiyonlarında hastalık şiddetini % 63 oranında engelleyerek en etkili izolat olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca bu izolatların bitki büyümesini de arttırdığı gözlenmiştir. Herhangi bir ölçüm yapılmamasına karşın sadece görsel olarak yapılan incelemelere göre 12-12b ve 13-10 izolatlarının yaprak sayısını artırdığı ve yaprakların daha irileşmesine neden olduğu gözlenmiştir. Hoitink et al. (2005) de benzer şekilde biyolojik mücadele uygulamalarının sardunyada yeşil aksam gelişiminde artış sağladığını belirtmektedir.

Yapılan bu çalışma ile; Sardunya'da *Xanthomonas axonopodis* pv. *pelargonii*'nin kontrolünde PGPR'lerin kullanımına dair ümit var sonuçlar olduğu ortaya konmuştur. Bu çalışmada kullandığımız ve başarılı olduğu saptanan izolatların patojeni engellemede ikili kombinasyonlarının araştırılması, doğa şartlarında denemenin tekrarlanması ve başarılı izolatların tür düzeyinde tanısı için daha detaylı araştırmalar gerekmektedir.

Teşekkür

Bu çalışma; Ç.Ü. Bilimsel Araştırmalar Biriminden ZF2006YL58 nolu projeye desteklenen yüksek lisans tezinin bir bölümüdür. PGPR'lerin çözdüğü fosfor miktarlarını belirlemede yardımcı olan Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Toprak Bölümü öğretim üyesi sayın Yrd. Doç. Dr. Selim EKER'e teşekkür ederiz.

Kaynaklar

- Barton C.J. 1948. Photometric analysis on phosphate rock. *Analytical Chemistry*, 20: 1068-1073.
- Bora T. & H. Özaktan 1998. Bitki Hastalıkları ile Biyolojik Savaş. Prizma Matbaası, İzmir. 205 s.
- Flaherty J.E., B.K. Harbaugh, J.B. Jones & G.C. Somodi 2001. H-mutant bacteriophages as a potential biocontrol of bacterial blight of geranium. *Hortscience*, 36: 98-100.
- Hoitink H.A.J., S.T. Nameth & M.S. Krause 2005. Chemical and biological control of *Xanthomonas* bacterial blight of geranium. Floriculture Industry Research and Scholarship Trust, Research Report, F-2005-9, 1-10.
- Johri J.K., S. Surange & C.S. Narula 1999. Occurrence of salt, pH and temperature-tolerant, phosphate-solubilizing bacteria in alkaline soils. *Current Microbiology*, 39: 89-93.
- Klopper J.W., J. Leong, M. Teintze & M.N. Schroth 1980. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature*, 286: 885-886.
- Krishnamurthy K. & S.S. Gnanamarickam 1998. Biological control of rice blast by *Pseudomonas fluorescens* strain Pf-14: evaluation of a marker gene and formulations. *Biological Control*, 13: 158-165.
- Lelliot R.A. & D.E. Stead 1987. Diagnostic procedures for bacterial plant diseases. In *Methods for the Diagnosis of Bacterial Diseases of Plants* 58-59. Blackwell Scientific Publications, 216 p.

- Mirik M. 2005. Biberde bakteriyel leke etmeni *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*'nın tanılanması ve bitki büyüme düzenleyici rizobakteriler ile biyolojik mücadele olanakları. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Balcalı, Adana, 162 s.
- Mirik M., S. Unlu & Y. Aysan 2010. First report of *Xanthomonas hortorum* pv. *pelargonii* causing bacterial blight of geranium in Turkey. *Plant Pathology*, 59: 403-404.
- Nameth S.T., M.L. Daughtrey, G.W. Moorman & M.A. Sulzinski 1999. Bacterial blight of geranium: a history of diagnostic challenges. *Plant Disease*, 83: 204-212.
- Nautiyal C.S. 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, 170: 265-270.
- Nautiyal C.S., S. Bhadauria, P. Kumar, H. Lal, R. Mondal & D. Verma 2000. Stress induced phosphate solubilization in bacteria isolated from alkaline soils. *FEMS Microbiology Letters*, 182: 291-296.
- Pieterse C.M.J., J.A. van Pelt, T. Jurriaan, S. Parchmann, M.J. Mueller, A.J. Buchla, J.P. Metraux & L.C. van Loon 2000. Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) in *Arabidopsis* requires sensitivity to jasmonate and ethylene but is not accompanied by an increase in their production. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 57: 123-134.
- Pieterse C.M.J., J.A. van Pelt, S.C.M. van Wees, J. Jurriaan, K.M. Leon-Kloosterziel, J.J.B. Keurentjes, B.W.M. Verhagen, M. Knoester, I. van der Sluis, P.A.H.M. Baker & L.C. van Loon 2001. Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance: triggering, signaling and expression. *European Journal of Plant Pathology*, 107: 51-61.
- Sözen N., N. Haleplioglu & Ş. Şahin 1991. Ülkemizde süs fidancılığının durumu ve pazar açısından karşılaşılan sorunlar. Türkiye I. Fidancılık Sempozyumu, 26-28 Ekim 1991, İzmir, 411-419.
- Ünlü S & Y. Aysan 2006. Adana'da Sardunya'da (*Pelargonium* spp.) Yeni Bir Hastalık: Bakteriyel Yanıklık (*Xanthomonas axonopodis* pv. *pelargonii*). III. Ulusal Süs Bitkileri Kongresi Bildirileri, 8-10 Kasım 2006, İzmir, 304-310.
- van Loon L.C. 1997. Induced resistance in plants and role of pathogenesis related proteins. *European Journal of Plant Pathology*, 103: 753-765.
- van Loon L.C., P.A.H.M. Bakker & C.M.J. Pieterse 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, 36: 453-483.
- Weller D.M. 1988. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, 26: 379-407.
- Zencirkıran M. 2004. Dış mekan süs bitkilerinde çelik ile üretimin optimizasyonu. Web page: <http://www.agr.ege.edu.tr> (Erişim tarihi: 15 Eylül 2007).

