

85972

SB

Ç. Ü. FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

Yeşim (YİĞENOĞLU) AYSAN

85972

Domates Bakteriyel Kara Leke Hastalığının (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) Tanımlanması, Irklarının Belirlenmesi ve Kimyasal Savaşma Alternatif Yöntemlerin Saptanması Üzerinde Araştırmalar

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

Ç. Ü. YÜKSEKÖĞRETİM ENSTİTÜSÜ  
KÜTÜPHANE BİLGİSAYAR BÖLÜMÜ

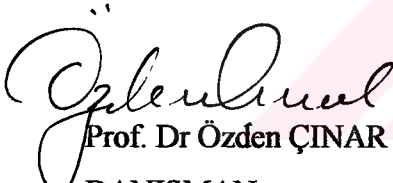
ADANA, Ocak-1999

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOMATES BAKTERİYEL KARA LEKE HASTALIĞININ**  
**(*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) TANIMLANMASI, IRKLARININ**  
**BELİRLENMESİ VE KİMYASAL SAVAŞIMA ALTERNATİF**  
**YÖNTEMLERİN SAPTANMASI ÜZERİNDE ARAŞTIRMALAR**

**YEŞİM (YİĞENOĞLU) AYSAN**  
**DOKTORA TEZİ**  
**BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI**

**Bu tez 14 / 01 /1999 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oybirliği ile Kabul Edilmiştir.**

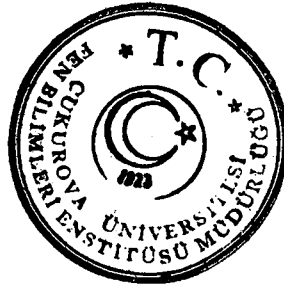
  
Prof. Dr. Özden ÇINAR  
DANIŞMAN

  
Prof. Dr. Hikmet SAYGILI  
ÜYE

  
Prof. Dr. M. Asil YILMAZ  
ÜYE

Bu tez Enstitümüz Bitki Koruma Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

**Kod No: 489**



  
Prof. Dr. Melih BORAL  
Enstitü Müdürü

**Bu Çalışma Ç. Ü. Araştırma Fonu Tarafından Desteklenmiştir.**

**Proje No: FBE.97.D.137**

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

| <b>İÇİNDEKİLER</b>                                                                                                   | <b>Sayfa No</b> |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| ÖZ .....                                                                                                             | I               |
| ABSTRACT .....                                                                                                       | II              |
| ÖNSÖZ .....                                                                                                          | III             |
| TEŞEKKÜR .....                                                                                                       | IV              |
| SİMGELER ve KISALTMALAR .....                                                                                        | V               |
| ÇİZELGELER DİZİNİ .....                                                                                              | VII             |
| ŞEKİLLER DİZİNİ .....                                                                                                | IX              |
| 1. GİRİŞ .....                                                                                                       | 1               |
| 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR .....                                                                                           | 9               |
| 2.1. PST' nin Irkları Üzerine Çalışmalar .....                                                                       | 9               |
| 2.2. PST' nin Tohum, Toprak ve İnfekteli Bitki Artıklarında Yaşam<br>Süresinin Belirlenmesi Üzerine Çalışmalar ..... | 10              |
| 2.3. PST'nin Domates Tohumlarda Saptanması Üzerine Çalışmalar .....                                                  | 13              |
| 2.4. PST' nin Kimyasal, Fiziksel ve Biyolojik Kontrolü Üzerine<br>Çalışmalar .....                                   | 16              |
| 3. MATERYEL ve YÖNTEM .....                                                                                          | 23              |
| 3.1. Materyal .....                                                                                                  | 21              |
| 3.2. Yöntem .....                                                                                                    | 21              |
| 3.2.1. PST İzolatlarının Tanısı .....                                                                                | 21              |
| 3.2.1.1. PST İzolatlarının Klasik Bakteriyolojik<br>Yöntemlerle Tanısı .....                                         | 22              |
| 3.2.1.2. PST İzolatlarının ELISA Testi ile Tanısı .....                                                              | 22              |
| 3.2.1.3. PST İzolatlarının PCR Tekniği ile Tanısı .....                                                              | 23              |
| 3.2.2. PST İzolatlarının Irklarının Tespiti .....                                                                    | 25              |
| 3.2.3. PST'nin İnfekteli Bitki Artıkları, İnokule Edilmiş Toprak ve<br>Tohumda Yaşam Süresinin Belirlenmesi .....    | 26              |
| 3.2.3.1. PST'nin İnfekteli Bitki Artıklarında Yaşam Süresinin<br>Belirlenmesi .....                                  | 26              |

|                                                                                                              |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.2.3.2. PST ' nin İnokule Edilmiş Toprakta Yaşam Süresinin Belirlenmesi .....                               | 28 |
| 3.2.3.3. PST'nin İnokuleli Tohumlarda Yaşam Süresinin Belirlenmesi .....                                     | 28 |
| 3.2.4. Ticari Domates Tohumlarından PST'nin Saptanması .....                                                 | 29 |
| 3.2.4.1. Yapay Olarak Bulaştırılmış Domates Tohumlarında PST'nin Saptanması .....                            | 31 |
| 3.2.5. PST' ye Karşı Fiziksel, Kimyasal ve Biyolojik Kontrol Yöntemleri .....                                | 32 |
| 3.2.5.1. Tohum Uygulamaları .....                                                                            | 32 |
| 3.2.5.2. Biyolojik Kontrol Çalışmaları .....                                                                 | 33 |
| 3.2.5.2.(1). Aday Antagonistlerin izolasyonu .....                                                           | 33 |
| 3.2.5.2.(2). Aday Antagonistlerin PST'ye Karşı Antagonist Etkilerinin <i>In vitro</i> 'da Testlenmesi .....  | 34 |
| 3.2.5.2.(3). Antagonistlerin PST' ye Karşı Antagonist Etkilerinin <i>In vivo</i> 'da Testlenmesi .....       | 34 |
| 3.2.5.2.(3a). Tohum Kökenli İnokuluma Antagonistlerin Etkisi .....                                           | 34 |
| 3.2.5.2.(3b). Toprak Kökenli İnokuluma Antagonistlerin Etkisi .....                                          | 35 |
| 3.2.5.2.(3c). Yeşil Aksamdaki İnokuluma Antagonistlerin Etkisi .....                                         | 36 |
| 3.2.5.3. Solarizasyon Çalışmaları .....                                                                      | 37 |
| 3.2.5.3.(1). Toprak Solarizasyonunun Hastalık Gelişimi Üzerine Etkisi .....                                  | 38 |
| 3.2.5.3.(3). Toprakta İnfekteli Bitki Artıklarındaki Patojen Canlılığı Üzerine Solarizasyonunun Etkisi ..... | 39 |
| 3.2.5.3.(4). Solarizasyonunun Topraktaki Toplam Mikroorganizma Populasyonu Üzerine Etkisi .....              | 39 |

|                                                                                                                  |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.2.5.3.(5). Toprak Solarizasyonunun Verime Etkisi .....                                                         | 40 |
| 4. BULGULAR ve TARTIŞMA .....                                                                                    | 41 |
| 4.1. PST İzolatlarının Tanısı .....                                                                              | 41 |
| 4.1.1. PST İzolatlarının Klasik Bakteriyolojik Yöntemlerle Tanısı .....                                          | 44 |
| 4.1.2. PST İzolatlarının ELISA Testi İle Tanısı .....                                                            | 44 |
| 4.1.3. PST izolatlarının PCR Tekniği ile Tanısı .....                                                            | 46 |
| 4.2. PST İzolatlarının Irklarının Tespiti .....                                                                  | 49 |
| 4.3. PST' nin İnfekteli Bitki Artıkları, İnokule Edilmiş Toprak ve<br>Tohumda Yaşam Süresinin Belirlenmesi ..... | 52 |
| 4.3.1. PST' nin İnfekteli Bitki Artıklarında Yaşam Süresinin<br>Belirlenmesi .....                               | 52 |
| 4.3.2. PST'nin İnokule Edilmiş Toprakta Yaşam Süresinin<br>Belirlenmesi .....                                    | 57 |
| 4.3.3. PST'nin İnokuleli Tohumlarda Yaşam Süresinin Belirlenmesi .....                                           | 57 |
| 4.4. Ticari Domates Tohumlarında PST'nin Saptanması .....                                                        | 58 |
| 4.4.1. Yapay Olarak Bulaştırılmış Domates Tohumlarında PST'nin<br>Aranması .....                                 | 60 |
| 4.5. PST' ye Karşı Fiziksel, Kimyasal ve Biyolojik Kontrol Yöntemleri<br>Üzerine Çalışmalar .....                | 62 |
| 4.5.1. Tohum Uygulamaları .....                                                                                  | 62 |
| 4.5.2. Biyolojik Kontrol Çalışmaları .....                                                                       | 66 |
| 4.5.2.1. Aday Antagonistlerin İzolasyonu .....                                                                   | 66 |
| 4.5.2.2. Aday Antagonistlerin PST' ye Karşı Antagonistik<br>Etkilerinin <i>In vitro</i> 'da Testlenmesi .....    | 66 |
| 4.5.2.3. Antagonistlerin PST' ye Karşı Antagonistik Etkilerinin<br><i>In vivo</i> 'da Testlenmesi .....          | 70 |
| 4.5.2.3.(1). Tohum Kökenli İnokuluma Antagonistlerin<br>Etkisi .....                                             | 70 |
| 4.5.2.3.(2). Toprak Kökenli İnokuluma Antagonistlerin<br>Etkisi .....                                            | 72 |

|                                                                    |     |
|--------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.5.2.3.(3). Yeşil Aksamdaki İnokuluma Antagonistlerin             |     |
| Etkisi .....                                                       | 74  |
| 4.5.3. Solarizasyon Çalışmaları .....                              | 79  |
| 4.5.3.1. Toprak Solarizasyonunun Hastalık Gelişimi                 |     |
| Üzerine Etkisi.....                                                | 79  |
| 4.5.3.2. Toprakta İnfekteli Bitki Artıklarındaki Patojen Canlılığı |     |
| Üzerine Solarizasyonunun Etkisi .....                              | 84  |
| 4.5.3.3. Solarizasyonunun Topraktaki Toplam Mikroorganizma         |     |
| Populasyonu Üzerine Etkisi .....                                   | 85  |
| 4.5.3.4. Toprak Solarizasyonunun Verime Etkisi .....               | 87  |
| 5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER .....                                      | 89  |
| KAYNAKLAR .....                                                    | 92  |
| ÖZGEÇMİŞ .....                                                     | 105 |
| EKLER .....                                                        | 106 |

## ÖZ

### DOKTORA TEZİ

#### **DOMATES BAKTERİYEL KARA LEKE HASTALIĞININ (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) TANIMLANMASI, IRKLARININ BELİRLENMESİ VE KİMYASAL SAVAŞIMA ALTERNATİF YÖNTEMLERİN SAPTANMASI ÜZERİNDE ARAŞTIRMALAR**

Yeşim (YİĞENOĞLU) AYSAN  
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

Danışman : Prof. Dr Özden ÇINAR  
Yıl : 1999, Sayfa : 106  
Juri : Prof. Dr. Özden ÇINAR  
Prof. Dr. Hikmet SAYGILI  
Prof. Dr. M. Asil YILMAZ

Bu çalışmada *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (PST)'nin neden olduğu domates bakteriyel kara leke hastalığı fizyolojik, biyokimyasal, patojenite, ELISA ve PCR testleri ile tanımlanmıştır.

Ontario 7710 fidelerinin kullanılmasıyla Türkiye'de PST' ırk 1'in varlığı bu araştırma ile belirlenmiştir.

PST' nin toprakta yaşamını sürdüremediği fakat topraktaki infekteli bitki artıklarında ve tohumlarda yaşamını sürdürebildiği bulunmuştur. Bunlar Çukurova Bölgesinde PST' nin ilk inokulum kaynakları olarak değerlendirilmişlerdir.

Toplam 47 farklı domates tohum örneği in direkt immunofloresans (IFAS), yarı seçici besi yeri kullanımı ve tohum çimlenmesinden sonraki 7 gün içinde kotiledonlar üzerinde tipik hastalık belirtilerinin incelemeleriyle testlenmiştir. Sadece 1 tohum örneği PST ile bulaşık bulunmuştur.

Tohumdaki PST'yi elemine etmek için bronopol ve bakır asetat en etkili tohum uygulamaları olarak bulunmuştur.

Ayrıca PST' ye karşı kimyasal kontrole alternatif kontrol yöntemler (biyolojik kontrol ve toprak solarizasyonu) araştırılmıştır. Toprak, tohum ve yeşil aksamdaki PST inokulumuna karşı bazı antagonistler (4K1f, MTD1) iyi etkiye sahip bulunmuşlardır. Toprak solarizasyonu toprağın 30 cm derinliğine kadar etkili olmuş, hastalık oluşumu % 77 azaltılmıştır ve PST' ye karşı etkili bir kontrol yöntemi olarak değerlendirilmiştir.

**Anahtar kelimeler :** domates bakteriyel kara leke hastalığı, ELISA, PCR, IFAS, ırklar, yaşam, tohum uygulamaları, biyolojik kontrol, toprak solarizasyonu

## ABSTRACT

PhD THESIS

**RESEARCHES ON IDENTIFICATION OF TOMATO BACTERIAL  
SPECK DISEASE (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*),  
DETERMINATION OF RACES AND ALTERNATIVE CONTROL  
METHODS TO CHEMICAL CONTROL**

Yeşim (YİĞENOĞLU) AYSAN

DEPARTMENT OF PLANT PROTECTION  
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES  
UNIVERSITY OF ÇUKUROVA

Supervisor : Prof. Dr Özden ÇINAR  
Year : 1999, Pages : 106  
Jury : Prof. Dr. Özden ÇINAR  
Prof. Dr. Hikmet SAYGILI  
Prof. Dr. M. Asil YILMAZ

In this study, tomato bacterial speck disease caused by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (PST) was identified by physiological, biochemical, pathogenicity, ELISA and PCR tests.

Occurrence of PST race 1 in Turkey were determined using Ontario 7710 seedlings with this research.

It was found that PST can't survive in soil, but it can survive infected plant debris in soil and on seeds. And they were evaluated as primer inoculum of PST in Cukurova Region.

Total 47 different tomato seed samples were tested by IFAS, using semi selective medium and examination for typical speck symptoms on cotyledons within 7 days after emergence for detection of PST in seeds. Only 1 seed sample was found as contaminated by PST.

To eradicate PST from seeds, bronopol and cupric acetate were found as the best seed treatments.

Alternative control methods (biological control and soil solarization) to chemical control against PST were also investigated. Some antagonists (4K1f, MTD1) have the good effective against PST inoculum on seeds and leaves and in soil. Soil solarization was found effective until 30 cm depth of soil, disease incidence was reduce as 77% by soil solarization and it was evaluated as an effective control methods against PST.

**Key words** : tomato bacterial speck disease, ELISA, PCR, IFAS, races, survive, seed treatment, biological control, soil solarization

## ÖNSÖZ

Domates Bakteriyel Kara Leke Hastalığı etmeni olan *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (PST)'nin varlığı 1933 yılından beri bilinmektedir. İlk defa 1978 yılında ABD' de fide üretim alanlarında oluşturduğu epidemi sonucu milyonlarca fide imha edilmiş ve hastalık dünyaya yayılmaya başlamıştır. Ülkemize ise 1970'li yılların sonlarında giriş yaptığı saptanmış ve halen örtü altında ve açıkta domates üretiminin yapıldığı alanlarda problem olmaya devam etmektedir.

Tohumda, toprakta infekteli bitki kalıntılarında uzun süre canlı kalabilen, domates, çeşitli konukçular ve yabancı otlarda epifitik yaşama yeteneğine sahip olan etmen için kimyasal kontrol tek başına başarısız olmaktadır. Etmenin aynı anda pek çok yerde yaşayabilmesi, bakırlı preparatlara dayanıklılık oluşturması ve 2000' li yıllardan sonra metil bromit kullanımına getirilecek sınırlama göz önüne alındığında kimyasal savaşa alternatif kontrol yöntemlerinin araştırılması zorunlu görülmektedir. Bu düşünce ışığı altında yapılan bu doktora tezinde tipik hastalık semptomu gösteren domates bitkilerinden etmenin izolasyonu, fizyolojik, biyokimyasal, patojenite, ELISA ve PCR testleriyle tanısı ve ırkları tespit edilmiştir. Tohumdaki inokulumu elemine etmek amacıyla çeşitli tohum uygulamaları, tohumdaki, topraktaki ve yeşil aksamdaki inokulumu baskı altına almada biyolojik kontrol ajanlarının kullanım olanakları ve toprak solarizasyonunun etkisi araştırılmıştır. Hastalığın entegre mücadelesinde bu uygulamaların birlikte kullanılması ile başarı elde edileceği mümkün görülmektedir.

Bu konularda çalışan ve gelecekte çalışacaklara bu tezde elde edilen bulguların yararlı olması dilerim.

Yeşim AYSAN

## **TEŞEKKÜR**

Çalışmamın her aşamasında yardımlarını esirgemeyen Sayın Hocam Prof. Dr. Özden ÇINAR'a teşekkür ederim.

Çalışmalarım süresince büyük emeği geçen bakteriyoloji laboratuvarı çalışanlarına, teknisyen Seval YÜCESOY'a ve bölüm arazisi personeline teşekkürlerimi sunarım.

ELISA testi çalışmaları için antiserum temin eden Dr. Giora KRITZMAN ve Issac ASSOLINE'e, PCR uygulamalarında gerekli alet ve kimyasalları, IFAS testi antiserumunu sağlayan Dr. Klaus RUDOLPH'a, domates tohum örneklerini temin eden Prof. Dr. Hikmet SAYGILI' ya, IFAS testi işlemlerinde yardımcı olan Dr. Sebiha TOKGÖNÜL'e ve Zirai Mücadele Araştırma Enstitüsüne teşekkürlerimi borç bilirim.

Ayrıca doktora çalışmam süresince manevi desteklerinden dolayı aileme teşekkür ederim.

## **SİMGELER ve KISALTMALAR**

A : Absorbans

ABD : Amerika Birleşik Devletleri

C : Santigrat derece

Ca : Kalsiyum

Cl/PCl : Kloroform/isoamil alkol (fenol)

CTAB : Hexadecyl trimethyl amonyum bromide

DNA : Deoksiribonukleik asit

ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay

F-135 : Fantastik 135

F-144 : Fantastik 144

FITC : Fluorescein isothiocyanate

g : Gram

GSPB : Göttinger Sammlung Phytopathogener Bakterien

H-2274 : Heinz 2274

HCl : Asetik asit

HR : Hypersensitive reaction (aşırı duyarlılık reaksiyonu)

IFAS : In direk immunofluorescence

KB : King's medium B

l : Litre

M : Molar

Mg : Magnezyum

ml . Mililitre

mM : Mili molar

µg : Mikro gram

µl : Mikro litre

N : Azot

NaOCl : Sodyum hipo klorit

OD : Optical density

PB : Phosphate buffer

PBG : Phosphate buffer gliserol  
PBS : Phosphate buffered saline  
PCR : Polymerase chain reaction  
pmol : Piko mol  
PST : *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*  
pv. Pathovar  
RNA : Ribonukleik asit  
rpm : Rounds per minute (dakikada dönüş hızı)  
SDS : Sodyum dodecyl sülfat  
SEM : Scanning electron microscopy  
spp : Species (türler)  
TE : Tris - EDTA (ethylen di amin tetra asetat)  
Tris : Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane  
UV : Ultra violet  
YDCA : Yeast extract calsium carbonat agar  
YPS : Yeast pepton sukroz

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

|                                                                                                                                              |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.1. Bakterilerin genomik DNA'larının saflaştırılmasında kullanılan kimyasal miktarları .....                                                | 24 |
| 4.1. ELISA plate okuyucusunda PST izolatlarının okunan absorbans değerleri .....                                                             | 45 |
| 4.2. Saflaştırılan genomik DNA miktarlarının RNA/DNA calculator aletinde okunan değerleri .....                                              | 47 |
| 4.3. PST izolatların toplandığı yerler, domates bitkileri üzerindeki simptomsu ve ırkları .....                                              | 50 |
| 4.4. PST'nin yaz aylarında hasta bitki artıklarındaki popülasyonu (hücre/g bitki artığı) .....                                               | 53 |
| 4.5. PST'nin kış aylarında hasta bitki artıklarındaki popülasyonu (hücre/g bitki artığı) .....                                               | 55 |
| 4.6. Farklı PST inokulum yoğunlukları ile bulaştırılan domates tohumlarından yetişen fidelerde hastalık gelişimi .....                       | 61 |
| 4.7. Çeşitli tohum uygulamalarının PST' ye olan etkisi .....                                                                                 | 63 |
| 4.8. Çeşitli tohum uygulamalarının tohum çimlenmesine etkisi .....                                                                           | 64 |
| 4.9. <i>In vivo</i> çalışmalarda kullanılan antagonistlerin koloni renkleri ve PST' ye karşı petride oluşturdıkları inhibisyon zonları ..... | 69 |
| 4.10. Aday antagonistlerin bulaşık tohumdan yetişen fidelerde hasta bitki oranı ve hastalık şiddeti %' sine etkisi .....                     | 71 |
| 4.11. Çeşitli antagonistlerin infekteli toprakta yetişen fidelerde hasta bitki oranı ve hastalık şiddeti %' sine etkisi .....                | 73 |
| 4.12. Farklı PST yoğunluklarının domates yapraklarında oluşturdıkları ortalama lezyon sayıları .....                                         | 74 |
| 4.13. Yeşil aksama inokule edilen PST'nin hastalık oluşturmaları üzerine antagonistlerin etkisi .....                                        | 75 |
| 4.14. Solarize edilen ve kontrol parsellerinin farklı derinliklerdeki toprak sıcaklıkları (°C) .....                                         | 79 |
| 4.15. 1994 yılında yapılan ön çalışmada hastalık gelişimi üzerine solarizasyonun etkisi .....                                                | 81 |

|                                                                                                    |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>4.16. Plastik serada yapılan toprak solarizasyonunun hastalık gelişimi üzerine etkisi .....</b> | <b>82</b> |
| <b>4.17. Topraktaki toplam bakteri popülasyonu üzerine solarizasyonun etkisi .....</b>             | <b>86</b> |
| <b>4.18. Verim üzerine solarizasyonun etkisi .....</b>                                             | <b>87</b> |



## ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.1. PST' nin domates yaprak, gövde ve meyve sapında oluşturduğu tipik hastalık simptomsu .....                                                                                                                                                                                                                            | 2  |
| 3.1. Domates tohumlarında PST'nin aranmasında izlenen prosedür .....                                                                                                                                                                                                                                                       | 30 |
| 4.1. <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> 'nun Hatay ili Samandağ ilçesinde bir plastik serada domates bitkisinin gövdesinde oluşturduğu leke .....                                                                                                                                                               | 41 |
| 4.2. <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> 'nun Antalya ili Gazipaşa ilçesinde bir plastik serada domates bitkisinin meyve sapında ve gövdesinde oluşturduğu uzunca siyah lekeler .....                                                                                                                            | 42 |
| 4.3. <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> 'nun İçel ili Erdemli ilçesinde bir plastik serada domates bitkisinin yaprağında oluşturduğu etrafı sarı hale ile çevrili lekeler .....                                                                                                                                 | 43 |
| 4.4. <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> 'nun Adana ili Yumurtalık ilçesinde açık alandaki bir domates meyvesinde oluşturduğu lekeler .....                                                                                                                                                                      | 43 |
| 4.5. PST izolatlarının ELISA testi sonucu oluşturduğu reaksiyon .....                                                                                                                                                                                                                                                      | 46 |
| 4.6. PST izolatlarının genomik DNA'larının agarose jel üzerinde oluşturduğu bantlar (hat 1: PT4, hat 2: H1, hat 3: 4215, hat 4: K1, hat 5: 13/2, hat 6: AU1, hat 7: A3f, hat 8: steril su, hat 9-11 : 200 ng marker).....                                                                                                  | 48 |
| 4.7. PCR ile çoğaltılan PST izolatları DNA'larının agarose jel üzerinde oluşturduğu bantlar (hat 1: steril su, hat 2-6: boş, hat 7: PT1, hat 8: PT2, hat 9: boş, hat10: GPG2, hat 11: KGS1, hat 12: DY1, hat 13: Dan11a, hat 14: A3f, hat 15:H2a, hat 16: boş, hat 17: H1, hat 18: boş, hat19: 1B ve hat 20: AAD-1b) ..... | 48 |
| 4.8. H2a izolatının H-2274, Pto geni içeren H-2274 ve Ontario 7710 çeşitleri üzerinde oluşturduğu tipik hastalık simptomsu .....                                                                                                                                                                                           | 49 |
| 4.9. PST'nin yaz aylarında hasta bitki artıklarındaki popülasyonu (log hücre/g bitki artığı) .....                                                                                                                                                                                                                         | 54 |
| 4.10. Topraktaki PST inokulumunun fide kotiledon yapraklarında oluşturduğu lezyonlar .....                                                                                                                                                                                                                                 | 54 |
| 4.11. PST'nin kış aylarında hasta bitki artıklarındaki popülasyonu (log hücre/g bitki artığı) .....                                                                                                                                                                                                                        | 56 |

|                                                                                                                         |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.12. Topraktaki PST inokulumunun domates yaprak ve çiçek çanak<br>yapraklarında oluşturduğu lekeler .....              | 56 |
| 4.13. PST ile bulaştırılan tohumlardan gelişen fidelerdeki ortaya<br>çıkan belirtiler .....                             | 61 |
| 4.14. Bakır asetat uygulaması görmüş domates tohumları .....                                                            | 65 |
| 4.15. Petride çimlenme testinde PST ile infekteli tohumdan gelişen<br>fidedeki belirtiler .....                         | 65 |
| 4.16. <i>In vitro</i> petri denemelerinde 4K3g ve MTD1 izolatlarının PST' ye karşı<br>oluşturduğu inhibisyon zonu ..... | 68 |
| 4.17. PST ile bulaşık tohumlardan gelişen kontrol fidelerdeki lekeler .....                                             | 70 |
| 4.18. A3f izolatının domates yaprağında oluşturduğu lekeler .....                                                       | 74 |
| 4.19. Solarizasyon uygulamasının yapıldığı alan .....                                                                   | 83 |
| 4.20. Solarizasyon sonrası tohum ekimi yapılan parsellerde kotiledon<br>yapraklarda oluşan lekeler .....                | 83 |

## 1. GİRİŞ

Ülkemizde 1995 yılı verilerine göre 6.625.510 dekar alanda 17.5 milyon ton sebze üretimi yapılmaktadır. 7.250.000 ton üretimle ülkemizde en fazla yetiştirilen sebze, domatestir. Akdeniz Bölgesi, açıkta ve örtü altında yapılan domates üretimi göz önüne alındığında 1.850.040 ton üretimle 9 tarımsal bölge içinde 3. sırada yer alırken sofralık domates üretimi incelendiğinde Akdeniz Bölgesi 1. sıraya yerleşmektedir (Devlet İstatistik Enstitüsü, 1998).

Beslenmemizde önemli bir yer tutan domates, sebze olarak tüketiminin yanında salça olarak da tüketilmektedir. Eskiden yalnızca yaz ve sonbahar sebzesi olarak bilinen domates, artık ülkemizde dört mevsim bulunabilen bir ürün olmuştur. Sera yetiştiriciliğinin ilerleme kaydetmesi ve gıda endüstrisinin iç ve dış pazarlara dayalı olarak canlanması domatesi en çok aranan bir ürün haline getirmiştir.

Domates yetiştiriciliği yönünden uygun iklim koşullarına sahip ülkemizde üreticiyi bugün hala meşgul eden çeşitli güçlükler vardır. Bunlardan biri ve belki de en önemlisi hastalıklardır. Son yıllarda domates üretiminde azalmanın olduğu ve bunun hastalık artışına bağlı olduğu bildirilmektedir (Karaca ve Saygılı, 1982). Pahalı yatırımlar ve iyi bir işletmeciliği gerektiren seracılıkta üreticilerin her yıl aynı ürünü yetiştirme alışkanlıkları, yeterli havalandırmanın yapılmayışı, hastalıklı bitki kalıntılarının seradan uzaklaştırılmaması nedeni ile bitkiler pek çok hastalıktan etkilenmekte ve önemli verim kayıpları ortaya çıkmaktadır (Yıldız ve ark, 1991). Oluşan hastalıklar üreticiyi büyük zararlara sürüklerken, zarar eden sadece üretici olmamakta, domates üretimine bağlı olan gıda endüstrisi de gerekli faaliyeti gösterememektedir.

Domateslerde verimi azaltan bitki hastalık etmenlerinden fungal ve viral hastalıkların yanı sıra son yıllarda önemli pek çok bakteriyel hastalıklar da sorun olmaya başlamıştır (Karaca ve Saygılı, 1982). Domatesin pazar değerini düşüren ve verimi azaltan bakteriyel bir hastalık da *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*'nun (PST) neden olduğu Domates Bakteriyel Kara Leke Hastalığıdır.

Patojen, domates bitkisinin yaprak, çiçek, gövde ve meyve gibi bütün toprak üstü organlarını hastalandırır (Şekil 1.1). Hastalığın belirtileri, yapraklarda sarı bir hale ile çevrili koyu kahverengi-siyah lekelerdir. Bu lekeler birleşerek yaprağın

kurumasına neden olur. Gövde ve yan dallardaki lekeler kahverengi-siyah renkte uzunca ve yüzeyseldir. Çiçeklerdeki lekeler yapraklardaki kadar belirgin değilse de özellikle ilk çiçeklerde hastalık görülürse meyve tutumunu engelleneceğinden büyük ürün kayıpları oluşur (Sherf ve Macnab, 1986).



Şekil 1.1. PST' nin domates yaprak, gövde ve meyve sapında oluşturduğu tipik hastalık simptomsu

Çiçeklenmeden sonra ortaya çıkan epidemilerde meyveler yoğun zararlara uğrayabilir. Meyve lekeleri yaklaşık 1 mm çapında, yüzeysel, dokunmayla belli olacak kadar dışarı çıkıntılıdır. Özellikle aşırı yağmur, dolu ve rüzgar sonucu oluşan yaralardan dolayı zarar artar ve hastalık hızlı bir şekilde gelişir. Etmen özellikle yeşil meyveleri hastalandırır (Yunis ve ark., 1980). Meyvelerde oluşan bu lekeler birleşince meyve şekli bozulur. Şiddetli zarardan sonra lekeli meyveler küçük kaldığından pazar değeri azalır (Goode ve Sasser, 1980).

Patojenin gelişmesi için yüksek nem ve 13-28°C sıcaklığa gereksinim vardır. Üründeki verim kaybı iklim koşulları ile direk ilişkilidir. Ekim ayında fide dikiminin yapıldığı tarihlerde seralarda iklim koşulları patojen gelişimi için uygun olduğundan infekteli bitki oranı %75' iken, havaların ısındığı mevsim sonunda ise bu oran %5'e düşmektedir (Yunis ve ark, 1980). Şiddetli etkilenen bir domates tarlasında %12-23'e kadar varan ürün azalışının olabileceği bilinmektedir (Bashan ve ark, 1978; Yunis ve ark, 1980; Aysan ve ark, 1995).

Çalışmanın yürütüldüğü Doğu Akdeniz Bölgesinde domates tarımı İçel ve Hatay illerinde yoğun olarak yapılmaktadır. İçel ili Huzurkent, Erdemli, Kocahasanlı ve Silifke ilçelerinde ve Hatay ili Samandağ ilçesinde örtü altında plastik seralar içerisinde üretim yapılmakta, Hatay'ın Kırıkhan ilçesinde de daha çok açıkta tarla domatesi üretimi gerçekleştirilmektedir. Üretici örtü altı yetiştiriciliğinde genellikle İsrail kökenli sınığa alınan hibrit çeşitleri (F-135, F-144), tarla yetiştiriciliğinde ise yurt içinde üretilen açık döllenlen standart H-2274 veya Linda çeşitlerini tercih etmektedir. Standart çeşitlerin tohumlarını üretici bir yıl önceki üretimden sağlamaktadır. Ç. Ü. Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Bakteriyoloji laboratuvarı elemanlarının bu yörelerde yaptığı yaklaşık 6 yıllık arazi çalışmalarında kullanılan hibrit ve standart çeşitlerin bu hastalığa son derece duyarlı olduğu gözlenmiştir. Bölgemiz koşullarında özellikle serin ve yağışlı geçen kış aylarını takiben Şubat ve Mart aylarında plâstik seralarda PST' nin şiddetli infeksiyonlarına rastlanılmaktadır. Yeterli havalandırmanın yapılamaması sonucu aşırı nemli olan bu plâstik seralarda yaygın olarak çiçek ve gövde infeksiyonları ortaya çıkmaktadır. Ancak standart çeşitlerde meyve simptomlarının çok fazla olduğu, kabuğu kalın, sert, yola dayanıklı ve ihracatta tercih edilen hibrit çeşitlerde ise çok az oranda olduğu gözlenmiştir.

Eskiden az bir ekonomik öneme sahip olduğu düşünülen bu hastalık şimdi domateslerin ürün ve kalite miktarını azaltan önemli bir bakteriyel hastalık olarak dünyaca kabul edilmektedir (McCarter ve ark, 1983; Devash ve ark, 1980).

Hastalık ilk olarak, 1929'da Amerika Birleşik Devletlerinde Wisconsin'de, 1930'da Florida'da görülmüştür. 1931'de Florida'da yapılan çalışmalar ile yeni bir hastalık olarak tanılanmıştır (Bryan, 1933). Her ne kadar 1930'lu yılların başından beri hastalığın varlığı bilinse de 1978'e kadar yoğun epidemilerine rastlanılmamıştır.

1978'de Georgia'da 1.600 dönümlük fide üretim alanındaki tüm bitkilerin bu hastalıktan dolayı imha edilmesinden sonra hastalık dikkat çekmeye başlamıştır. Fide üretimlerinin yapıldığı tarlada tek bir bitkinin hasta olması tehlike teşkil etmektedir. Çünkü hastalık uygun koşullarda kısa sürede diğer bitkilere hızlı bir şekilde yayılma özelliğine sahiptir (Smitley ve McCarter, 1982; McCarter ve ark, 1983).

Domates Bakteriyel Kara Leke Hastalığının varlığı Amerika (Bryan, 1933), İsrail (Volcani ve ark, 1971), İsviçre (Burki, 1971. Bosshard-Heer ve Vogelsanger, 1977' den), Yeni Zelanda (Wilkie ve Dye, 1974), Avustralya (Chambers ve Merriman, 1975), Kanada (Bonn, 1980), Yunanistan (Mavridis ve Rudolph, 1981), Fransa (Laterot ve Rat, 1981), Çek Cumhuriyeti (Kudela ve ark, 1984), Portekiz (Oliveria ve De Santa-Marta, 1985), Fas (Colin, 1985), İtalya (Tamietti ve Cuguddo, 1987), Şili (Latorre ve Lolas, 1988), Bulgaristan (Bogatsevska ve Boneva, 1991), Brezilya (Mariano ve Mc Carter, 1992) ve Eski Yugoslavya (Arsenijevic ve Jcanovic, 1993)'da çeşitli araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir. Ülkemizde ise ilk tespitler 70'li yılların sonlarında Akdeniz Bölgesinde Çınar (1977a) ve Ege Bölgesinde Saygılı (1975) tarafından yapılmıştır.

Hastalığın ortaya çıkışı ile dünyada çeşitli ülkelere yayılışı yaklaşık aynı zamana denk gelmektedir. Bu yıllarda PST 'nin ekolojisi ve epidemiolojisi hakkında detaylı bilgilerin olmamasından dolayı hastalığın tarlada ilk çıkışının ve yayılışının tohumla olduğu düşünülmüştür. Ancak o tarihlerde hastalık hakkında yapılan çalışmaların azlığı, duyarlı tohum testlerinin bulunmayışı nedeniyle PST' nin tohumla yayıldığı kanıtlanamamıştır (McCarter ve ark, 1983). Ancak 80'li yıllarda Amerika Birleşik Devletleri (Kim, 1979) ve İsrail'de (Devash ve ark, 1980) yapılan çalışmalar ile patojenin tohumla taşındığı saptanmış ve dünyanın çeşitli bölgelerine aynı anda yayılış nedeninin tohumlar olduğu düşünülmüştür (McCarter ve ark, 1983).

Tohum endüstrisinin dünyada aktif hale gelmesi ile birlikte bölgeler, ülkeler ve kıtalar arası tohum alışverişi sonucu tohum kökenli bakteriyel hastalıklar buralara taşınabilmektedir (Kritzman, 1994). Tohum ticaretinin çok iyi kontrol edilemediği ülkemizde tohumla taşınan hastalıklar her zaman bir risk oluşturmaktadır (Karaca ve Saygılı, 1982, Baloglu ve ark, 1998). Yasal ve yasal olmayan yollarla yapılan

domates tohumu ithali ile hastalık etmenlerinin ülkemize sokulduğu da ayrı bir gerçektir (Öktem, 1985). Bölgemiz domates seralarında hemen hemen her yıl görülen söz konusu olan bu hastalığın varlığı erken dönemlerde saptanamamaktadır. Domates tohumları üzerinde yaşamını sürdüren PST (Chambers ve Merrimann, 1975; Bashan ve ark, 1978), tohumun çimlenmesi sırasında popülasyonunu artırır ve tohum kabuğundan fide apeksine veya kotiledon yapraklarına yayılarak yaprak, gövde ve yakınındaki fideyi bulaştırabilir (Kritzman, 1993a). Tohumlardaki patojenin gerek az popülasyonlarda gerekse latent halde bulunmasından (Gitaitis ve ark, 1986) dolayı düşük miktardaki inokulum yoğunluğunun klâsik bakteriyolojik tekniklerle saptanması hem zor hem de uzun süreye, değişik kimyasallara, araç ve gereçlere ihtiyaç duyduğundan çoğu zaman yetersiz kalmaktadır. Patojenlerin tanılanmasında kısa sürede sonuç veren hızlı ve güvenilir yöntemler olan moleküler, serolojik ve faj (Cuppels, 1983; Cuppels, 1994; Erkan ve Saygılı, 1987) tekniklerinden tek başlarına veya petri teknikleri ile kombinasyon hâlinde yararlanılmaktadır. Bu amaç doğrultusunda ouchterlony double diffusion (ODD), micro agglutinasyon (MA), in direk immunofluorescence (IFAS) (Jones ve ark, 1983), polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) (Nabizadeh-Ardekani ve ark, 1995) ve DNA hibridizasyon teknikleri (Denny, 1988) ile tanı yapılmaktadır.

Karantina amaçlı tohum kontrollerinde kullanılan yöntemlerin çok kısa zamanda sonuç vermesi ve güvenilir olması gerekmektedir. Son yıllarda tohumdaki bakteriyel patojenlerin tespiti için duyarlı testler üzerine çalışmalar yapılmakta ve kullanılan yöntemler geliştirilmeye çalışılmaktadır (Kritzman, 1993a; Kaaya ve Mortensen, 1993). Geçmişte sağlık sertifikaları, tarla gözlemlerine veya tohumlardan gelişen fidelerdeki lezyonlara göre yapılmaktaydı fakat son yıllarda bir laboratuvar sertifikasına ihtiyaç duyulmaktadır (Kritzman, 1994). Tohum ekstraksiyonu sonucu elde edilen peletdeki bakterilerin seçici veya yarı seçici ortamlarda geliştirilmesi (Scortichini, 1990; Kaaya ve Mortensen, 1993), ELISA (Yorgancı ve ark, 1994), Immunofluorescence boyama (Bolkan, 1987; Jones ve ark, 1989) ve Polimeraz zincir reaksiyonu (Nabizadeh-Ardekani ve ark, 1995) gibi serolojik ve moleküler yöntemlerin kullanılması ve tohumlardan gelişen fidelerdeki lezyonların gözlenmesi (Jones ve ark, 1989) gibi aşamalardan sonra tohumdaki patojen tespit

edilebilmektedir. İn direk immunofluorescence boyama ve ELISA testlerinde ölü hücreler de pozitif sonuç verdiğiinden bakterilerin canlılığının patojenite ve petri testleriyle saptanması zorunludur.

PST, tohumun dışında toprakta ve infekteli bitki kalıntılarında yaşamını devam ettirebilir. PST' nin toprak ve bitki kalıntılarındaki yaşamı ile ilgili çeşitli görüşler mevcuttur. Araştırmacıların bir kısmı toprak ve bitki kalıntılarında bu patojenin yaşamadığını (McCarter ve ark, 1983), bir kısmı toprakta en fazla bir yıl varlığını sürdürdüğünü (Bashan ve ark, 1978), bir kısmı toprakta bir kaç ay, infekteli bitki kalıntılarında bir sonraki mevsime kadar yaşadığını (Goode ve Sasser, 1980) bazıları ise sadece bitki kalıntılarında canlı kaldığını ve primer enfeksiyonları başlatma yeteneğinde olduğunu bildirmişlerdir (Getz ve ark, 1981; Perez ve ark, 1987; Jardine ve ark, 1988). Batı Anadolu Bölgesi domates ekim alanlarındaki toprakta PST 'nin en fazla 1-14 gün yaşadığı belirlenmiştir (Saygılı ve ark, 1985). Bu yaşam süresi farklı toprak tiplerine göre değişmektedir.

Bitki patojen bakterilerin bir mevsimden diğerine geçişte yakınındaki bitkilerde epifitik yaşamı önemli bir kriterdir. PST 'nin symptomsuz olarak yabancı otlarda (Bogatzevska ve Boneva, 1991), domates ve konukçusu olmayan bitkilerde (Jones ve ark, 1981) epifitik yaşamı kültürel pratiklerle mücadelesini zorlaştırmaktadır (Devash ve ark, 1980).

Bu hastalığın kontrolünde çeşitli kültürel pratikler, sertifikalı hastaliksız üretim materyali kullanımı, tohum kimyasal ve biyolojik uygulamalar, yeşil aksam ilaçlamaları, toprak solarizasyonu ve dayanıklı çeşidi içine alan kombine uygulamaların birlikte kullanımı önerilmektedir (Bennett ve ark, 1991).

Domates Bakteriyel Kara Loke Hastalığına karşı dayanıklı çeşit kullanımı ile etkili kontrolü sağlanabilir. Bu yolla pek çok hastalık kolayca ve tümüyle bir bölümü ise kısmen kontrol edilmektedir (Abak ve ark, 1989). Pitblado ve Kerr (1980) Kanada menşeli olan Ontario 7710 isimli domates çeşidinin PST' ye dayanıklı olduğunu bildirmiştir. Ancak Lawton ve Macneil (1986) Kanada'da 4 yıl boyunca yaptıkları sörveylerde Ontario 7710 çeşidinde tipik PST belirtilerine rastlamışlardır. Bu çeşit üzerinde belirtilere neden olan etmeni PST Irk 1, hiçbir

simptom oluşturmaz ise Irk 0 olarak tanımlanmışlardır. PST 'nin yeni bir ırkının varlığı ile birlikte bu çeşidin kullanımı sınırlanmış olmaktadır.

Tohum ve toprak kökenli bu hastalığın kontrolünde sadece temiz tohum kullanmak ve kimyasallarla ilaçlama yapmak yeterli olmamaktadır. Uygulama yapılmadığı takdirde patojen topraktaki bitki kalıntılarında yaşamını devam ettirerek bir sonraki mevsime geçmekte ve hastalığın ortaya çıkışında ilk inokulum kaynağı olarak görev yapmaktadır (Goode ve Sasser, 1980). Patojenin topraktan eleminasyonu için kullanılan uygulamalardan biri toprağı plâstik ile ısıtma yöntemi olan solarizasyondur (Katan, 1980). Toprak solarizasyonu nemli toprağın Güneş ışınları aracılığıyla ısıtılması temeline dayanan fiziksel bir mücadele yöntemidir (Doğan, 1995). Solarizasyon yöntemi ucuz ve kolay olmasının yanında kalıntı probleminin olmamasından dolayı tercih edilmektedir. Toprak kökenli hastalıkları kontrol etmek için toprak fümigasyonu ve sterilizasyonu gibi yöntemler de kullanılabilir. Ancak her iki uygulama topraktaki zararlı mikroorganizmaların yanında antagonistlere de etkilidir. Fümigasyon uygulaması sonucunda bitkilerde bir fitotoksite görülebilir. Bu uygulamalar solarizasyona göre daha riskli ve pahalıdır. Metil bromit gibi kimyasalların ozon tabakasına verdiği zarar göz önüne alındığında pek çok dezavantaja sahiptir.

Solarizasyon bugün İsrail başta olmak üzere Yunanistan, İtalya, Fransa ve İspanya gibi Akdeniz ülkelerinde fungal, bakteriyel hastalıklar ve nematodlara karşı kullanılmaktadır (Katan, 1989). Ayrıca solarizasyon topraktaki organik maddeyi parçalayarak N, Ca ve Mg oranını arttırmakta ve böylece bitki beslenmesine yardımcı olmaktadır (Stapleton ve ark, 1991).

Bugün gelişmiş ülkeler tarım alanlarındaki hastalık ve zararlılara karşı mücadelede alternatif yöntemleri araştırmakta entegre mücadele programları içerisine biyolojik mücadele çalışmalarını dahil etmeyi hedeflemektedir (Tjamos, 1995). Bu çalışmalar fitopatolojide yeni olmasına rağmen son yıllarda başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Patojenlerin inokulum düzeyini azaltmak veya yok etmek için yapılan bu mücadele şekli gelecekte kimyasal kontrolün yerini alabilecektir (Elad, 1990). Bilindiği gibi pek çok hastalığın kontrolünde antagonist bakterilerden rahatlıkla yararlanılmaktadır. Domates tohumlarındaki *Ralstonia solanacearum*,

*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (El-Abyad ve ark, 1993) ve *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Çınar ve Aysan, 1995) gibi tohum kökenli bakteriyel patojenlerin inokulum miktarını azaltmak için çeşitli antagonist bakteri ve *Streptomyces* 'lerin tohumu uygulandığında fidedeki hastalık çıkışını azalttığı bu araştırmacılar tarafından bildirilmiştir. Bakteriyel hastalıkların kimyasal mücadelesinde çoğunlukla bakırlı bileşikler kullanılmaktadır.

Son yıllarda bazı domates alanlarında bakırlı preparatların etkisiz kaldığı görülmüş ve PST' nin bakırlı bileşiklere dayanıklılık kazandığı tespit edilmiştir (Cooksey, 1986; Pernezny ve ark, 1995, Benlioğlu ve Benlioğlu, 1998). Özellikle bakırlı preparatların PST mücadelesinde yetersiz kaldığı alanlarda biyolojik kontrol önem kazanmaktadır (Wilson ve ark, 1997).

Hastalık simptomsu gösteren domates bitkilerinden patojenin izolasyonu, fizyolojik ve biyokimyasal testlerin yanında ELISA ve PCR testleri ile tanısı ve ırklarının saptanması, PST 'nin tohum, toprak ve infekteli bitki kalıntılarında yaşam süresinin belirlenmesi, tohumdaki patojenin varlığının IFAS ve petri testleriyle saptanması, patojenin tohumdan eliminasyonu için başarılı bir tohum uygulamasının belirlenmesi, solarizasyon uygulaması ile patojenin topraktan yok edilmesi veya baskı altına alınması, antagonist bakterilerle yeşil aksam, toprak ve tohumdaki PST inokulumunun azaltılması bu çalışmanın amacını oluşturmaktadır.

## 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

### 2.1. PST' nin Irkları Üzerine Çalışmalar

Bu hastalığa karşı dayanıklı çeşit bulmaya yönelik çalışmalar 1970'li yılların sonlarında başlamıştır. Pitblado ve Kerr (1980) Kanada kökenli Ontario 7710 çeşidini PST' ye dayanıklı olarak bulmuşlar ve bir süre sonra bu çeşidin Kanada'da kullanımı yaygınlaşmıştır. Ayrıca PST' ye dayanıklı çeşit arama çalışmaları o yıllarda ülkemizde de yapılmıştır. Fakat birkaç yıl sonra bu çeşit üzerinde simptom oluşturan PST' nin yeni bir ırkı ortaya çıkmıştır. Dayanıklı çeşit ve patojenin ırkları ile ilgili yapılan çalışmalar aşağıda anlatılmıştır.

Çınar (1978) gerçekleştirdiği çeşit reaksiyonu denemesinde Supermarmande ve Montfavet 63/5 F1 çeşitlerinin PST' ye çok duyarlı, Antalya 1 ve Antalya 2 F1 çeşitlerinin ise daha az duyarlı olduğunu saptamıştır.

Pitblado ve Kerr (1980) inceledikleri 210 domates çeşidinden sadece "Ontario 7710" çeşidinin PST'ye bağışıklık düzeyinde dayanıklı, Manette çeşidinin kısmen dayanıklı olduğunu belirlemişlerdir. Ontario 7710 çeşidindeki dayanıklılık özelliğinin monogenik dominant olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Laterrot ve Rat (1981) 71 farklı domates çeşidi üzerinde 98 değişik PST izolatının duyarlılıklarını incelediklerinde sadece Ontario 7710 çeşidinin tüm izolatlara karşı dayanıklı olduğunu bildirmişlerdir.

Karaca ve Saygılı (1982) 6 domates çeşidinin PST' ye aynı düzeyde duyarlı olduğunu ülkemizde yapılan bir çalışma ile saptamışlardır.

Kerr ve Cook (1983) erkenci, düzgün ve yuvarlak şekilli, mekanik hasada uygun ve PST' ye dayanıklılık özelliğine sahip Ontario 7710 çeşidinin ıslah çalışmalarında başlangıç materyali olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir. Bu dayanıklılığın monogenik dominant bir özellik olduğunu ve dayanıklılık geninin "Pto" olarak ifade edilmesini önermişlerdir.

Ülkemizde yapılan bir çalışmada Çökmüş (1984) 54 yerli domates çeşidimiz ve 2 yurtdışından gelen toplam 56 domates çeşidinin PST' ye karşı tepkisini araştırdığında sadece Ontario 7710 çeşidinin dayanıklı diğer çeşitlerin hastalıktan az veya çok etkilendiğini gözlemiştir.

Abak ve ark. (1989) Ontario 7710 çeşidinin PST' ye dayanıklılığının kalıtsal olduğunu, bu çeşidin meyve şeklinin küçük ve veriminin düşük oluşu nedeni ile tarımsal değerinin kısıtlanmakta olduğunu bildirmişlerdir. Araştırılan bu çeşidin önemli bir ıslah materyali olması nedeniyle ülkemizde yaygın biçimde kullanılan çeşitlere bu özelliğin aktarılması gerektiğini vurgulamışlardır. Bu amaç doğrultusunda Abak ve ark. (1990) Ontario 7710 çeşidinde bulunan PST' ye dayanıklılık genini (*Pto*) geriye melezleme yöntemi ile H2274 ve ES 58 (2889)F çeşitlerine aktarmışlar ve Türkiye'nin değişik domates ekim alanlarından elde edilen PST izolatlarının hepsini patojen olduğunu, Ontario 7710 çeşidinde simptom oluşturmadıklarını ve bu dayanıklılık geni aktarılan H-2274 ve ES 58 (2889)F çeşitlerinin tüm izolatlara karşı yeterli dayanım gösterdiğini saptamışlardır.

Varvaro ve ark. (1993) duyarlı ve dayanıklı (Ontario 7710) domates çeşitlerinin yapraklarına PST süspansiyonunu püskürttükten sonra elektron mikroskobu ile yaptıkları incelemelerde stoma yapısının her iki çeşitte farklı olduğunu saptamışlar ve dayanıklı çeşitteki bu yapısal farklılık patojenin bitki içerisine girişinde fiziksel bir bariyer olarak rol oynadığını bildirmişlerdir.

Ontario 7710 çeşidindeki dayanıklılık geninin diğer domates çeşitlerine aktarılışındaki başarılar ilk bakışta bu hastalığın yeterli kontrolünün sağlanacağını ortaya koymuştu. Fakat Lawton ve MacNeil (1986) Kanada'da 1982 -1985 yılları arasında yaptıkları sürveylerde PST'nin yeni bir patojenik ırkını saptadıklarını bildirmişlerdir. *Pto* geni içeren PST' ye dayanıklı olarak bilinen Ontario 7710 çeşidi üzerinde tipik PST simptomu oluşturan bu ırkı, PST Irk 1 olarak isimlendirmişler ve sürvey alanının %65-100'ünde bu ırkı saptamışlardır. Bu ırkın varlığı Kanada dışında Bogatsevskaya ve ark. (1989) tarafından Bulgaristan'da ve Buonauro ve ark. (1996) tarafından İtalya'da rapor edilmiştir.

## **2.2. PST' nin Tohum, Toprak ve İnfekteli Bitki Artıklarında Yaşam Süresinin Belirlenmesi Üzerine Çalışmalar**

PST'nin 1970'li yılların sonunda pek çok ülkede özellikle ABD ve İsrail'de yaptığı epidemilerden sonra gerçekleştirilen ilk çalışmalar patojenin tohum ve toprak ilişkilerine dayalıdır.

Schneider ve Grogan(1977) Kaliforniya (ABD)'da infekteli bitkilerin bulunduğu tarla toprağından patojeni o yıl içinde ve bir yıl sonra domates yetiştirilen ve yetiştirilmeyen aynı tarlalardan tekrar elde etmişler ve PST' yi toprak kökenli bir patojen olarak değerlendirmişlerdir. Bir sonraki yıl epidemilerinin başlaması için toprak kökenli inokulumun yeterli olduğunu, PST'nin domates bitkilerinde, yabancı otlarda ve civardaki diğer bitkilerde semptomsuz olarak yaşamını devam ettirdiğini ve bir epifitik faza sahip olabileceğini saptamışlardır.

Bashan ve ark. (1978) İsrail'de yaptıkları çalışmalarda domates yetiştirilen bir tarladan ve bir yıl sonra buğday ekilen aynı tarladan tekrar PST' yi izole etmişlerdir. PST ile bulaşık 2 ticari tohum partisinden gelişen fidelerde hastalık semptomlarının oluştuğunu ancak yüzey sterilizasyonu yapılan tohumlardan yetiştirilen fidelerde hastalığa rastlanmadığını ve bu tohumlardan tekrar PST'nin izole edilemediğini rapor etmişlerdir. Ayrıca domates bitkilerinin çeşitli kısımlarına uygulanan PST inokulasyonundan sonra yapılan Scanning Elektron Mikroskobu (SEM) incelemelerinde etmenin bitki iletim sistemini etkilemediğini böylece hastalığın sistemik değil lokal lezyon hastalığı olduğunu saptamışlardır.

Okon ve ark. (1978) İsrail'de 10 ticari domates tohum partisinde patojeni belirlemişlerdir. PST 'nin toprak, tohum yüzeyi ve bitki yapraklarında 2 –12 ay arasında varlığını sürdürdüğünü ve sera koşullarında infekteli toprağına yüzey sterilizasyonu yapılan tohumlar veya steril toprağına bulaşık tohumlar ekildiğinde bitkilerde semptomlar oluştuğunu bildirmişlerdir.

Kim (1979) ABD'de PST ile infekteli domates meyvelerinden elde edilen tohumlardan ve ticari tohum partisinden patojeni izole etmiş ve 17-26°C' de, nemli koşullarda bir aylık inkübasyondan sonra gelişen fidelerde hastalık semptomlarının ortaya çıktığını gözlemiştir.

Devash ve ark. (1980) serada nemli koşullarda yapay infekteli toprağına yüzey sterilizasyonu yapılan tohumlar veya steril toprağına yapay olarak bulaştırılmış domates tohumları ektiklerinde fidelerde hastalık semptomları gelişmiş ve böylece patojenin tohum ve toprak kökenli olduğu belirtilmiştir. Ayrıca PST' yi kuru tohum yüzeyinden, steril topraktan, doğal topraktan, domates ve diğer konukçu olmayan bitki rizosferinden tekrar izole etmeyi başarmışlardır.

Getz ve ark. (1981) ABD, Michigan koşullarında rifampicine dayanıklı bir PST izolatu ile infekteli bitki artıklarını bir torba içerisinde toprağın 0, 8 ve 17 cm derinliklerine gömmüşlerdir. Kış ayları boyunca yapılan aylık izolasyonlarda etmeni geri izole etmişler ve domates tarlalarında esas inokulum kaynağının infekteli yapraklar olduğunu bildirmişlerdir.

Bashan ve ark. (1982) kurutulmuş domates tohumları üzerinde PST'nin 20 yıl yaşamını sürdürdüğünü saptamışlardır.

McCarter ve ark. (1983) ABD, Georgia bölgesinde fide üretimi için kullanılan domates tohumlarını incelemişler ve 1566 tohum partisinin 19'unda PST'yi saptamışlardır. Patojenin toprak, bitki artıkları ve yabancı otlardaki canlılığı üzerindeki çalışmalarında PST' nin toprak ve bitki artıklarında hızlı bir şekilde öldüğünü 15 ile 24 gün sonraki izolasyonlarla ortaya koymuşlardır. Güney Georgia gibi yüksek toprak sıcaklığı koşullarında PST' nin toprak ve bitki artıklarında canlılığını kısa sürede kaybettiği fakat düşük sıcaklıktaki topraklarda varlığını sürdürebileceğinin olası olduğunu bildirmişlerdir. Bu araştırmacılara göre PST'nin esas inokulum kaynağı tohum ve yabancı ot konukçularıdır.

Colin ve Mahtaj (1984) Fas'da doğal koşullar altında PST'nin bir mevsimden diğerine geçişte yapay olarak bulaştırılmış toprakda, bitki artıklarında, yabancı otlarda ve infekteli domates meyvelerinden çıkarılan tohumlarda patojenin yaşamını araştırmışlar ve iki gelişme mevsimi arasında PST'nin yaşamının değişken olduğunu ve diğer mevsime kadar toprak ve infekteli bitki artıklarında yaşamını devam ettiremediğini bildirmişlerdir.

Saygılı ve ark. (1985) Batı Anadolu'nun Balıkesir, Bursa, Çanakkale, İzmir, Manisa ve Muğla illerinde 1981-1984 yılları arasında domates yetiştirilen alanlardan toplanan toprak örneklerinde PST'nin topraktaki yaşam süresini araştırmışlardır. Steril toprakta etmenin kısa (1-30 gün), steril olmayan toprakta daha uzun süre (1-90 gün) yaşamını devam ettirdiğini saptamışlardır.

Gitaitis ve ark. (1986)'na göre PST toprak koşullarına bağlı olarak bitki artıkları ve toprakta yaşamını devam ettirerek diğer mevsime kadar canlılığını koruyabilmektedir. Sıcaklık ve toprak mikrobiyal aktivitesi PST'nin yaşamına etki eden esas kriterlerdir. PST, düşük sıcaklıklarda, toprak ve infekteli bitki artıklarında

12 hafta veya daha uzun süre yaşamını sürdürürken uygun olmayan mikrofloranın varlığında, yüksek sıcaklıkta kurumuş bitki artıklarında veya toprakta 2 hafta içinde yok olmaktadır. Tarlada PST inokulumu çok az olsa bile sıcaklık ve toprak nemi gibi uygun koşullar oluştuğunda populasyon hızlı bir şekilde artış gösterir ve yayılmaya başlar.

Perez ve ark. (1987) steril toprak, steril olmayan toprak, domates kök, gövde, tohum ve yapraklarını PST ile inokule edip ayrı ayrı naylon torbalar içerisinde toprağın 0, 5 ve 10 cm derinliğine gömmüşlerdir. Kasım ayından itibaren bir yıl boyunca yapılan izolasyonlarda PST steril olmayan toprakta 46, steril toprakta ve köklerde 69, tohum, gövde ve yapraklarda 207 gün canlılığını sürdürmüştür. Kış koşulları altında Pensilvanya'da PST'nin domates bitki artıklarında yaşamını devam ettirerek bir sonraki yetiştirme mevsiminde esas inokulum kaynağı olarak görev yaptığını rapor etmişlerdir.

Jardine ve ark. (1988) rifampicine dayanıklı bir PST izolatı ile inokule ettikleri domates bitki parçalarını delikli naylon torbalar içerisinde 0, 8 ve 18 cm. toprak derinliğine gömmüşlerdir. ABD, Michigan'da kış koşullarında 26 hafta boyunca yapılan izolasyonlarda infekteli bitki artıklarından, baharda kendiliğinden yetişen domates bitkilerinden patojeni tekrar elde etmişlerdir. Ancak aynı tarladaki 23 farklı yabancı otun toprak, kök rizosferi ve yeşil aksamından PST' yi izole etmeyi başaramamışlardır. Bu araştırmacılara göre ilk inokulum kaynağı olarak infekteli bitki parçaları ve kendi gelişen domates bitkileri yabancı otlara göre daha fazla öneme sahiptir. PST'nin infekteli bitki artıklarında bir sonraki mevsime kadar yaşamını devam ettirmesinde toprak işleme şekli ve zamanının da etkisi vardır. Sonbaharda pullukla yapılan derin toprak işleme sonucu bir sonraki mevsimde domates bitkilerinde PST simptomsu oluşmazken baharda yüzeyden yapılan toprak işleme ve hiç bir işlem yapılmayan tarlada simptomların geliştiği saptanmıştır.

### 2.3 PST'nin Domates Tohumlarında Saptanması Üzerine Çalışmalar

Tohumlardaki fitopatojen bakterilerin az miktarını klasik izolasyon teknikleri ile tespit etmek zordur. Tohumdaki patojen bakterilerin yanında saprofitik bakteriler de seçici olmayan besi yerlerinde hızlıca gelişerek petriyi kaplayabilirler. Bu

zorlukların yanında tohumdaki patojen bakterilerin izolasyonu ve tanısı hızlı ve güvenilir testlerle yapılmalıdır. Bu sorunları aşabilmek için çeşitli araştırmacılar farklı izolasyon, tohum ekstraksiyon yöntemlerini, seçici besi yerlerini ve farklı tanı tekniklerini deneyerek domates tohumlarından PST' yi tespit edebilen güvenilir ve hızlı yöntemleri araştırmışlardır.

Sharon ve ark. (1982) domates tohumlarındaki PST' yi belirlemek için tohumları nutrient broth ortamında çalkalandıktan sonra elde edilen süspansiyonu, su-agar ortamı üzerine yerleştirilmiş yüzeyden dezenfekte edilmiş domates yapraklarına inokule etmişlerdir. Bu yapraklar üzerinde gelişen tipik PST simptomsu, tohumdan elde edilen süspansiyonda PST'nin varlığını doğrulamaktadır. Bu yöntemle sadece yaşayan PST hücrelerinin 10-100 hücre /g tohum miktarı belirlenebilmektedir.

Bashan ve Assouline (1983) 4000 adet domates tohumunu 40 ml sıvı King B ortamında, 28°C' de 4 saat çalkalamışlar, oluşan süspansiyondan peleti toplamışlar ve tekrar sulandırmışlardır. Hazırlanan süspansiyonla Sharon ve ark. (1982)'nin bildirdiği besi yeri üzerindeki domates yapraklarını inokule etmişlerdir. 28°C' de 7 günlük inkübasyondan sonra aşağı yukarı 1 g tohumdaki 1000 PST hücresi bu yöntemle belirlenebilmiştir. Ayrıca tohumdan elde edilen süspansiyon baz fuksin ve trifenil tetrazolium klorit ile zenginleştirilmiş King B besi yerine yayılmıştır. Bu yöntemle İsrail'deki 53 domates tohum partisi testlenmiştir.

Naumann ve ark. (1986) domates tohumlarını nutrient broth sıvı besi yerinde 28°C' de çalkalayarak elde ettikleri süspansiyonu King B besi yerine yaymış ve domates yapraklarına püskürtmüşlerdir. King B besi yerine penicilin ve actidione ekleyerek gram pozitif bakterilerin ve fungusların gelişmesini engellemiş PST hücrelerinin gelişimini teşvik etmişlerdir. Bu yöntem ile 3 yıl önce PST ile bulaştırılmış domates tohumlarındaki PST' yi tespit etmeyi başarmışlardır.

Bolkan (1987) 24 g domates tohum örneğini steril bufferde çalkaladıktan sonra elde edilen peletten hazırladığı seyreltme serilerini KBBC ortamına yaymış ve düz, mavi floresan kolonilerin varlığını gözlemiştir. Bu ortam üzerinde PST' ye benzeyen kolonileri King B besi yerine saflaştırılarak IFAS testini gerçekleştirmiştir. KBBC'de mavi floresan, King B' de yeşil floresan, IFAS ve domatesteste patojenite testinde

pozitif sonuç veren tohum örneğinde PST' nin varlığını ortaya koymuştur.

Karaca ve Demir (1988) ülkemizde yaygın kullanılan domates tohumlarında PST' yi seçici besi yeri kullanarak aramışlar ve bu yöntemle PST' yi izole edebildiklerini bildirmişlerdir.

Jones ve ark. (1989) yaklaşık 100 adet domates tohumunu steril toprak içeren 10 cm çapındaki saksılara ekmişler ve 18-20°C' de nemli ortamda 4 hafta inkübe etmişlerdir. Kotiledon yapraklarda oluşan lekelerin sayısına göre tohumların bulaşma %'sini kaydetmişlerdir. Lekeli yapraklardan yapılan izolasyon sonucu elde edilen floresan kolonilerin tanısını klasik bakteriyolojik teknikler, serolojik testler (IFAS) ve domateste patojenite testine göre yapmışlardır. Tüm testlerde pozitif sonuç veren kültürün izole edildiği tohum partisini PST ile infekteli olarak değerlendirmişlerdir.

Scortichini (1990) 4000 adet domates tohumunu 40 ml sıvı King B besi yerinde 28-29°C' de 4 saat inkübe etmiş ve elde edilen süspansiyonu King B besi yerine yaymış ayrıca domates yapraklarına püskürtmüştür. Pozitif çıkan örneği IFAS testi ile doğrulamıştır. İtalya'da bu yöntemle domates tohumlarının hızlı, basit ve ucuz yolla testlenmesini gerçekleştirmiştir.

Kritzman (1991) 10 kg'lık tohum partisinden iyi karıştırılarak alınan 7 g domates tohum örneğinin, PST'nin belirlenmesinde yeterli olduğunu bildirmiştir. 7 g tohumu bufferde çalkaladıktan sonra oluşan peleti cycloheximide içeren Pseudomonas agar F ortamına yaymıştır. Gelişen floresan koloniler ile domateste patojenite testini gerçekleştirmiştir. Bu tarihten beri İsrail'deki domates tohumları bu yöntemle göre testlenmektedir. Ancak araştırmacı daha kolay, duyarlı ve hızlı test yöntemleri de araştırılmaya devam etmektedir (Kritzman, 1993a).

Kaaya ve Mortensen (1993) Tanzanya'da üreticilerden, araştırma istasyonlarından ve tohum üretim firmalarından topladıkları 27 tohum partisinde PST' yi ararken 12 g tohum örneğini 100 ml steril pepton bufferde 5 °C' de 3 saat inkübasyondan sonra 1 saat çalkalama, filtrasyon ve santrifüj işlemlerini gerçekleştirmişlerdir. Elde edilen peleti seyrelterek modifiye edilmiş Pseudomonas agar F ortamına yaymışlardır. Bu testleme yöntemi yarı seçici besi yerinde geliştirmeye dayanmaktadır.

Yorgancı ve ark (1994) Ülkemizde kullanılan domates tohumlarında PST' yi

ararken ELISA testini kullanmışlar ve testledikleri tohumlarda PST' ye rastlamadıklarını bildirmişlerdir.

Nabizadeh-Ardekani ve ark. (1995) PST izolatının tanısını PCR tekniği ile yapmışlar ve gelecekte bu tekniğin domates tohumlarında PST'nin saptanmasında kullanılır duruma getirilmesini amaçladıklarını bildirmişlerdir.

#### **2.4. PST' nin Kimyasal, Fiziksel ve Biyolojik Kontrolü Üzerine Çalışmalar**

Ülkemizde açıkta ve örtü altında domates üretiminde görülen bu hastalık, seralarda özellikle ısıtılmayan veya yetersiz ısıtılan plastik seralarda, yağmur sularının damladığı yerlerde yoğunluk kazandığı gözlemlenmiştir (Abak ve Laterrot, 1988). PST'nin mücadelesinde üreticilerin en sık başvurduğu yöntem kimyasal savaştır. Domates Bakteriyel Kara Leke Hastalığının mücadelesinde 2 haftada bir ve sulama sonrası koruyucu olarak bakır hidroksit püskürtmelerinin önemli oranda hastalığı azalttığı ve verimi % 23 oranında artırdığı Yunis ve ark. (1980) tarafından bildirilmiştir. Smitley ve McCarter (1982), Conlin ve McCarter (1983) ve Ramos ve ark. (1989)'a göre bakıroksiklorit + mancozeb, bakır hidroksit + mancozeb veya streptomisin + mancozeb'in yeşil aksama püskürtülmesi enfeksiyonu azaltmaktadır. Diğer bazı araştırmacılar ise özellikle serin iklim koşullarında bakırlı preparatların etkisiz olduğunu göstermişlerdir (Macnab, 1980; Pitblado ve Shanks, 1980). Conlin ve McCarter (1983) sera koşullarında streptomisin sülfatın oldukça ümit verici olduğunu belirtmiştir. Jardine ve Stephens (1987) uygulanacak ilacın seçimi ve uygulama zamanının hastalığın kontrolünde kritik bir faktör olduğunu önemle vurgulamışlardır. Bu araştırmacılar sera koşullarında streptomisin sülfat, oxytetracycline ve bakır + mancozeb kompleksini PST inokulasyonundan önce ve sonra uygulamışlar, streptomisin sülfatın inokulasyondan sadece 24-48 saat sonraki sürede etkili olabildiğini saptamışlardır. Özaktan ve ark. (1991) bakırlı preparatlar içerisinde PST izolatlarına karşı en yüksek etkinliğin bakır amonia 'da saptandığını, bunu bakır hidroksitin izlediğini ve bakır sülfatın ise *in vitro*'da olumlu sonuç vermesine karşın *in vivo*'da yeterince etkili olmadığını söylemişlerdir. Denenen bakırlı preparatların etkinliğinde içerdikleri etkili maddelerin eriyebilirliklerinin de

payı olduğunu, domates alanlarında yoğun olarak kullanılan bakır oksikloritin bazı izolatlarda duyarlılık azalışına neden olduğunu bildirmişlerdir. PST'nin kimyasal mücadelesi ile ilgili benzer örnekleri çoğaltmak mümkündür. Kimyasallarla yapılan mücadelede başarı, bitki ve iklim koşulları ile sıkı bir ilişki içindedir. Hava koşulları (sıcaklık ve nem) hastalığın gelişimi için uygun gitmediğinde ilaçlamalara gerek yoktur, hastalık kendiliğinden yok olmakta, havalar çok nemli ve serin olduğunda bakırlı preparatlarla ilaçlamalar yetersiz kalmaktadır (Smitley ve McCarter, 1982).

Sertifikalı, hastalıklardan arı temiz tohum kullanmak hastalıkların verdiği zararın önlenmesi ve ilk inokulum kaynağının yok edilmesi açısından ön koşuldur. Sali (1994)'e göre tohumdaki patojeni azaltmak veya öldürmek için yapılan işlemler tohum kalitesini azaltabilir. Tohumdaki patojeni tamamen yok eden hiç bir kimyasal yöntem yoktur. Yapılan işlemlerin etkinliği patojenin tohumdaki yerine ve popülasyon yoğunluğuna bağlıdır. Tohum üretici firmalar tohumdaki patojeni yok etmek için tohuma çeşitli uygulamalar yerine tohumluk bitkinin yetiştirme döneminde hastalanmasını öncelikle önlemelidir. Bu dönemde yağmurlama sulamadan vazgeçmek, etraftaki yabancı otları, kendi büyüyen domates bitkilerini temizlemek, hasta bitkileri uzaklaştırmak, aynı alanda 3 yılda bir domates yetiştirmek, bitkilere yara açmaktan kaçınmak, budama gibi kültürel işlemlerden, yağmur ve rüzgarlı havalardan sonra bakırlı preparatlarla ilaçlama yapmak hastalık mücadelesinde etkili olmaktadır (Goode ve Sasser, 1980). Patojen bakterilerin tohuma epifitik olarak bulaşabildikleri de dikkate alındığında tohuma çeşitli uygulamaların yapılması zorunlu olmaktadır.

Chambers ve Merriman (1975) PST' yi domates tohumlarından arındırabilmek için fermantasyon yöntemini önermişlerdir.

Okon ve ark. (1979) PST ile inokuleli tohumları 1 saat 48°C 'deki sıcak su ile muamele ettiklerinde bakterilerin öldüğünü bildirmişlerdir.

Devash ve ark. (1980) yapay olarak PST ile bulaştırılmış domates tohumlarını 1 saat 52°C' deki sıcak suya veya % 1' lik NaOCl' ye 2 dakika daldırdıklarında tohum çimlenmesi engellenmeden patojeni arındırdıklarını rapor etmişlerdir.

Goode ve Sasser (1980) domates tohumlarından patojeni elemine etmek için 30 dakika 56°C' deki sıcak su veya sodyum hipoklorit uygulamalarını önermektedirler.

Ancak bu şekilde uygulama görmüş tohumların aynı mevsim içinde kullanılması gerektiğini önemle vurgulamışlardır.

Jurchak ve ark. (1982) domates tohumlarının 50°C' deki sıcak suya 30 dakika daldırılmasının PST' yi yok ettiğini saptamışlardır.

Pyke ve ark. (1984) PST ile inokuleli domates tohumlarından patojeni temizlemek için 6 farklı uygulamanın etkinliğini incelediklerinde sadece antibiyotik uygulamasının (streptomisin sülfat) tamamen kontrol sağladığını bildirmişlerdir.

Bogatsevskaya ve ark. (1989) Bulgaristan'da 1983-1987 yılları arasında laboratuvar ve tarla denemeleri olarak gerçekleştirdikleri tohum uygulamalarında, domates tohumlarını 25 dakika 52°C' deki % 0.25 fenilmercury asetata daldırdıklarında PST 'nin etkili şekilde kontrol edildiğini rapor etmişlerdir.

Naumann ve Griesbach (1990) PST'den arı domates tohumu üretimi için fermentasyon ve tartarik asit uygulamasının etkili sonuç verebildiğini saptamışlardır.

Siviero (1991) domates tohumlarındaki PST'nin kontrolünde en iyi yöntemin 24 saat klorik asit ile fermentasyonunu takiben 10 dakika sodyum hipoklorit (3.5-4 g/l) uygulaması olduğunu söylemiştir. Ayrıca 24 saat asetik asit (%1.2), laktik asit (%5) veya pektolaz (0.2 g/l) ile yapılan tohum fermentasyonunun çimlenmeye toksik etki yapmadığını saptamışlardır.

Kritzman (1993b) PST dahil domates tohumlarındaki bakteriyel patojenlerin yok edilmesi için kimyasal-sıcaklık uygulamasının birlikte kullanımını önermektedir. Yapay olarak PST ile inokuleli tohumlar 45°C 'deki bakır asetat, asetik asit, pentakloronitrobenzen, 5-ethoxy 3 (triklorometil)-1, 2, 4 -thiadiazole ve Triton X içeren solüsyon içerisine 1 saat daldırıldıklarında patojenin eradike edildiğini bildirmiştir.

Bakteriyel hastalıklara karşı biyokontrol ajanlarının kullanımına dayanan biyolojik kontrol ile ilgili ilk çalışmalar bakırlı preparatlarla kimyasal mücadelesi olmayan veya çok güç olan patates bakteriyel hastalıklarından patates uyuzu hastalığı etmeni *Streptomyces scabies* (Garrett, 1970. Bora ve Özaktan, 1998' den) ve *Erwinia yumuşak çürüklüklerine* (Colyer ve Mount, 1984; Xu ve Gross, 1986) karşı yapılmıştır.

Domateste PST' ye karşı bakırlı bileşiklerin kullanımıyla kontrolün zorlaşması

sonucu biyokontrol ajanları bu etmene karşı da denenmeye alınmıştır. Colin ve Chafik (1986) Fas'da izole ettikleri 2 antagonist *Pseudomonas* 'ın haftalık olarak domates bitkilerine püskürtülmesi sonucu bakırlı bileşiklere eş değer sonuçlar bulmuşlardır. Yine Colin ve ark. (1987) 2 antagonist floresan *Pseudomonas* ile 3 bakterisit uygulamasının karşılaştırmasını sera ve tarla denemeleri halinde 3 farklı çevre koşulunda denediklerinde birbirlerine uymayan farklı sonuçlar elde etmişlerdir. Antagonistlerin etkinliğinin çevre koşulu ile çok ilgili olduğunu ve iyi bir antagonistin her çevrede etkili olması gerektiğini vurgulamışlardır.

Wilson (1996) PST' yi de içine alan domates bakteriyel yeşil aksam hastalıklarının kontrolünde bilinen yöntemlerin yetersiz kaldığını ve bu nedenle entegre edilmiş biyokontrol stratejilerinin geliştirilmesini önermiştir. Bu amaç doğrultusunda bakıra dayanıklı antagonistlerin yeşil aksama püskürtülmesi, bitki dayanıklılığını teşvik eden rhizobakterilerin tohum ve toprağa uygulanması sonucu ABD'nin 4 farklı bölgesinde yaptıkları denemelerden olumlu sonuçlar elde etmişlerdir. Yeşil aksam antagonistleri olan *Pseudomonas fluorescens* A506 ve patojenik olmayan *P. syringae* izolatu TLP2 ve Cit 7'nin yeşil aksama uygulanmasıyla sera koşullarında PST' ye karşı %60'a yakın başarı elde etmişlerdir.

Wilson ve ark. (1997) bakırlı bileşiklere karşı dayanıklılık kazanmış PST izolatları tarafından neden olunan PST infeksiyonlarının yaygın olduğu domates alanlarında doğal olarak patojenitesini kaybetmiş bir *P. syringae* izolatu ve hrp genleri aktarılmış patojenik olmayan bir PST mutantını biyolojik kontrol ajanı olarak kullanmışlar ve başarılı sonuçlar elde etmişlerdir. Bu patojenlere karşı yapılan çalışmaların yeni olmasına karşın ümit var sonuçların elde edilmesi sevindiricidir. Henüz domates bakteriyel hastalıklarına karşı piyasada biyolojik preparat olarak ruhsatlandırılmış ilaçların bulunmamasına rağmen domateste fungal hastalıklardan *Botrytis cinerea* 'ya karşı Trichodex (Elad, 1990), bakteriyel hastalıklardan *E. amylovora* 'ya karşı Frostban (Norelli ve Aldwinckle, 1992) gibi biyolojik kökenli ilaçların varlığı gelecekte bu tür çalışmaların ümit verici olduğunu göstermektedir.

Bakteriyel hastalıkların mücadelesinde toprak kökenli inokulumun azaltılması veya baskı altına alınmasında toprak fümigasyonuna alternatif olarak toprak solarizasyonu ile ilgili çalışmalar da yapılmaktadır. Toprak solarizasyonu uygulaması

bakteriyel hastalıklardan ilk olarak *Agrobacterium radiobacter* pv. *tumefaciens* 'e karşı Kaliforniya, ABD'de denenmiştir (Stapleton ve DeVay, 1982). Antoniou ve ark. (1995) Yunanistan'da domates plastik seralarında üst üste bir kaç yıl toprak solarizasyonu yapıldığında *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* ile hasta bitki %'sinin çok hızlı bir şekilde azaldığını rapor etmişlerdir. Toprak solarizasyonunun patojen inokulumu üzerine etkisini saptarken ağzı dar, kapaklı cam şişeler içerisindeki bakteri kültürünü toprağa gömmüşler ve solarizasyon sonrası patojen inokulumunun azaldığını tespit etmişlerdir. Bu araştırmacılara göre toprak solarizasyonu bakteriyel hastalıkların kontrolünde etkili bir yöntemdir.

Doğu Akdeniz Bölgesinde 1980'li yıllardan bu yana yapılan çalışmalar ile solarizasyon uygulamasının toprak kökenli fungal ve bakteriyel patojenlere karşı kullanılabilirliği pek çok araştırmacı tarafından ortaya konulmuştur (Çınar ve Biçici, 1985, Pala, 1987, Erkalıç ve ark., 1994).

Erkalıç ve ark. (1994) bir önceki yıl PST simptomlarının görüldüğü domates plastik serasında gerçekleştirdikleri solarizasyon çalışmasında toprak solarizasyonunun tek başına PST infeksiyonunu %43, toprak solarizasyonu, yeşil aksam ve tohum ilaçlaması kombinasyonunun ise %79 oranında azalttığını saptamışlardır. Aysan ve ark. (1995) toprak solarizasyonunun plastik serada PST bulaşıklığının yaklaşık % 50 azaltırken verimi %47 oranında artırdığını bildirmişlerdir.

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

Tipik hastalık semptomu gösteren domates bitki örneklerden izole edilen bakterilerin tanımlanması ve ırk belirleme çalışmalarında karşılaştırma kültürü olarak Georg-August Üniversitesi, Bitki Koruma Bölümünden (Göttingen, Almanya) Dr. K. Rudolph'dan (GSPB 479, 483, 487, 1776 ve 1778), Ankara Ziraat Mücadele Araştırma Enstitüsünden Zir. Yük. Müh. Meriç Özakman'dan (4101, 4212, 4215 ve 4216) ve Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümünden Prof. Dr. Hikmet Saygılı'dan (PT1, PT2 ve PT3) temin edilen tanısı yapılmış PST izolatları, Akdeniz ve Orta Anadolu Bölgesinden izole edilen PST izolatları, domates tohumları, besi yerleri, sakslar, ELISA plateleri, antiserum, konjugat, ELISA plate okuyucusu immunofluorescence mikroskobu, PCR aleti, çeşitli kimyasallar ve laboratuvar aletleri bu çalışmanın materyalini oluşturmuştur.

#### 3.2. Yöntem

##### 3.2.1. PST İzolatlarının Tanısı

Adana (İmamoğlu ve Yumurtalık ilçeleri), İçel (Huzurkent, Erdemli ve Kocahasanlı ilçeleri), Hatay (Samandağ ve Kırıkhan ilçeleri), Konya (Akşehir ilçesi) ve Antalya (Merkez ve Gazipaşa ilçeleri, Koyunlu ve Doyuran köyleri) illerinden tipik hastalık semptomu gösteren yaprak ve gövde örnekleri toplanmıştır. Örneklerden hastalıklı ve sağlıklı alanları içerecek şekilde alınan bitki parçaları %70'lik alkol ile yüzeyden dezenfekte edilmiştir. Steril havanda 2 ml steril su içinde ezilerek elde edilen ekstraktan King B besi yerine (KB) (King ve ark, 1954) çizimler yapılmıştır. 25°C' de 48 saatlik inkübasyondan sonra floresan gelişen koloniler saflaştırılmıştır. Elde edilen izolatlar ve karşılaştırma kültürü olarak alınan tüm izolatlar PST' ye duyarlı bir çeşit olan H-2274 domates çeşidi yapraklarına püskürtülerek patojenite testleri gerçekleştirilmiştir (Jones ve ark, 1989). Yapılan reizolasyonlar sonucu elde edilen izolatların tanısı klasik bakteriyolojik yöntemlerin yanında ELISA ve PCR tekniği ile de yapılmıştır.

### 3.2.1.1. PST İzolatlarının Klasik Bakteriyolojik Yöntemlerle Tanısı

Levan oluşumu, patatestte pektolitik aktivite, oksidaz, arginin dehidrolaz testi, tütünde HR, KB ortamında floresan pigment üretimi, karbon kaynağı olarak DL-laktat kullanımı ve domatestte patojenite testlerine göre tanı gerçekleştirilmiştir (Çınar, 1977b; Jones ve ark, 1985; Lelliott ve Stead, 1987; Jones ve ark, 1989). Karşılaştırma kültürü olarak GSPB 483 izolatı kullanılmıştır.

### 3.2.1.2. PST İzolatlarının ELISA Testi ile Tanısı

Çalışmanın bu kısmı Volcani Tarımsal Araştırma Merkezi (Agricultural Research Organization, The Volcani Center, Israel) ile yaptığımız iş birliği çerçevesinde İsrail'de gerçekleştirilmiştir. ELISA testi işlemleri Clark ve Adams (1977), Baloğlu (1988) ile McLaughlin ve Chen (1990)'a göre yürütülmüştür.

ELISA testinin aşamaları;

\*Kaplama tamponu (1.59 g/l  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 2.93 g/l  $\text{NaHCO}_3$  ve 0.2 g/l  $\text{NaN}_3$ , pH: 7.0) içinde sulandırılan gama globülinden ELISA platenin her çukuruna 200µl konmuş ve plate'nin üzeri kapatılarak 37°C 'de 4-6 saat inkübe edilmiştir.

\*İnkübasyondan sonra yıkama tamponu (8 g/l  $\text{NaCl}$ , 0.2 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2.3 g/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.2 g/l  $\text{KCl}$ , 0.2 g/l  $\text{NaN}_3$  ve 0.5 ml Tween 20) ile tüm çukurlar 3 kez yıkanmıştır. Yıkama tamponu 3 dakika süre ile çukurda bekletilmiş ve aniden ters çevrilerek plate boşaltılmış, havada sallayarak veya 6-8 kat kağıt havlu üzerine vurularak kuruması sağlanmıştır.

\*Yan yana gelecek şekilde her bir çift çukura 200 µl örnek tamponu (yıkama tamponu çözeltisi içine %2 polyvinylpyrrolidone 40.000 [PVP-40] içerir) ile PST izolatlarından bir öze dolusu bakteri, hazırlanmış plana göre yerleştirilmiş ve plate'nin üzeri kapatılarak 37 °C' de 4-6 saat veya 6 °C' de bir gece boyu inkübe edilmiştir.

\*İnkübasyon sonrası plate, çukurlar arası karışma olmayacak şekilde dikkatlice yıkama tamponu ile 3 kez yıkanmıştır.

\*Konjugate tamponu (örnek tamponuna %2 ovalbumin ilave edilir) ile optimum kullanılacak konsantrasyona göre sulandırılmış konjugattan her bir çukura 200 µl konmuş ve plate 30°C de 4-6 saat veya 6°C de gece boyu inkübasyona

bırakılarak yıkanmıştır.

\*Substrat tamponu (97 ml diethanolamine, 0.2 g  $\text{NaN}_3$ , 1.0 litre distile su ve pH: 9.8) ile taze olarak hazırlanan substrattan (0.75-1.0 mg/ml p-nitrophenyl phosphate) her bir çukura 200  $\mu\text{l}$  konmuş ve 30-60 dakika veya gerekli olduğunda daha uzun süre oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edilmiştir.

\*Titertek Multiscan marka ELISA plate okuyucusunda 405 nm. dalga boyunda plate çukurluklarının absorbans değerleri 30 ve 60 dakika sonra belirlenmiştir. Daha sonra devam eden reaksiyon 50  $\mu\text{l}$  3N NaOH ile durdurulmuştur.

### 3.2.1.3. PST İzolatlarının PCR Tekniği ile Tanısı

Çalışmanın bu kısmı Georg-Agust Üniversitesi Bitki Koruma Bölümünde, (Göttingen, Almanya) Nabizadeh-Ardekani ve ark. (1995)'na göre yürütülmüştür. PCR işlemleri için DNA ekstraksiyonu Ausubel ve Fredric (1987) 'e göre yapılmıştır.

Bakterilerden genomik DNA'nın hazırlanması aşamaları ;

\*48 saat KB ortamında geliştirilen PST izolatlarının tek kolonilerinden alınıp YPS ortamında (Rhodes, 1959) 24 saat çalkalayıcıda kültürler geliştirilmiştir.

\*Spectrofotometrede (Shimadzu, UV- 120 -01) 660nm de ölçüm yapılmış, 500 faktör baz alınarak istenilen hacim hesaplanmıştır ( $\mu\text{l}$  deki hücre sayısı=Faktör/OD 660).

\*Belirlenen miktardaki bakteri süspansiyonu ependorf tüplere konup,  $+4^\circ\text{C}$ ' de 8000 rpm'de 3 dakika santrifüjlenerek pelet elde edilmiştir.

\*Pelet içine Çizelge 3.1 'de belirtilen miktar olan, %10 SDS 'den 30  $\mu\text{l}$ , TE bufferinden 567  $\mu\text{l}$  ve Proteinaz K' dan 3  $\mu\text{l}$  konup vorteksdde iyice karıştırılmıştır. Tüpler  $37^\circ\text{C}$ ' deki su banyosunda 60 dakika bekletilmiştir.

\*Her bir tübe 5N NaCl'den 100 $\mu\text{l}$  eklenerek, vortekslenmiştir.

\*0.7 M NaCl 1xTE içinde hazırlanan %10 CTAB 'den eklenerek iyice karıştırılmıştır.

\*Her bir tübe Cl/PCI (24:1 oranında) karışımından 700 $\mu\text{l}$  eklenmiş ve tüpler 5 dakika buz içinde bekletilmiştir.

\* $+4^\circ\text{C}$ ' de 11.000 rpm'de 10 dakika santrifüj yapılmıştır.

Çizelge 3.1. Bakterilerin genomik DNA'larının saflaştırılmasında kullanılan kimyasal miktarları

|                             | <u>2 ml</u> | <u>14 ml</u> | <u>40 ml</u>  |
|-----------------------------|-------------|--------------|---------------|
| <b>FAKTÖR</b>               | <b>500</b>  | <b>3.500</b> | <b>10.500</b> |
| TE                          | 567         | 4.000        | 12.000        |
| %10 SDS                     | 30          | 210          | 630           |
| Proteinaz K (20 mg/ml)      | 3           | 21           | 63            |
| 5 M NaCl                    | 100         | 700          | 2.100         |
| %10 CTAB (0.7 M NaCl içinde | 80          | 560          | 1.680         |
| 1X TE                       |             |              |               |
| Cl/PCI                      | 700         | 5.000        | 5.000         |
| %70 EtOH                    | 500         | 5.000        | 5.000         |
| TE Buffer                   | 50          | 100          | 200           |

\*Santrifüjden sonra altta Cl/PCI artıkları, ortada protein fazı, üstte DNA bulunmaktadır. Kırık bir pipet ucu ile dikkatlice üstteki DNA toplanmıştır.

\*Yeni bir ependorf tüpüne toplanan DNA aktarılmış, aynı miktarda Cl/PCI (1:1 oranında) eklenmiş ve karıştırılmıştır.

\* +4°C 'de 11.000 rpm'de 10 dakika santrifüj yapılmıştır.

\*Santrifüjden sonra üstteki faz miktarı belirlenerek alınmıştır. Belirlenen miktarın 0.6 katı kadar isoproponal eklenmiş ve 30 dakika buz içinde bekletilmiştir.

\*+4°C' de 11.000 rpm'de 10 dakika santrifüj yapılmış ve pelet elde edilmiştir. % 70 lik EtOH'dan 500µl eklenerek +4°C' de 11.000 rpm'de 10 dakika tekrar santrifüj yapılmış ve pelet elde edilmiştir. Tüplere TE bufferinden 50µl eklenerek saflaştırılan DNA buzdolabında muhafaza edilmiştir.

\* DNA'nın saflaştırıldığından emin olmak için RNA/DNA calculator aleti ile okuma yapılmıştır. Bu alet ile yapılan okumada OD 260 ve 280 değerleri okunmuş ve OD 260/280 ile 280/260 oranları hesaplanmıştır. 260/280 oranı 1.8 civarında, 280/260 oranı 0.50 civarında ise DNA'nın saflaştırıldığı düşünülür. Ancak kesin emin olmak için agorose jel (%0.8) elektroforez çalışmaları ile bant oluşumu

gözlenmiş ve fotoğraf çekimi yapılmıştır.

PCR uygulamalarında 10 ng toplam DNA kullanılmıştır. 0.8 u taq polimeraz (Fermantas), 0.2 mM dNTPs, 10 mM Tris- HCL pH: 8.8, 50 mM KCl, %0.08 Nonidet P40, %5 DMSO, 10 mM mercaptoethanol ile 100 µg bovine serum albümin içeren 50µl PCR karışımı ve 2 oligonükleotid primer (her biri 25 pmol) kullanılmıştır. PCR karışımı 50 ml parafin ile kaplanmıştır. İlk denatürasyon 94°C' de yapılmış daha sonraki denatürasyonlar 92°C 'de 2 dakika yapılmıştır. İlk denatürasyondan sonra polimeraz eklenmiştir. 52°C de 2 dakikada 2 döngü başlamış, her iki döngüde annealing sıcaklığı 0.5 °C düşmüş, 11 döngü sonunda sıcaklık 48°C' ye düşmüştür, primerler 72°C de 2 dakika extended edilmiştir.

Bu çalışmada Hybaid-Omni Gene marka termo saykıl kullanılmıştır. Oluşan PCR ürünleri % 1.5'lik agarose jel'e yerleştirilerek 100 voltluk elektrik akımı uygulanmış ve elektroforez çalışmaları sonucu oluşan bantlar fotoğraflanmıştır.

### 3.2.2. PST İzolatlarının Irklarının Tespiti

*Pto* geni içeren PST' nin Irk O' na dayanıklı olarak bilinen Kanada menşeyli Ontario 7710 domates çeşidi ırk ayrımında kullanılmıştır. Bu hastalığa duyarlı H-2274, *Pto* dayanıklılık geni kazandırılmış H-2274 (Abak ve ark, 1990) ve Ontario 7710 domates çeşitleri 25°C' deki klima odasında yetiştirilmiştir. Domates bitkileri 3-5 yapraklı döneme geldiklerinde, çeşitli yörelerden toplanan PST olduğu klasik bakteriyolojik yöntemler, ELISA ve PCR testleri ile tanılanmış toplam 24 izolatın 10<sup>6</sup> hücre/ml yoğunluğunda hazırlanan süspansiyonu her 3 çeşide 3 tekrarlı olmak üzere bir el pülverizatörü ile püskürtülmüştür. Bir hafta sonra yapılan simptomolojik gözlemlere göre hastalık oluşumu kaydedilmiştir. Sadece H-2274 çeşidi üzerinde simptom oluşturan izolatlar Irk O olarak değerlendirilirken, H-2274, *Pto* geni kazandırılmış H-2274 ile Ontario çeşitlerinin her üçünde simptom oluşturan izolatlar Irk 1 olarak saptanmıştır (Lawton ve MaC Neill, 1986; Bogatsevska ve ark, 1989; Buonauro ve ark, 1996).

Pozitif kontrol olarak GSPB 1776, PST-Irk 0 ve GSPB 1778, PST-Irk 1 izolatları kullanılmıştır. Negatif kontrol amacıyla her çeşitten 3'er bitki steril su ile inokule edilmiştir.

### 3.2.3. PST'nin İnfekteli Bitki Artıkları, İnokule Edilmiş Toprak ve Tohumda Yaşam Süresinin Belirlenmesi

Yapay infekteli bitki artıkları, toprak ve tohumdan yapılan izolasyonlarda besi ortamında pek çok saprofitik floresan bakteriler gelişmiştir. Bunlardan PST' nin ayırt edilmesinde kolaylık sağlamak amacıyla bir bölge izolatu aşağıda açıklanan prosedüre göre 100mg/l rifampicin antibiyotiğe dayanıklılık kazandırılmıştır (Jardine ve ark, 1988; Mariana ve McCarter, 1992).

Rifampicin (100 mg/ml)' e dayanıklı PST izolatının elde edilmesi;

Bir bölge izolatu KB ortamında 48 saat geliştirildikten sonra tek koloniden alınan bakteri 20 ml YPS sıvı besi yerine aktarılmıştır. 150 rpm hızla çalışan çalkalayıcıda (Gerhardt, Schüttelmaschine RO 10) 48 saat geliştirilen bakteri süspansiyonundan 5 ml alınıp 200 ml YPS sıvı besi yerine aktarılmıştır. Çalkalayıcıda 48 saat geliştirilip, bulanık bakteri görünümü gözlemlendikten sonra %70' lik alkol içinde çözülen 25 mg/l dozunda filtreden geçirip steril edilen rifampicin bakteri süspansiyonuna eklenmiştir. İlk bir kaç gün bakterilerin çoğunun ölmesinden dolayı sıvı besi yeri harraklaşmış daha sonra 25 mg/l rifampicine dayanıklı mutantlar çoğaldığında ortam tekrar bulanıklaşmıştır. 25 mg/l rifampicin içeren KB besi yerine bu süspansiyondan çizim yapılarak tek koloniler geliştirilmiştir. Tek bir koloni alınıp 20 ml sıvı besi yerinde tekrar çoğaltılmış ve yukarıda anlatılan işlemler 50, 75 ve 100 mg/l dozuna göre tekrar edilmiştir. Son olarak 100 mg/l rifampicin içeren KB besi yerinde gelişen dayanıklı mutantların PST olup olmadığı domatestte patojenite testiyle kanıtlanmıştır. 1 hafta sonra domates bitkisi üzerinde tipik hastalık simptomu oluşturan yaprak örneklerinden yapılan reizolasyonlarla 100mg/l rifampicine dayanıklı reizolatlar elde edilmiştir. Bu izolatlar 100 mg/l rifampicin içeren YDCA (Lelliott ve Stead, 1987) eğik ortamında +4°C de saklanmıştır.

#### 3.2.3.1. PST'nin İnfekteli Bitki Artıklarında Yaşam Süresinin Belirlenmesi

Bu deneme Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Araştırma ve Uygulama Parselinde gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma ile PST'nin yaz ve kış aylarında topraktaki infekteli bitki artıkları üzerindeki yaşamı araştırılmıştır.

Serada yetiştirilen 15-20 cm boyundaki domates bitkileri 100 mg/l rifampicine dayanıklılık kazandırılmış PST izolatu ile yapraklara püskürtme, gövdeye enjeksiyon şeklinde inokule edilmiştir. Yaklaşık 1 hafta sonra semptomlu gövdeler 2-3 cm'lik parçalar halinde kesilmiş, semptomlu yapraklar toplanmıştır. 3 g yaprak ve 7 g gövde parçası olmak üzere toplam 10 g yaş aralığındaki bitki parçaları delikli naylon torbalar (naylon kadın çorabı) içine konup toprağın 10 cm derinliğine gömülmüştür (Getz ve ark,1981; McCarter ve ark,1983; Perez ve ark, 1987; Jardine ve ark, 1988).

(1).PST 'nin Yaz Mevsiminde İnfekteli Bitki Artıklarında Yaşam Süresinin Belirlenmesi : Şubat-Haziran tarihleri arasında plastik sera içerisinde domates üretiminin yapıldığı, yaz aylarında boş olan toprağa  $4.5 \times 10^5$  hücre/g bitki artığı yoğunluğu ile inokule edilmiş bitki artıkları yukarıda anlatılan yöntemle göre gömülmüştür. Haziran 1996-Ocak 1997 tarihleri arasında 8 ay boyunca her 30 günde bir, bitki artığı içeren 3 adet torba topraktan çıkarılarak izolasyonlar yapılmıştır. 100 mg/l rifampicin ve cycloheximide içeren KB besi yerinde gelişen floresan kolonilerin PST olduğunu doğrulamak amacıyla petride gelişen bakterilerden yıkama yapılarak hazırlanan süspansiyon ile domatesta patojenite, tütünde HR testi yapılmıştır.

Ayrıca bir yıl önce domates üretiminin sona erdiği tarih olan Haziran ayında domates bitkileri PST ile inokule edilerek üretim yapılan parselin yarısına karıştırılmıştır. Kontrol amacıyla aynı büyüklükteki parselin diğer yarısına hastaliksız bitki parçaları karıştırılmıştır. Şubat ayında bu alana, %1 lik NaOCl'ye 3 dakika batırılıp 3 kez steril su ile yıkanarak yüzeyden dezenfekte edilen tohumlar (Devash ve ark, 1980) ekilmiştir. Mart ayında bu tohumlardan gelişen fidelerin kotiledon yaprakları incelenerek hastalık semptomların varlığı gözlenmiştir (Okon ve ark, 1978). Kotiledon lekelerinden yapılan izolasyonlar sonucu petride gelişen bakterilerle domatesta patojenite, tütünde HR testi ile tanı desteklenmiştir.

(2).PST 'nin Kış Mevsiminde İnfekteli Bitki Artıklarında Yaşam Süresinin Belirlenmesi : yazın tarla domatesi üretilen kışın boş olan toprağa  $6.0 \times 10^7$  hücre/g bitki artığı yoğunluğu ile inokulele edilen bitki artıkları torbalar içerisinde gömülmüştür. Eylül 1996-Mart1997 tarihleri arasında yukarıda anlatılan yöntemle patojenin yaşam süresi bitki artıklarından yapılan izolasyonlarla ve kotiledon lekeleri incelenerek tespit edilmiştir.

Ayrıca 1995 yaz aylarında 19x20m. büyüklüğündeki parsellerde yetiştirilen domates bitkileri PST ile inokule edilerek yaz sonunda toprağa karıştırılmıştır. Aynı büyüklükteki diğer bir parselde inokule edilmemiş hastalıksız bitki parçaları karıştırılmıştır. Mart 1997 'de yüzeyden dezenfekte edilmiş (%1 lik NaOCl'ye 3 dakika daldırma) ve steril toprağa ekilmiş tohumlardan gelişen fideler bu alana dikilmiştir. Yapılan haftalık gözlemler sonucu PST ile infekteli bitki sayısı tespit edilmiş ve yapılan izolasyonlar, domatesta patojenite, tütünde HR testlerine göre PST'nin varlığı kanıtlanmıştır.

### **3.2.3.2. PST ' nin İnokule Edilmiş Toprakta Yaşam Süresinin Belirlenmesi**

Domates bitki artıkları içermeyen 3x9m. boyutundaki bir toprak alanının etrafı tahtalarla çevrilmiştir. 2 gün sıvı KB ortamında geliştirilen 100 mg/l rifampicine dayanıklı PST izolatının 25 litre süspansiyonu ile bu alan Haziran 1996 tarihinde inokule edilmiştir.  $8.6 \times 10^7$  hücre/g toprak yoğunluğu ile bulaştırılan topraktan, inokulasyondan 0, 7, 14, 21, 30, 45, 60, 90 ve 120 gün sonra 0-15 cm toprak derinliklerinden örnek alınmış ve toprak sulandırma yöntemine göre izolasyonlar yapılmıştır. Bu süre içerisinde toprak hiç sulanmamıştır.

Aynı alan Kasım 1996 tarihinde yukarıdaki yöntemle PST ile inokule edilmiş ve 0, 7, 14, 21, 30, 45, 60, 90 ve 120 gün sonra aynı yöntemle toprak izolasyonları yapılmıştır. Bu süre içerisinde toprak sulanmamış fakat açık alan olması nedeniyle yağmurlardan dolayı nemlenmiştir.

Deneme yapılan toprağın özellikleri Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Toprak bölümü tarafından ortaya konulmuştur.

### **3.2.3.3. PST'nin İnokuleli Tohumlarda Yaşam Süresinin Belirlenmesi**

%1 lik NaOCl'ye 3 dakika daldırılarak yüzeyden dezenfekte edilmiş H-2274 çeşidi domates tohumları 100 mg/l rifampicine dayanıklı PST izolatının yaklaşık  $2.10^9$  cfu/ml (A660:1.5) süspansiyonunda vakum (15 dakika) ve ardından daldırma (30 dakika) yöntemi kullanılarak inokule edilmiştir (Özaktan, 1991; Mariana ve McCarter, 1992). İnokuleli tohumlar bir gece boyunca steril kabinde kurutulmuş ve

kağıt torbalar içerisinde oda sıcaklığında saklanmıştır. Her ay 100 adet tohum tesadüf olarak seçilmiş, 100 mg/l rifampicin içeren KB besiyeri yerine ekilmiştir. Tohum etrafında floresan gelişen koloniler sayılarak inokuleli tohum %'si belirlenmiştir. Kontrol amacıyla 3 dakika % 1' lik NaOCl'ye batırılan domates tohumları kullanılmıştır.

Ayrıca örnekleme zamanı 7 g tohum (Kritzman, 1993b) kağıt torbalardan alınmış 70 ml sıvı besiyerinde 1 gece boyunca çalkalandıktan sonra sıvı 10.000 g'de 15 dakika santrifüj edilmiş ve pelet toplanmıştır. Pelet sulandırılarak domates yapraklarına püskürtülmüştür.

#### 3.2.4. Ticari Domates Tohumlarından PST'nin Saptanması

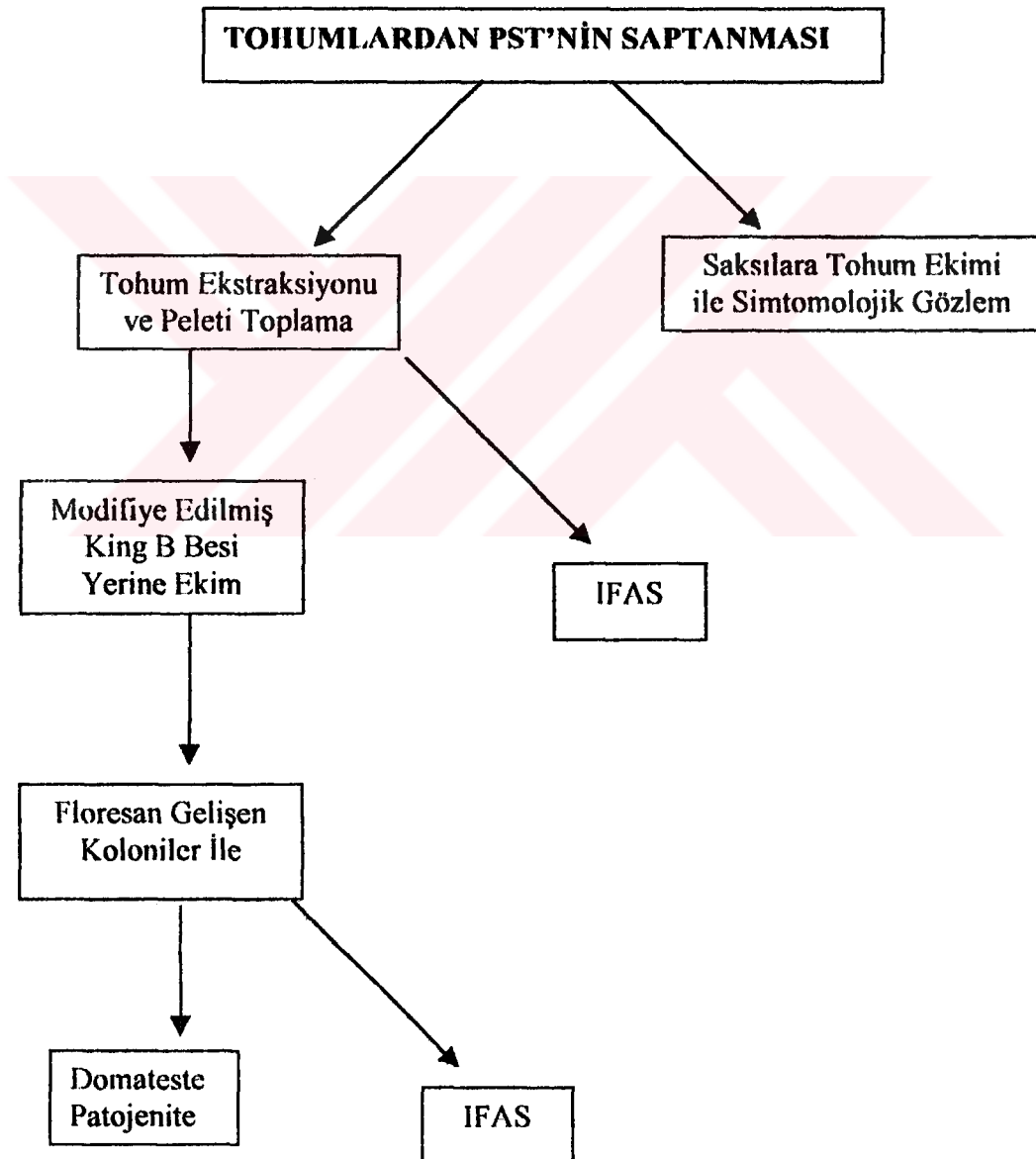
Çeşitli antibiyotiklerle zenginleştirilmiş yarı seçici ortama (KB) ekim, IFAS ve domateste patojenite testleri ile tohumlarda PST' nin varlığı belirlenmeye çalışılmıştır. Ülkemizde yetiştirilen hibrit ve standart 47 çeşit domates tohumu üreticilerden ve tohum üreten firmalardan sağlanmıştır.

Her bir çeşitten 5-7 g tohum örneği (Kritzman, 1991) 50-70 ml steril PBS ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  2 g/l,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.4 g/l ve NaCl 8 g/l) içinde 25°C de 18 saat boyunca bir çalkalayıcıda (Gerhardt, Schüttelmaschine RO 10) 150 rpm de çalkalanmıştır. Elde edilen sıvı, santrifüj tüplerine alınarak 10.600 g'de 15 dakika santrifüjlenerek pelet toplanmış ve 1ml PBS içinde tekrar sulandırılmıştır. Süspansiyonun 100 µl' si cycloheximide ve penicilin (100 mg/l) içeren KB besiyeri yerine 3 tekrarlı olarak yayılmıştır. 48 saat 25°C' de inkübasyondan sonra petride gelişen floresan bakterilerin tanısı IFAS ve domateste patojenite testi ile yapılmıştır.

Tohum ekstraksiyonu sonucu elde edilen süspansiyon ile petri denemeleri yapıldıktan sonra kalanı ile aşağıda anlatılan yöntemle göre IFAS testi gerçekleştirilmiştir (Bolkan, 1987). IFAS çalışmalarında kullanılan PST antiserumu, Çukurova ve Georg-Agust Üniversitelerinin ortaklaşa yürüttüğü bir proje çerçevesinde Almanya'da üretilmiştir. İlk olarak kuru antiserum 1 ml PBS içinde çözülmüş ve 1/100, 1/200, 1/400, 1/800, 1/1600, 1/3200, 1/6400, 1/12800 ve 1/25600 oranında seyreltilerek PST olduğu bilinen bir izolat ile IFAS testi yapılmıştır. IFAS testinde pozitif bulunan en düşük antiserum yoğunluğu diğer denemelerde

kullanacağımız antiserum titri'ni ortaya çıkarmıştır.

Ayrıca her çeşitten yaklaşık 100 adet domates tohumu steril toprak içeren saksılara ekilmiştir. Saksılara yüksek nem sağlamak amacıyla nemli polietilen örtüler geçirilmiştir. 25°C deki klima odasında muhafaza edilen saksılarda, tohum çimlenmesinden sonra, kotiledon yapraklarda oluşan lekeler incelenmiştir (Jones ve ark, 1989). Kotiledon lekelerinden örnek alınarak, KB besi yerine izole edilmiştir. Tütünde HR ve domateste patojenite testlerine göre tanı desteklenmiştir. İzlenen prosedür Şekil 3.1’de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Domates tohumlarında PST'nin aranmasında izlenen prosedür

IFAS testinin aşamaları ;

\*Örnek hazırlanması : Tohum ekstraksiyonu sonucu elde edilen pelet 1ml PBS' de çözülmüş ve 1/10 seyreltilerek örnek hazırlanmıştır. PST olduğundan şüphelenilen koloniler ise KB ortamında 24-48 saat tek koloni halinde geliştirilmiş ve tek bir koloni PBS' de seyreltilerek örnek hazırlanmıştır.

\*12 adet çukura sahip IFAS cam lamı üzerine 2 tekrarlı olarak 25µl örnek konulmuştur.

\*50 cm yüksekte bir saç kurutma makinası ile lam üzerindeki örnekler kurutulmuştur.

\*Lam 3 kez alevden geçirilerek örnek fikse edilmiştir.

\*Her bir çukura daha önce titri belirlenmiş antiserumdan 20µl konulmuştur.

\*Lam 30 dakika oda sıcaklığında karanlık ve nemli hücrede inkübe edilmiştir.

\*3 kez 0.01 M PB ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  2.7 g/l ve  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.4 g/l, pH:7.2) ile 5'er dakika yıkama yapılmıştır. Filtre kağıdı ile lam üzerindeki nem dikkatlice alınmış ve havada kurutulmuştur.

\*Her bir çukura FITC konjugat'dan (rabbit immunoglobulins, DAKOPATTS) 20µl eklenmiştir.

\*30 dakika oda sıcaklığında karanlık ve nemli hücrede inkübasyon yapılmıştır.

\*3 kez 0.01 M PB ile 5'er dakika yıkama yapılmış, nem bir filtre kağıdı ile dikkatlice alınmış ve havada kurutulmuştur.

\*Her bir çukura 1 damla PBG ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  3.2 g/l,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.15 g/l ve gliserol 50 ml/l, pH:7.6) damlatılmıştır.

\*Üzeri bir lamel ile kapatılan lam Olympus BH2-RFCA marka IF mikroskopunda incelenmiştir.

\* Hücre duvarlarının boyanması sonucu floresan görülen çok sayıdaki hücre testin pozitif sonuç verdiğini göstermiştir.

#### 3.2.4. Yapay Olarak Bulaştırılmış Domates Tohumlarında PST'nin

##### Saptanması

Domates tohumlarında PST' nin saptanmasında kullanılan IFAS testinin, 1 gram tohumdaki ne kadar PST inokulumu saptayacak duyarlılıkta olduğunu

belirlemek amacıyla bu deneme yapılmıştır. Bu amaç doğrultusunda farklı PST süspansiyonu ile inokule edilen domates tohumlarından elde edilen ekstrakt ile IFAS testi gerçekleştirilmiştir.

Domates tohumları yapay olarak bulaştırılmadan önce spektrofotometrede A660 : 1.5 yoğunluğunda hazırlanan PST süspansiyonundaki inokulum miktarı saptanmıştır. Yüzeyden dezenfekte edilen 7 'şer gram H-2274 çeşidi domates tohumu PST süspansiyonunun  $2 \times 10^8$ ,  $2 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^4$  ve  $2 \times 10^3$  hücre/ml konsantrasyonu ile vakum ve daldırma yöntemi kullanılarak inokule edilmiştir. İnokule edilen tohum grupları 70 ml PBS içinde 18 saat çalkalandıktan sonra oluşan süspansiyon 10.600 g'de 15 dakika santrifüjlenerek pelet toplanmıştır. 1/10, 1/100 ve 1/1000 oranında PBS ile sulandırılarak yukarıda anlatılan yöntemle göre IFAS testi uygulanmıştır. Ayrıca elde edilen süspansiyon seyreltilerek cycloheximide ve penicilin ile zenginleştirilmiş KB besi yerine yayılmıştır. Petride gelişen floresan koloniler sayılarak IFAS testinde pozitif bulunan en düşük PST inokulum miktarı hesaplanmıştır. Ayrıca farklı PST konsantrasyonları ile inokule edilen tohumlar steril toprak içeren saksılara ekilerek 1 ay sonra kotiledon yapraklarındaki lekelerin varlığı yönünden incelenmiş ve hasta bitki oranı (%) ile hastalık şiddeti %'si hesaplanmıştır.

### **3.2.5. PST' ye Karşı Fiziksel, Kimyasal ve Biyolojik Kontrol Yöntemleri**

#### **3.2.5.1. Tohum Uygulamaları**

% 1' lik NaOCl ile yüzeyden dezenfekte edilmiş H-2274 çeşidi domates tohumları 1 gece boyunca steril kabinde kurutulmuştur. Tohumlar 100 mg/ml rifampicine dayanıklı PST izolatının  $2.10^9$  hücre/ml süspansiyonu ile vakum ve daldırma yöntemi kullanılarak inokule edilmiştir. Tohumlar 1 gece boyunca steril kabinde steril filtre kağıtları üzerinde kurutulmuştur. Tohumların inokule olup olmadığını kontrol etmek amacıyla rifampicin içeren KB besi yerine ekim yapılmıştır.

Bulaşık tohumlardan patojeni elemine edebilmek için 50 ve 55°C' deki sıcak suya 20 ve 30 dakika, %1 NaOCl'ye 3, 4 ve 5 dakika, 0.6 M HCl'e 30 ve 60 dakika, % 0.5 ve 1.0 8-hidroxyquinoline'e 3 dakika, % 0.2 bakır asetata 3 dakika, 50 ve 100

ppm dozundaki streptomisine 5, 10, 15 ve 30 dakika daldırma, bronopol (Bronotak, Agrevo) ile kuru ilaçlama yapılarak muamele edilmişlerdir (Devash ve ark, 1980; Goode ve Sasser, 1980; Salcedo ve ark, 1992; Kritzman, 1993b).

Uygulama görmüş tohumlar antibiyotik içeren KB besisi yerine ekilerek tohumdan elemine olan bakteri %'si belirlenmiştir. ABBOTT formülüne göre % etki hesaplanmış ve bilgisayarda ANOVA ( $p=0.05$ ) ile istatistiki analizler yapılarak uygulamaların birbirinden farkı belirlenmiştir.

Rifampicin (100 mg/l) içeren besisi yerine ekilen tohumların çevresinde sadece Rif<sup>+</sup> PST'nin gelişeceği göz önüne alındığında floresan koloniler PST olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca tanıyı kuvvetlendirmek amacıyla tesadüfi seçilen bir kaç floresan bakteri ile KOH, oksidaz, tütünde HR ve domatesta patojenite testleri gerçekleştirilmiştir (Lelliott ve Stead, 1987).

Tohumların çimlenme %'leri nemli steril kurutma kağıdı içeren petrilerde testlenmiştir. 25°C' deki inkübatörde 10 günlük inkübasyondan sonra tohumların çimlenme %'si saptanmıştır (Bashan ve ark, 1982; Agarwal ve Sinclair, 1987). Kontrol amacıyla PST ile bulaştırılmış hiç bir tohum uygulaması görmemiş tohumlar kullanılmıştır.

### **3.2.5.2. Biyolojik Kontrol Çalışmaları**

#### **3.2.5.2.(1). Aday Antagonistlerin izolasyonu**

Huzurkent, Erdemli, Kocahasanlı ve Balcalı (Bitki Koruma Araştırma ve Uygulama Parseli)'da domates üretiminin yapıldığı hastalığın görülmediği seralardan ve PST ile bulaşık alandaki sağlam görünümlü bitkilerin yeşil aksamı ile kök bölgesinden toprak örneği alınmıştır.

10 g toprak veya yaprak örneği 100 ml PBS içerisinde oda sıcaklığında 2 saat süreyle 3.2.3.' de bildirilen çalkalayıcı üzerinde çalkalanmıştır. Süspansiyondan 1/1.000, 1/10.000 ve 1/100.000 seyreltme serileri hazırlanmış ve KB besisi yerine ekimler yapılmıştır. 25°C'de 48 saat inkübasyondan sonra farklı morfolojik yapılarda gelişen bakteri kolonileri saflaştırılmıştır. Aday antagonistler +4°C'de YDCA eğik ortamında saklanmıştır.

### **3.2.5.2.(2). Aday Antagonistlerin PST'ye Karşı Antagonist Etkilerinin *İn vitro*'da Testlenmesi**

Antagonistik özellikleri saptanacak bakteriyel izolatlar KB besisi yerine nokta inokulasyonu ile ekilip (Mitchel, 1992) 25°C'de 48 saat geliştirilmiştir. Spectrofotometrede hazırlanan  $10^6$  hücre/ml yoğunluğundaki PST süspansiyonu ortam üzerinde gelişen aday antagonistlere 15-20 cm uzaklıktan bir püskürtme tabancası yardımıyla püskürtülmüştür. 25°C'de 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda oluşan inhibisyon zonları cm olarak ölçülmüştür. Her izolat 3 tekrarlı olarak testlenmiştir. Etkili bulunan izolatlar *in vivo* saksı çalışmalarında kullanılmak üzere saklanmışlardır.

### **3.2.5.2.(3). Antagonistlerin PST' ye Karşı Antagonist Etkilerinin *İn vivo*'da Testlenmesi**

Tohum, toprak kökenli inokuluma ve yeşil aksamdaki PST' ye seçilen antagonistlerin etkilerini belirlemek amacıyla çalışma 3 ayrı yönetime göre yürütülmüştür. *İn vivo* çalışmaları sonucunda etkili olarak bulunan izolatlar ilerde tarla ve sera çalışmalarında kullanılmak üzere saklanmıştır.

### **3.2.5.2.(3a). Tohum Kökenli İnokuluma Antagonistlerin Etkisi**

PST ile infekteli tohumlardaki inokulumu bastırmada seçilen antagonistlerin etkisi, steril toprağa antagonist uygulaması görmüş yapay infekteli tohumların ekilmesiyle tespit edilmiştir.

% 1' lik NaOCl' ye 3 dakika daldırılarak yüzeyden dezenfekte edilen H-2274 çeşidi domates tohumları  $10^8$  hücre/ml yoğunluğundaki PST süspansiyonuna 30 dakika daldırılıp ardından 15 dakika vakum uygulanarak inokule edilmiştir. İnokule edilen tohumlar bir gece boyunca steril filtre kağıdı üzerinde steril kabinde kurutulmuştur. Tohumların PST ile bulaştırıldığını kanıtlamak amacıyla tesadüfi olarak seçilen 30 tohum KB besisi yerine ekilerek testlenmiştir. Yapay infekteli tohumlar %1 oranında karboksimetil sellüloz içeren steril su ile hazırlanan yaklaşık  $10^8$  hücre/ml yoğunluğundaki antagonist süspansiyonuna 15 dakika daldırılmıştır.

Metil bromit ile fumige edilerek steril edilen toprak, torf ve kum (1:1:1) karışımı içeren saksılara antagonist uygulaması görmüş PST ile bulaşık tohumlar ekilmiştir. Pozitif kontrol amacıyla steril toprağa sadece PST ile inokule edilmiş tohumlar, negatif kontrol amacıyla steril toprağa yüzeyden dezenfekte edilmiş sağlıklı domates tohumlarının ekimi yapılmıştır. 3 tekrarlı olarak yürütülen denemede her bir saksıya 10 adet tohum ekilmiştir. 20-25°C, %70-80 nem içeren klima odasında bitkiler nem sağlamak amacıyla ilk 15 gün polietilen torbalar ile kaplanmıştır. 1 aylık inkübasyondan sonra gelişen fidelerin kotiledon yapraklarında hastalığın varlığı yönünden inceleme yapılarak (Okon ve ark, 1978) hasta bitki oranı (%) ve 0-3 skalasına (0 = kotiledonlarda leke yok, 1 = kotiledonlarda 1 leke, 2 = kotiledonlarda 2-3 leke, 3 = kotiledonlarda 4 ve daha fazla leke) göre hastalık indeksi hesaplanarak % hastalık şiddeti saptanmış ve antagonistlerin etkisi değerlendirilmiştir. Abbott formülüne göre % etki hesaplanarak (Karman, 1971) bilgisayarda Annova ile istatistik analizler yapılmış ve Duncan testi ( $p=0.05$ ) ile gruplandırılmıştır.

#### **3.2.5.2.(3b). Toprak Kökenli İnokuluma Antagonistlerin Etkisi**

Topraktaki PST inokulumuna seçilen antagonistlerin etkisi, infekteli bitki artıkları içeren toprağa, antagonist uygulaması görmüş bulaşık olmayan tohumların ekilmesiyle testlenmiştir.

PST' ye duyarlı olan 3-5 yapraklı dönemdeki H-2274 çeşidi domates bitkileri yapraklara püskürtme ve gövdeye enjeksiyon şeklinde PST ile bulaştırılmıştır. Yaklaşık bir hafta sonra belirgin hastalık simptomsu gösteren domates bitkileri 2-3 cm'lik parçalar halinde kesilerek  $10^8$  hücre/ml yoğunluğundaki PST süspansiyonuna 30 dakika daldırılmıştır. 3 gün boyunca oda sıcaklığında gazete kağıtları üzerinde kurutulan bitki parçaları steril toprak içeren 10X10 cm boyutundaki saksılara 5 gram gelecek şekilde karıştırılarak toprak inokule edilmiştir. Denemede kullanılan domates tohumları % 1 NaOCl' ye 3 dakika daldırılarak yüzeyden dezenfekte edilmiştir. %1'lik steril karboksimetil sellulaz ile hazırlanan yaklaşık  $10^8$  hücre/ml yoğunluğundaki antagonist süspansiyonuna tohumlar 15 dakika batırılarak antagonist süspansiyonu ile kaplanmıştır. Hasta bitki artıkları içeren PST ile bulaşık toprağa 10'ar adet antagonist uygulaması görmüş tohumlar ekilmiştir. Pozitif kontrol olarak

hasta bitki artıkları içeren toprağa antagonist uygulaması yapılmayan temiz tohumlar ekilmiştir. Negatif kontrol olarak steril toprağa temiz tohum ekimi yapılmıştır. Her bir antagonist ile 3 tekrarlı olarak deneme yürütülmüştür. Her tekrarda bir saksıya 10 adet tohum ekimi yapılmıştır. 20-25°C, %70-80 nem içeren klima odasında ilk 15 günde bitkiler polietilen torbalar ile kaplanarak yeterli nem sağlanmaya çalışılmıştır. 1 aylık inkübasyondan sonra gelişen fidelerin kotiledon yapraklarında hastalığın varlığı yönünden inceleme yapılarak (Okon ve ark, 1978) hasta bitki oranı (%) ve 0-3 skalasına göre hastalık indeksi saptanarak % hastalık şiddeti hesaplanmıştır. Abbott formülüne göre % etki hesaplanmış (Karman, 1971), bilgisayarda Annova ile istatistik analizler yapılmış ve Duncan testi ile ( $p=0.05$ ) gruplandırılmıştır.

### 3.2.5.2.(3c). Yeşil Aksamdaki İnokuluma Antagonistlerin Etkisi

Yeşil aksamdaki PST inokulum miktarını azaltma veya baskı altına almada seçilen antagonistlerin etkisi, PST' ye duyarlı olan 3-5 yapraklı dönemdeki H-2274 çeşidi domates bitkilerine antagonist ve patojen süspansiyonunun püskürtülmesi ile saptanmıştır. Diğer antagonist çalışmalarda kullanılan izolatlara ek olarak pek çok fungal ve bakteriyel hastalığa karşı antagonistik özelliği bilinen İsrail' den getirilen 6 izolat bu çalışma dahilinde testlenmiştir.

İlk adım olarak PST'nin domates bitkilerinde simptom oluşturan en düşük inokulum yoğunluğu belirlenmiştir. Spectrofotometrede A660 : 0.06 yoğunluğunda PST inokulumu hazırlanarak 1/10, 1/100, 1/1.000, 1/10.000 ve 1/100.000 oranında seyreltilmiş ve 3 tekrarlı olarak domates bitkilerine püskürtülmüştür. Yukarıda özellikleri belirtilen iklim odasında bir haftalık inkübasyondan sonra tipik hastalık simptomunun görüldüğü en düşük inokulum yoğunluğu saptanmıştır.

Her bir antagonist bakterinin  $10^8$  hücre/ml yoğunluğundaki süspansiyonu 3-5 yapraklı dönemdeki H-2274 çeşidi domates bitkilerine püskürtülmüştür. Yapraklardaki ıslaklık kuruyuncaya kadar, yaklaşık 3-5 saat sonra daha önce tespit edilen domates bitkilerinde simptom oluşturan patojenin en düşük inokulum yoğunluğu bu bitkilere bir el pülverizatörü yardımıyla püskürtülmüştür. Her tekrarda 3 bitki olmak üzere, 3 tekrarlı kurulan deneme 1 hafta sonra her bir bitkide oluşan lekeler sayılarak değerlendirilmiştir. Pozitif kontrol olarak sadece PST süspansiyonu,

negatif kontrolde ise steril su ile bitkiler inokule edilmiştir. Abbott formülüne göre % etki hesaplanmış (Karman, 1971), bilgisayarda Annova ile istatistik analizler yapılmış Duncan testi ( $p=0.05$ ) ile gruplandırılmıştır.

### 3.2.5.3. Solarizasyon Çalışmaları

Bu deneme Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Araştırma ve Uygulama Parselinde kurulmuştur. İlk solarizasyon ön çalışması 8 hafta boyunca 1 Temmuz-1 Eylül 1994 tarihleri arasında  $3 \times 9$  m<sup>2</sup> boyutundaki bir alanda yapılmıştır. Daha sonraki 3 yılda (1995, 1996 ve 1997) Temmuz-Eylül tarihleri arasında 18 m boyunda 4 m genişliğindeki bir plastik ısıtmasız serada solarizasyon uygulaması Katan (1989)'a göre gerçekleştirilmiştir. Ayrıca 1995 yılında 18 m boyunda 3.5 m genişliğindeki bir cam ısıtmasız sera toprağı da aynı tarihlerde solarize edilmiştir.

Mayıs, Haziran ayları boyunca klima odasında yetiştirilen H-2274 çeşidi domates bitkileri Rif+ PST izolatıyla yapraklara püskürtme ve gövdeye enjeksiyon yöntemiyle inokule edilmiştir. Yaklaşık bir hafta sonra bitkilerde belirtilen gelişince bitkiler 2-3 cm'lik parçalar halinde kesilmiştir. Hasta bitki artıkları ön denemenin yapılacağı alanın tümüne Haziran ayının sonunda karıştırılarak toprak PST ile bulaştırılmıştır. Ayrıca sıvı besin yerinde geliştirilen bakteri süspansiyonuyla da toprak ıslatılmıştır. Toprağın 40 cm derinliği nemlenecek şekilde toprak sulanmış ve toprağın polietilen örtü ile iyice temasının sağlanması amacıyla sulamadan 2 gün sonra toprak yüzeyi tırmıkla iyice düzeltilmiştir. Alan 12 eşit parçaya bölünerek 6 parsel hiçbir uygulama yapılmaksızın kontrol olarak bırakılmış ve diğer 6 parselin 4 kenarına önceden karıklar açılarak 30µm kalınlığındaki şeffaf polietilen örtü iyice gerilerek karıklar içine gömülmüş ve 1 Temmuz-1 Eylül tarihleri arasında toprak solarize edilmiştir. Solarizasyon uygulaması esnasında yüzey düz olmadıkça toprakta oluşan gölgelenme sonucu solarizasyonun etkisi azalabilmektedir (De Vay, 1997). Bu nedenle yüzeyin düz ve naylon örtünün gergin olmasına özen gösterilmiştir.

1995, 1996 ve 1997 yıllarının Haziran ayının sonunda ısıtmasız bir plastik sera toprağına PST ile infekteli bitki artıkları traktörle karıştırılarak toprak bulaştırılmış ve solarizasyon uygulaması yukarıda anlatıldığı gibi 1 Temmuz-1 Eylül tarihleri arasında 8 hafta boyunca yapılmıştır. Solarize edilecek parsel ne kadar büyük olursa

uygulamanın etkisinin o kadar arttığı (De Vay, 1997) göz önüne alındığından tüm sera alanı eşit olarak ikiye bölünmüş ve yarısı solarize edilmiştir. Aynı büyüklükteki yan parsel hiç bir uygulama yapılmaksızın kontrol parsel olarak bırakılmıştır.

Dijital elektronik toprak termometreleri ile solarize edilen ve kontrol parselin 5, 10, 15, 30 ve 40 cm derinliğindeki toprak sıcaklığı her gün saat 15:00'de solarizasyon süresi boyunca kaydedilmiştir.

### 3.2.5.3.(1). Toprak Solarizasyonunun Hastalık Gelişimi Üzerine Etkisi

Bölgemiz koşullarında ısıtmasız plastik seralara fide dikimi Mart ayında yapılmakta ve üretim Haziran ayına kadar devam etmektedir. Bu koşullar göz önüne alındığından 1994 yılında ön çalışma olarak solarizasyon uygulamasının yapıldığı alanın tüm parsellerine Şubat ayında temiz tohum ekimi yapılmıştır. Bitkilere yeterli nem sağlamak ve gece soğuktan fideleri koruyabilmek amacıyla tohum ekimi yapılan alanın üzerinde alçak tünel oluşturularak üzeri naylon ile kaplanmıştır. Tohum çimlenmesinden sonra her gün gözlemler yapılarak kotiledon yapraklarda hastalık belirtilerinin varlığı gözlenmiştir (Okon ve ark, 1978). Yaklaşık 1 ay sonra gelişen fidelerin kotiledon yapraklarında belirtiler ortaya çıkmış ve toplam fide sayısı, hastalık belirtisi gösteren fide sayısı, hasta fide kotiledon yapraklarındaki lezyon sayısı saptanmıştır. Enfekteli fide sayısının toplam fide sayısına oranlanmasıyla hasta bitki oranı (%) ve hasta fidelerdeki lezyon sayısı 0-3 skalasına göre değerlendirilerek hastalık şiddeti saptanmış (Aysan ve ark, 1995) ve solarize edilen ile kontrol parsellerde belirlenen bu oranlar karşılaştırılarak hastalık gelişimine toprak solarizasyonunun etkisi Abbott'a göre hesaplanmıştır.

Isıtmasız plastik serada uygulanan solarizasyon çalışmalarında sera toprağı Eylül ayında solarizasyon uygulaması bittikten sonra Şubat ayına kadar boş kalmıştır. Şubat ayında solarize edilen ve kontrol parselin tam ortasındaki 1m eninde 18 m boyundaki alana yüzeyden dezenfekte edilmiş H-2274 çeşidi domates tohumları ekilmiştir. Hastalığın çıkışını teşvik etmek amacıyla tohum ekimi yapılan alanın üzerinde polietilen örtü ile alçak tünel oluşturulmuştur. Yaklaşık bir ay sonra çimlenen tohumların kotiledon yaprakları incelenerek hastalık %'si ile hastalık şiddeti saptanmış ve solarizasyon uygulamasının etkisi Abbott'a göre hesaplanmıştır.

### **3.2.5.3.(2). Toprakta İnfekteli Bitki Artıklarındaki Patojen Canlılığı Üzerine Solarizasyonunun Etkisi**

Plastik sera toprağı 1995, 1996 ve 1997 yıllarında sırasıyla  $8.0 \times 10^5$ ,  $8.6 \times 10^7$  ve  $3.0 \times 10^6$ , cam sera toprağı ise 1995 yılında  $5.6 \times 10^6$  hücre/g bitki artığı yoğunluğu ile inokule edilmiş bitki artıkları ile bulaştırılmıştır. Solarizasyon sonrası alınan toprak örneğı elenerek infekteli bitki artıkları topraktan ayrılmıştır. İnfekteli bitki artıkları 1 saat steril PBS'de çalkalanmış ve elde edilen süspansiyon KB ve rifampicin ile cycloheximide içeren KB besi yerine yayılmıştır. Yapılan izolasyonlar sonucu solarizasyonun topraktaki patojen popülasyonuna etkisi saptanmaya çalışılmıştır.

Ayrıca 100 ppm rifampicine dayanıklı PST izolatu ile inokule edilen domates bitki parçaları naylon kadın çorabı içerisinde, solarizasyon öncesi, toprağın 0, 5, 15, 30 ve 40 cm derinliğine gömülmüştür. Solarizasyon sonrası her derinlikten çıkarılan örneklerden ayrı ayrı izolasyonlar yapılmış ve rifampicin içeren ortamda gelişen floresan koloniler ile tütünde HR, domateste patojenite testleri yapılarak PST 'nin tanısı yapılmıştır. KB ortamında PST'nin dışında diğer floresan bakterilerin de yoğun gelişimi olduğundan, bakteriler steril distile su ile yıkanarak santrifüj edilmiş, pelet tekrar süspanse edildikten sonra tütünde HR ve domateste patojenite testleri gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışmanın dışında, 7 cm boyunda ve 8 cm enindeki cam reçel kavanozlarının içinde YDCA eğik ortamı bulunan 100ppm rifampicine dayanıklı PST izolati çizilerek solarizasyon öncesi, uygulama yapılacak ve kontrol parsellerin 5, 15, 30 ve 40 cm derinliklerine gömülmüştür. Solarizasyon uygulaması bittikten sonra çıkarılan şişelerdeki PST'nin canlılığını testlemek amacıyla KB besi yerine çizimler yapılmıştır. Tanı, tütünde HR, domateste patojenite testine göre yapılmıştır.

### **3.2.5.3.(3). Solarizasyonunun Topraktaki Toplam Mikroorganizma Popülasyonu Üzerine Etkisi**

Solarizasyonun topraktaki toplam bakteri popülasyon yoğunluğuna etkisini saptamak amacıyla her parselin üç ayrı yerinden 0-40 cm. derinliklerinden bir toprak burgusu yardımıyla toprak örnekleri alınmış 3 tekrar karıştırılarak tek örnek haline

getirilmiştir. Topraktaki total bakteri değişimi, polietilen örtüler örtülmeden önce ve örtüler kaldırıldıktan hemen sonra toprak sulandırma yöntemine göre yapılan izolasyonlar ile izlenmiştir. İzolasyonlarda KB besi yeri kullanılmıştır. Toplam bakteri popülasyonu hücre/g toprak olarak ifade edilmiştir.

#### **3.2.5.3.(4). Toprak Solarizasyonunun Verime Etkisi**

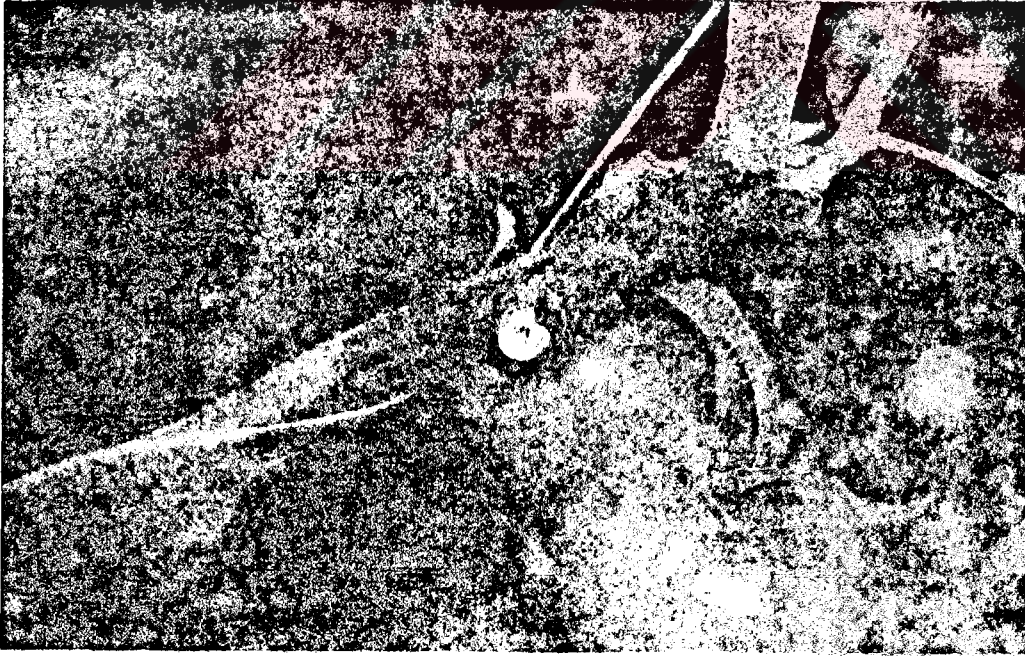
Mart ayında plastik serada her iki uygulamanın bulunduğu parsellere Fantastik 144 çeşidi (Hazera tohumculuk) domates fideleri dikilerek hasat döneminde kontrol ve solarize edilen parsellerdeki meyveler ayrı ayrı toplanarak tartılmış ve solarizasyonu verime olan etkisi Abbott' a göre saptanmıştır.



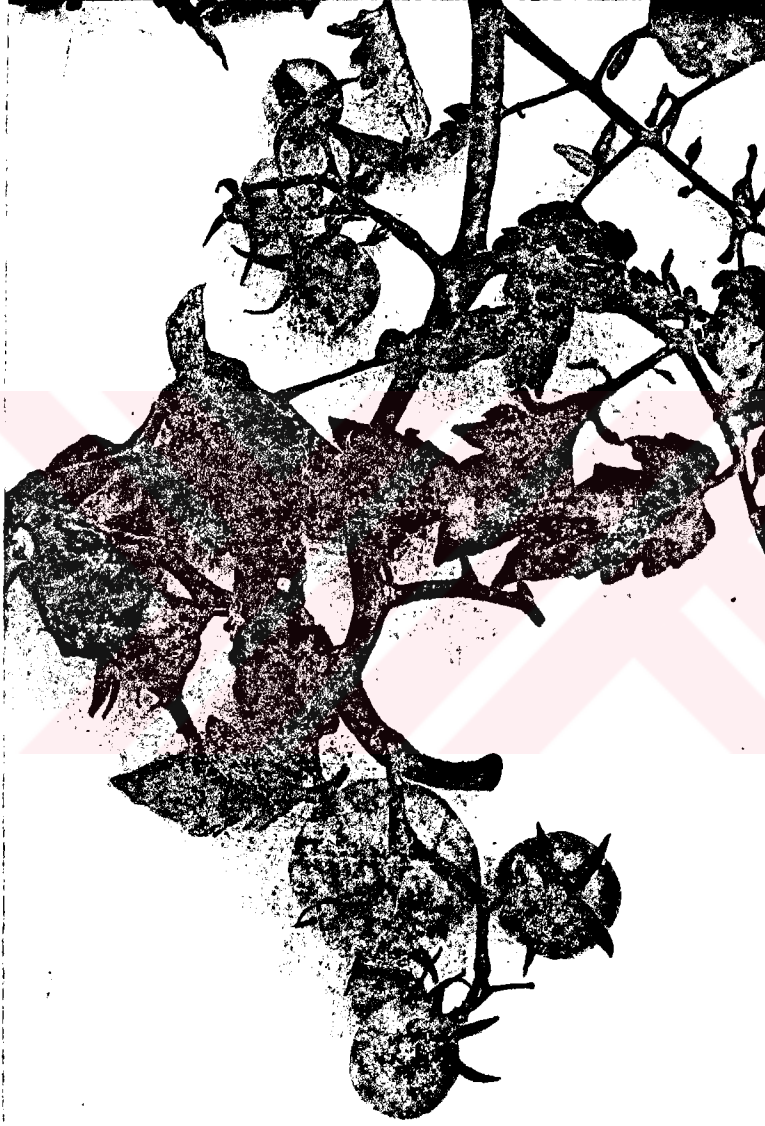
#### 4. BULGULAR ve TARTIŞMA

##### 4.1. PST İzolatlarının Tanısı

Adana, İçel, Hatay, Konya, Antalya illerinde açıkta ve serada yetiştirilen domates bitkilerinde tipik hastalık simptomu gösteren örnekler saptanmıştır. Hastalık simptomu olarak yaprak kenarlarında sararma ile birlikte kuruma, yaprak ayasında sarı hale ile çevrili koyu kahverengi-siyah lekeler, gövde boyunca siyahımsı lekeler ve meyve üzerinde toplu iğne başı büyüklüğünde dışa çıkıntılı lekeler saptanmıştır. Gövdedeki lekeler yüzeysel ve tırnakla kazınınca yeşil kısmın ortaya çıktığı gözlenmiştir. Meyve lekelerine açıkta tarla domatesi üretimi yapılan, Yumurtalık (Adana) ve Kırıkhan (Hatay) ilçelerinde rastlanılmış ve seralarda meyve lekelerine rastlanılmamıştır. Seralarda şiddetli infektelenen sırığa alınan çeşitlerin gövdeleri tamamen lekeler ile kaplanmış ve çiçek dökümleri gözlenmiştir (Şekil 4.1, 4.2, 4.3, 4.4)



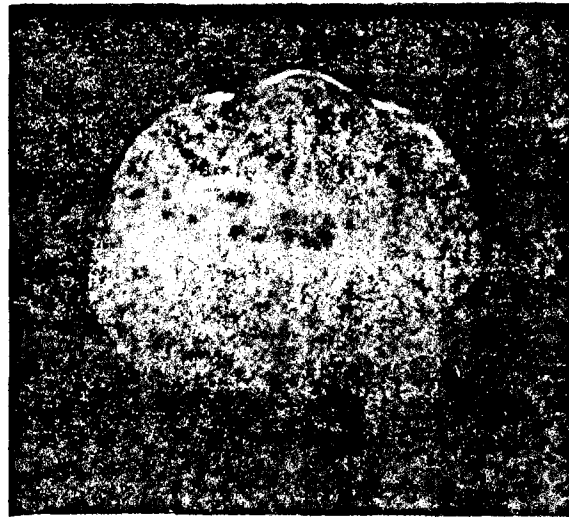
Şekil 4.1. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* 'nun Hatay ili Samandağ ilçesinde bir plastik serada domates bitkisinin gövdesinde oluşturduğu leke



Şekil 4.2. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* 'nun Antalya ili Gazipaşa ilçesinde bir plastik serada domates bitkisinin meyve sapında ve gövdesinde oluşturduğu uzunca siyah lekeler



Şekil 4.3. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* 'nun İçel ili Erdemli ilçesinde bir plastik serada domates bitkisinin yaprağında oluşturduğu etrafi sarı hale ile çevrili lekeler



Şekil 4.4. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* 'nun Adana ili Yumurtalık ilçesinde açık alandaki bir domates meyvesinde oluşturduğu lekeler

#### 4.1.1. PST İzolatlarının Klasik Bakteriyolojik Yöntemlerle Tanısı

Toplam 26 izolat arasından seçilen A3f ve 1B izolatlarının tanısı klasik bakteriyolojik yöntemlerle yapılmıştır. Levan tip koloniler üreten, oksidaz, patatestte pektolitik aktivite ve arginin testi sonucu negatif olan, tütünde HR pozitif simptom oluşturan, KB besi yerinde floresan renkte gelişen, karbon kaynağı olarak DL-laktatı kullanamayan domates bitkileri üzerinde tipik hastalık simptomu oluşturan A3f ve 1B izolatları karşılaştırma kültürü olan GSPB 483 ile paralel olarak aynı sonuçları vermişler ve PST olarak tanılanmıştır.

#### 4.1.2. PST İzolatlarının ELISA Testi İle Tanısı

Yapılan ELISA testi çalışmalarında IA-Israael kodlu PST kültürüne karşı üretilmiş olan antiserumdan hazırlanan belirteçler (gama globülin, enzimle işaretlenmiş gama globülin = konjugate) kullanılmıştır. Testte pozitif örnek olarak IA-Israael kodlu PST kültürü kullanılırken negatif kontrol olarak kültür hazırlamasında kullanılan PBS tamponu kullanılmıştır. Çizelge 4.1.'de görüldüğü gibi yapılan test sonuçlarında diğer bakteri kültürlerinden elde edilen 405 nm'de okunan absorbans değerleri pozitif kontrolde okunan absorbans değerlerine yakın sonuçlar vermiştir. Negatif kontrol amaçlı kullanılan PBS tamponu çok düşük absorbans değeri vermiştir. Sonuç olarak testlenmeye alınan diğer kültürlerin de PST olduğu sonucuna varılmıştır. İlk okuma 30 dakika sonra yapılmış ve 60 dakika sonra yapılan ikinci okuma zamanına kadar halen reaksiyonun devam ettiği görülmüştür. Reaksiyon 3N NaOH ile durdurulduktan sonra görülen sarı renk tüm izolatların PST olduğunu kanıtlamaktadır (Şekil 4.5).

Çizelge 4.1. ELISA plate okuyucusunda PST izolatlarının okunan absorbens değerleri

| İzolat Adı       | 405 nm' de okunan değer |                 |
|------------------|-------------------------|-----------------|
|                  | 30 dakika sonra         | 60 dakika sonra |
| PBS(negatif knt) | 0.040                   | 0.080           |
| IA-Israel        | 0.295                   | 0.300           |
| GSPB 1776        | 0.171                   | 0.209           |
| GSPB 1778        | 0.172                   | 0.260           |
| GSPB 479,        | 0.181                   | 0.195           |
| GSPB 483,        | 0.199                   | 0.201           |
| GSPB 487         | 0.179                   | 0.206           |
| 4101             | 0.114                   | 0.117           |
| 4212             | 0.190                   | 0.225           |
| 4215             | 0.159                   | 0.222           |
| 4216             | 0.167                   | 0.200           |
| PT1              | 0.139                   | 0.167           |
| PT3              | 0.178                   | 0.199           |
| PT4              | 0.198                   | 0.204           |
| GPG2             | 0.195                   | 0.201           |
| KGS1             | 0.185                   | 0.211           |
| DY1              | 0.191                   | 0.232           |
| Dan1 la          | 0.213                   | 0.258           |
| A3f              | 0.191                   | 0.232           |
| H2a              | 0.235                   | 0.250           |
| K1               | 0.159                   | 0.200           |
| H1               | 0.139                   | 0.158           |
| AU1              | 0.171                   | 0.203           |
| FK-YK1           | 0.184                   | 0.193           |
| 13/2             | 0.165                   | 0.199           |
| 1B               | 0.297                   | 0.304           |
| İM               | 0.184                   | 0.202           |
| AAD-1b           | 0.171                   | 0.209           |



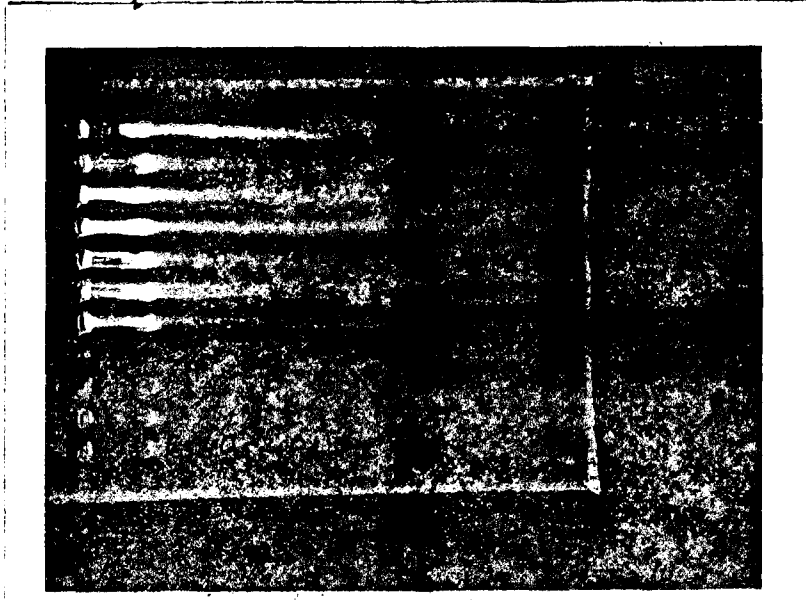
Şekil 4.5. PST izolatlarının ELISA testi sonucu oluşturduğu reaksiyon

#### 4.1.3. PST izolatlarının PCR Tekniği ile Tanısı

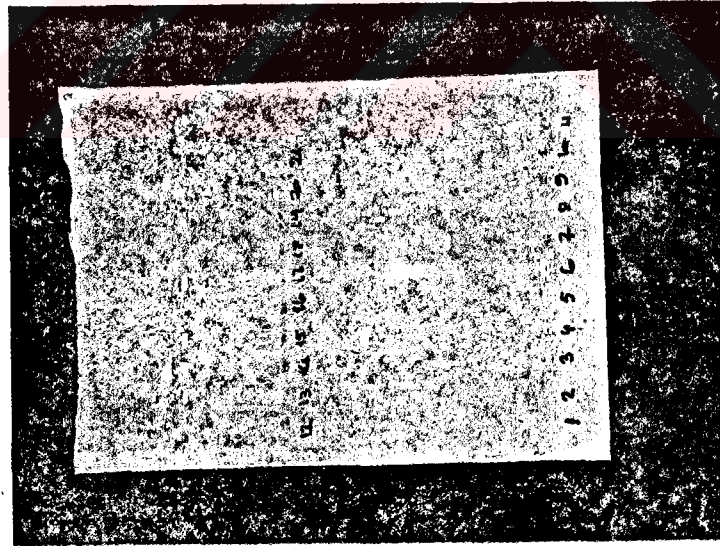
RNA/DNA calculator aleti ile yapılan okuma sonuçlarına göre OD 260/280 oranı 1.31-2.24 arasında OD 280/260 oranı 0.45-0.76 arasında değişmiştir (Çizelge 4.2). OD 260/280 oranı yaklaşık 1.8 ve OD 280/260 oranı 0.5 civarında olduğunda genomik DNA'nın saflaştırıldığına karar verilir. Tüm izolatların aşağı yukarı bu değerlere yakın sonuçlar verdiği görülmüştür. Genomik DNA'nın saflaştırıldığından emin olabilmek amacıyla agorose jel (% 0.8) üzerinde de saptanmıştır. Şekil 4.6'da görüldüğü gibi oluşan bantlar genomik DNA'nın saflaştırıldığını kanıtlamaktadır. Saflaştırılan genomik DNA'lar ile yapılan PCR denemelerinde, PCR ürünlerinin elektroforez çalışmaları sonucu agorose jelde (% 1.5) oluşturduğu bantlar tüm izolatların PST olduğunu göstermektedir (Şekil 4.7). Bu çalışma ile PST izolatlarının moleküler düzeyde, spesifik ve duyarlı tanısı gerçekleştirilmiştir. Serolojik (ELISA) ve moleküler (PCR) yöntemlerin laboratuvarımızca tanıda rutin kullanılır hale gelmesi, gelecekte yapılacak çalışmalarımıza basamak oluşturması açısından önem taşımaktadır.

Çizelge 4.2. Saflaştırılan genomik DNA miktarlarının RNA/DNA calculator  
aletinde okunan değerleri

| İzolat Adı | OD 260 | OD 280 | 260/280 oranı | 280/260 oranı |
|------------|--------|--------|---------------|---------------|
| GSPB 1776  | 0.425  | 0.256  | 1.66          | 0.60          |
| GSPB 1778  | 0.529  | 0.291  | 1.82          | 0.55          |
| GSPB 479,  | 0.600  | 0.386  | 1.55          | 0.64          |
| GSPB 483,  | 0.720  | 0.321  | 2.24          | 0.45          |
| GSPB 487   | 0.300  | 0.182  | 1.65          | 0.61          |
| 4101       | 0.400  | 0.220  | 1.82          | 0.55          |
| 4212       | 0.390  | 0.197  | 1.98          | 0.50          |
| 4215       | 0.414  | 0.222  | 1.88          | 0.53          |
| 4216       | 0.006  | 0.003  | 1.87          | 0.50          |
| PT1        | 0.979  | 0.644  | 1.52          | 0.65          |
| PT3        | 0.520  | 0.302  | 1.72          | 0.58          |
| PT4        | 1.626  | 0.922  | 1.767         | 0.56          |
| GPG2       | 0.601  | 0.397  | 1.51          | 0.66          |
| KGS1       | 0.480  | 0.280  | 1.71          | 0.58          |
| DY1        | 0.399  | 0.187  | 2.13          | 0.47          |
| Dan11a     | 0.012  | 0.008  | 1.75          | 0.66          |
| A3f        | 0.277  | 0.174  | 1.59          | 0.62          |
| H2a        | 1.598  | 1.223  | 1.31          | 0.76          |
| K1         | 0.379  | 0.248  | 1.54          | 0.65          |
| H1         | 0.440  | 0.236  | 1.87          | 0.53          |
| AU1        | 0.613  | 0.431  | 1.43          | 0.70          |
| FK-YK1     | 0.310  | 0.202  | 1.54          | 0.65          |
| 13/2       | 0.448  | 0.253  | 1.79          | 0.56          |
| 1B         | 0.300  | 0.170  | 1.76          | 0.57          |
| İM         | 0.425  | 0.258  | 1.65          | 0.61          |
| AAD-1b     | 0.200  | 0.132  | 1.52          | 0.66          |



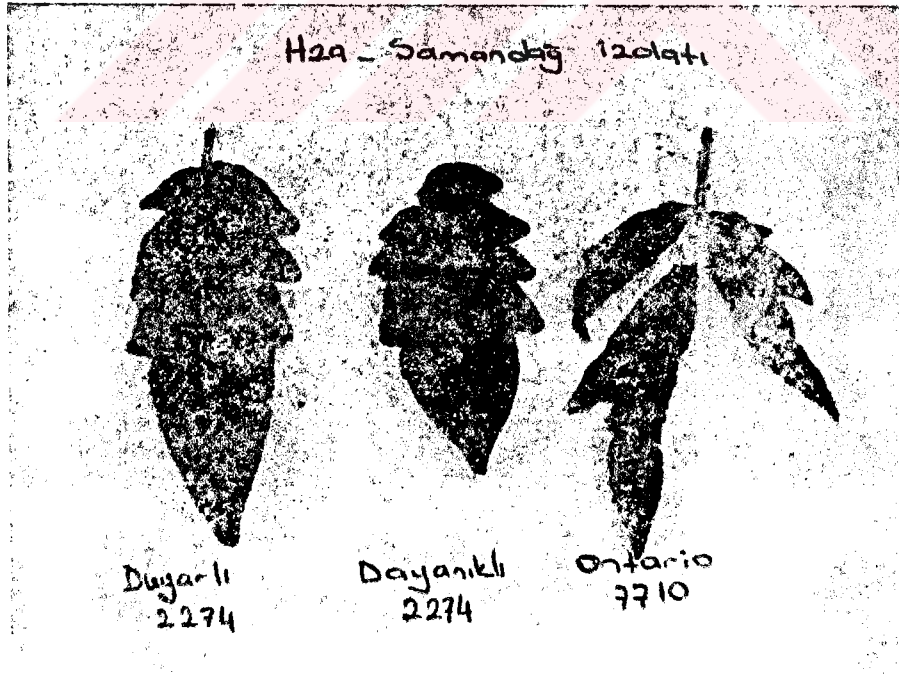
Şekil 4.6. PST izolatlarının genomik DNA'larının agarose jel üzerinde oluşturduğu bantlar (hat 1: PT4, hat 2: H11, hat 3: 4215, hat 4: K1, hat 5: 13/2, hat 6: AU1, hat 7: A3f, hat 8: steril su, hat 9-11 : 200 ng marker)



Şekil 4.7. PCR ile çoğaltılan PST izolatları DNA'larının agarose jel üzerinde oluşturduğu bantlar (hat 1: steril su, hat 2-6: boş, hat 7: PT1, hat 8: PT2, hat 9: boş, hat 10: GPG2, hat 11: KGS1, hat 12: DY1, hat 13: Dan11a, hat 14: A3f, hat 15: H2a, hat 16: boş , hat 17: H11, hat 18: boş, hat19: 1B ve hat 20: AAD-1b).

#### 4.2. PST İzolatlarının Irklarının Tespiti

Almanya'dan getirilen ve Irk 0 olduğu bilinen GSPB 1776 Irk 0 ve GSPB 1778 Irk 1 ile karşılaştırmalı olarak yapılan çalışma sonucuna göre sadece H-2274 çeşidi üzerinde PST simptomu oluşturan KGS1, DY1, Dan 11a, FK-YK1 ve AAD1b izolatları Irk O olarak tanımlanmıştır. Buna karşın H-2274, *Pto* geni içeren H-2274 ve Ontario çeşitlerinin her üçü üzerinde tipik hastalık simptomu oluşturan 4101, 4212, 4215, 4216, PT1, PT3, PT4, GPG2, A3f, H2a, K1, H1, AU1, 13/2, 1B ve 1M isimli izolatlar PST Irk 1 olarak saptanmıştır. Almanya'dan getirilen PST olduğu bilinen fakat hangi ırk olduğu bilinmeyen GSPB 479, 483 ve 487 izolatlar Irk 0 olarak saptanmıştır. Bu izolatların toplandığı yerler, domates bitkileri üzerindeki simptomu ve ırkları Çizelge 4.3.'de verilmiştir. Irk 1 olarak saptanan H2a (Samandağ) izolatının H-2274, *Pto* geni içeren H-2274 ve Ontario 7710 çeşidi üzerinde oluşturduğu tipik hastalık simptomları Şekil 4.8'de görülmektedir.



Şekil 4.8. H2a izolatının H-2274, *Pto* geni içeren H-2274 ve Ontario 7710 çeşitleri üzerinde oluşturduğu tipik hastalık simptomları

Çizelge 4. 3. PST izolatlarının toplandığı yerler, domates bitkileri üzerindeki simptomu ve Irkları

| İzolat Adı | Yer                | H-2274 | H-2274<br>+Pto | Ontario<br>7710 | İrk   |
|------------|--------------------|--------|----------------|-----------------|-------|
| GSPB 1776  | Almanya            | +      | -              | -               | İrk 0 |
| GSPB 1778  | Almanya            | +      | +              | +               | İrk 1 |
| GSPB 479,  | Almanya            | +      | -              | -               | İrk 0 |
| GSPB 483,  | Almanya            | +      | -              | -               | İrk 0 |
| GSPB 487   | Almanya            | +      | -              | -               | İrk 0 |
| 4101       | Ankara             | +      | +              | +               | İrk 1 |
| 4212       | Ankara             | +      | +              | +               | İrk 1 |
| 4215       | Ankara             | +      | +              | +               | İrk 1 |
| 4216       | Ankara             | +      | +              | +               | İrk 1 |
| PT1        | Kemalpaşa(Bursa)   | +      | +              | +               | İrk 1 |
| PT3        | Karacabey(Bursa)   | +      | +              | +               | İrk 1 |
| PT4        | Turgutlu(Manisa)   | +      | +              | +               | İrk 1 |
| GPG2       | Gazipaşa(Antalya)  | +      | +              | +               | İrk 1 |
| KGS1       | Koyunlu(Antalya)   | +      | -              | -               | İrk 0 |
| DY1        | Doyuran(Antalya)   | +      | -              | -               | İrk 0 |
| Dan11a     | Merkez(Antalya)    | +      | -              | -               | İrk 0 |
| A3f        | Konya(Akşehir)     | +      | +              | +               | İrk 1 |
| H2a        | Samandağ(Hatay)    | +      | +              | +               | İrk 1 |
| K1         | Kırıkhan(Hatay)    | +      | +              | +               | İrk 1 |
| H1         | Huzurkent (İçel)   | +      | +              | +               | İrk 1 |
| AU1        | Erdemli(İçel)      | +      | +              | +               | İrk 1 |
| FK-YK1     | Erdemli(İçel)      | +      | -              | -               | İrk 0 |
| I3/2       | Erdemli(İçel)      | +      | +              | +               | İrk 1 |
| 1B         | Kocahasanlı (İçel) | +      | +              | +               | İrk 1 |
| İM         | İmamoglu (Adana)   | +      | +              | +               | İrk 1 |
| AAD-1b     | Yumurtalık(Adana)  | +      | -              | -               | İrk 0 |

Bu çalışma ile ülkemizin çeşitli yörelerinden izole edilen 21 PST izolatının 5 tanesi ırk 0, 16 tanesi ırk 1 olarak tanılanmıştır. Abak ve ark, (1990) Türkiye'nin çeşitli yörelerinden topladıkları hasta bitki örneklerinden izole ettikleri PST izolatlarının hiç birinin Ontario 7710 çeşidinde symptom oluşturmadığını bildirmişlerdir. Yapılan bu çalışma ile Irk 1'in ülkemizde varlığı saptanmıştır. Bu ırk Kanada (Lawton ve MacNeil, 1986) ve Bulgaristan'da (Bogatsevska ve ark, 1989) da saptanmıştır. Konukçu patojen ilişkilerinde dayanıklı çeşitlerin bölgeye girişi ve yetiştirilmesinden sonra yeni ırkların oluşumu bilinen bir gerçektir (Brinkerhaff, 1970; Mew ve ark, 1992). Bu ırk sayesinde Ontario 7710 çeşidinin dayanıklılığının kırıldığı görülmüş ve *Pto* geni ile sağlanan kontrol kısa sürmüştür. Buonaudio ve ark, (1996)' na göre ıslahçılar yeni oluşan ırklara karşı bu çeşitlere yeni genler eklemelidirler. Stockinger ve Walling (1994) *Lycopersicum hirsutum* var. *glabratum* 'da Irk 0'ı kontrol eden *Pto* 3 ve Irk 1'i kontrol eden *Pto* 4 genlerini izole etmişlerdir. Bu majör dayanıklı genlerin tek başına veya minör dayanıklı genler ile kombinasyon halinde domates çeşitlerine aktarılabilmesi bu hastalığın kontrolünde gelecekte başarı sağlayabilecektir.

### **4.3. PST' nin İnfekteli Bitki Artıkları, İnokule Edilmiş Toprak ve Tohumda Yaşam Süresinin Belirlenmesi**

Bir bölge izolatu (A3f Rif+) 100 mg/l rifampicin antibiyotiğe dayanıklılık kazandırılmış ve denemelerde kullanılmıştır.

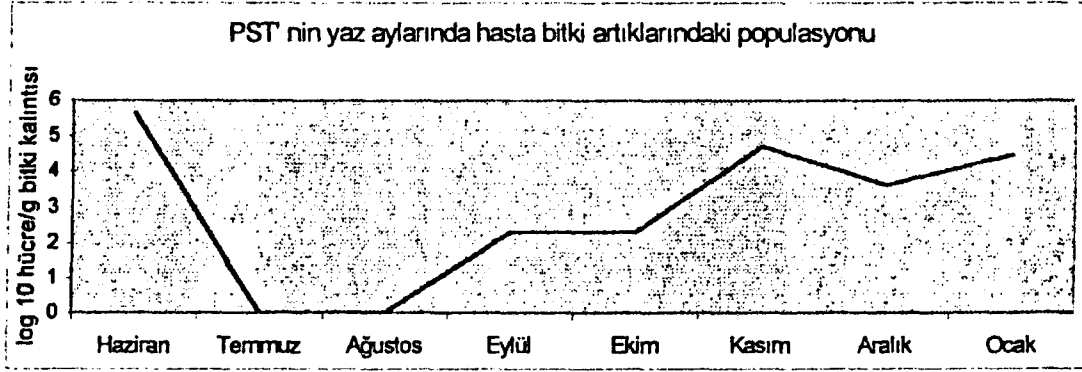
#### **4.3.1. PST' nin İnfekteli Bitki Artıklarında Yaşam Süresinin Belirlenmesi**

(1).PST 'nin Yaz Mevsiminde İnfekteli Bitki Artıklarında Yaşam Süresinin Belirlenmesi : Çizelge 4.4 ve Şekil 4.9'de görüldüğü gibi 1 ve 2 ay sonra yapılan izolasyonlarda hiç bakteri izole edilememiştir. 3. ve 4. ayda yapılan incelemelerde inokulum yoğunluğunun 1 g kuru ağırlığındaki bitki artığında  $2 \times 10^2$  hücreye yükseldiği belirlenmiştir. 5, 6 ve 7 ay sonra yapılan izolasyonlarda bitki artıklarında 100 mg rifampicine dayanıklı PST izolatu olan A3c Rif+'ın popülasyonunda artış olduğu dikkati çekmektedir. İlk iki ayda etmenin belirlenememe nedeninin iklim (sıcaklık ve nem) ile ilişkili olduğu düşünülmüştür. Bu durum yaz aylarında günlük ortalama sıcaklığın 35-40°C, 10 cm'deki toprak sıcaklığının 30-34°C' yi bulduğu Çukurova Bölgesi koşullarında (Aysan ve ark, 1997) PST popülasyonunun azalmış ve izole edilebilecek yoğunluğun altında kalmış olabileceğini, klasik petri teknikleriyle patojenin elde edilemediği düşüncesini akla getirmektedir. Jones ve ark, (1981)'na göre bilinen petri teknikleri bitki patojenlerin düşük popülasyonunu elde edebilmek için başarılı olmayabilir. Bölgemiz koşullarında havaların serinlemeye ve sonbahar yağmurlarının başlaması ile birlikte popülasyonda artış olduğu kaydedilmiştir. Bu bulgularımız Yunis ve ark, (1980) ve Jardine ve ark, (1988) ile uyum içindedir. Diğer bakteriyel patojenlerde olduğu gibi PST de aşırı sıcak ve soğuk iklim koşullarında metabolizmasını yavaşlatabilir, uygun iklim koşullarında tekrar mikrobiyal aktivitesini artırarak popülasyonunu yükseltebilir.

Çizelge 4.4. PST'nin yaz aylarında hasta bitki artıklarındaki populasyonu  
(hücre/g bitki artığı)

| Aylar   | Gün | Populasyon        |
|---------|-----|-------------------|
| Haziran | 0   | $4.5 \times 10^5$ |
| Temmuz  | 30  | 0                 |
| Ağustos | 60  | 0                 |
| Eylül   | 90  | $2.0 \times 10^2$ |
| Ekim    | 120 | $2.0 \times 10^2$ |
| Kasım   | 150 | $5.2 \times 10^4$ |
| Aralık  | 180 | $4.0 \times 10^3$ |
| Ocak    | 210 | $3.0 \times 10^4$ |

Plastik örtü altında Mart-Haziran ayları arasında önceden domates üretiminin yapıldığı parsele Şubat ayında domates tohumu ekilmiştir. Mart ayında fidelerin kotiledon yaprakları incelendiğinde toplam 812 fidenin 65'inde kotiledon yapraklarında lekeler saptanmıştır (Şekil 4. 10). Bu durum bitkilerin % 8' inde hastalık oluştuğunu göstermektedir. Bu lezyonlardan yapılan izolasyonlarda elde edilen bakterinin 100 mg rifampicine dayanıklı PST olduğu görülmüştür. Kontrol parselde hastalığa rastlanılmamıştır. Domates tohumları yapay infekteli bitki artıkları karıştırılmış toprağa ekildiğinde fidelerde hastalığın ortaya çıkışı etmenin yaz ayları boyunca toprakta infekteli bitki artıklarında yaşamını sürdürdüğünü bir kere daha kanıtlamaktadır. Okon ve ark, (1978) infekteli toprağa yüzey sterilizasyonu yapılan tohumlar ekildiğinde uygun iklim koşullarında bitkilerde PST smptomlarının görüldüğünü bildirmişlerdir. Infekteli fidelerden yaptığımız izolasyonlarda elde edilen bakterinin rifampicine dayanıklı olduğunun belirlenmesi bu etmenin deneme alanına her hangi bir şekilde bulaşmadığını bizim bulaştırdığımız izolatin yazı hasta bitki artıkları üzerinde geçirdiğini kanıtlamaktadır.



Şekil 4.9. PST'nin yaz aylarında hasta bitki artıklarındaki populasyonu  
(log hücre/g bitki artığı)



Şekil 4.10. Topraktaki PST inokulumunun fide kotiledon yapraklarında oluşturduğu lezyonlar

(2).PST 'nin Kış Mevsiminde İnfekteli Bitki Artıklarında Yaşam Süresinin Belirlenmesi : Çizelge 4.5 ve Şekil 4.11’de görüldüğü gibi yazın tarla domatesi üretilen kışın boş olan toprağa torbalar içerisinde gömülen bitki artıklarından aylık yapılan izolasyonlarda PST’nin bir sonraki yetiştirme mevsimine kadar canlı kaldığı saptanmıştır. Populasyon yoğunluğunda kış boyunca dalgalanmalar olmuş fakat populasyon hiç bir zaman sıfırlanmamıştır. Kış aylarında yağmur ve sıcaklık PST gelişimi için uygun geçtiğinden etmen hasta bitki artıklarından her ay izole edilmiştir. Özellikle yazlık domates dikiminin yapıldığı Mart ayı populasyonu, başlangıç populasyonunun uygulandığı Eylül ayı dışında en yüksek düzeye ulaşmıştır. Bu sonuçlara göre PST infekteli bitki artıklarında yaşamını devam ettirerek bir sonraki vejetasyon döneminde yeni fideleri infekte etme yeteneğine sahiptir.

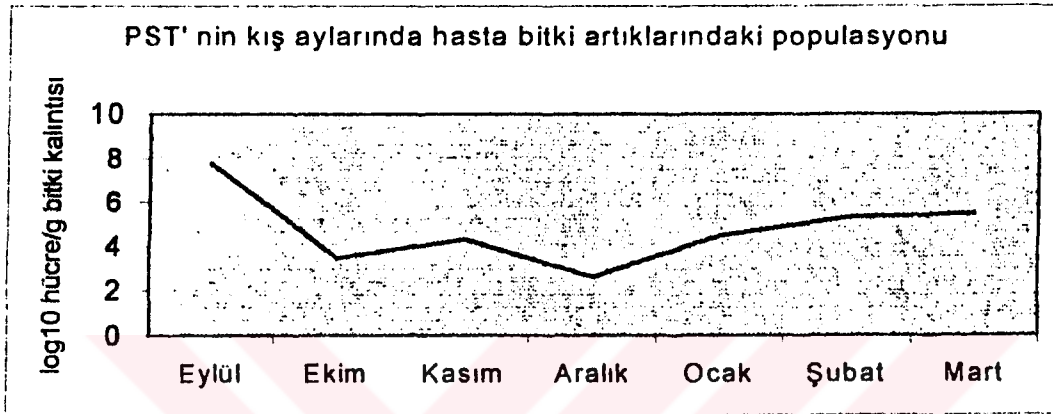
Çizelge 4.5. PST’nin kış aylarında hasta bitki artıklarındaki populasyonu  
(hücre/g bitki artığı)

| Aylar  | Gün | Populasyon        |
|--------|-----|-------------------|
| Eylül  | 0   | $6.0 \times 10^7$ |
| Ekim   | 30  | $2.8 \times 10^3$ |
| Kasım  | 60  | $2.0 \times 10^4$ |
| Aralık | 90  | $4.0 \times 10^2$ |
| Ocak   | 120 | $3.0 \times 10^4$ |
| Şubat  | 150 | $2.0 \times 10^5$ |
| Mart   | 180 | $3.0 \times 10^5$ |

Yazlık domates üretimini yapıldığı bir önceki vejetasyon mevsimi sonunda infekteli bitki artıkları ile bulaştırılan toprağa Mart ayında temiz fideler dikilmiştir. Haftalık yapılan incelemelerde 3 hafta sonra (20. gün) 60 domates bitkisinin 4 tanesinde tipik yaprak belirtileri ve çiçek çanak yapraklarında lekeler görülmüştür (Şekil 4.12) diğer bir ifade ile bitkilerin % 6.6’ında hastalık ortaya çıkmıştır. Ancak havaların ısınmasıyla birlikte tarlada hastalığın ilerlemediği, hasta yaprakların 1.5 ay sonra kuruyup döküldüğü gözlenmiştir. Kontrol parselde ise

hastalık gözlenmemiştir.

Bulaşık alana temiz tohum ekimi veya temiz fide dikimi yapılan alanlarda da gelişen bitkilerde hastalık belirtileri saptanmamıştır.



Şekil 4.11. PST'nin kış aylarında hasta bitki artıklarındaki popülasyonu  
(log hücre/g bitki artığı)



Şekil 4.12. Topraktaki PST inokulumunun domates yaprak ve çiçek çanak  
yapraklarında oluşturduğu lekeler

#### 4.3.2. PST'nin İnokule Edilmiş Toprakta Yaşam Süresinin Belirlenmesi

Haziran 1996 tarihinde  $8.6 \times 10^7$  hücre yoğunluğu ile inokulasyondan 7, 14, 21, 30, 45, 60, 90 ve 120 gün sonra yapılan toprak izolasyonlarının hiç birinde PST izole edilememiştir. Kasım 1996 tarihinde 2. kez  $9 \times 10^5$  hücre yoğunluğu ile inokule edilen topraktan yapılan incelemelerde de aynı sonuç elde edilmiştir.

Yapay olarak bulaştırılmış toprakta Çukurova bölgesi koşullarında PST'nin yaşamını sürdüremediği bu çalışma ile saptanmıştır. Bu etmenin topraktaki yaşamı için toprak pH'sı son derece önemlidir. Özellikle asit karakterli topraklarda etmen çok kısa süre yaşamını devam ettirir. En iyi gelişmenin nötr veya hafif alkali topraklarda olduğu Saygılı ve ark, (1985) tarafından bildirilmiştir. Bu araştırmacılar yaptıkları çalışmalarında hafif alkali toprakta etmenin 1-14 gün, asit karakterli toprakta 1 gün yaşayabildiğini kanıtlamışlardır. Bosshard-Herr ve Vogelsanger (1977) toprak pH'sının 5 olduğu durumda PST'nin 1 gün 7.5 olduğunda 26 gün yaşadığını saptamışlardır. Ancak pH'sı 7.57 olan killi yapıdaki topraktan PST'nin izole edilememesi toprak pH'sı kadar toprak sıcaklığı ve nemi gibi toprak faktörleri, bölgenin iklim koşulları ve toprak işleme teknikleri PST'nin yaşamında etkili olduğundan (McCarter ve ark., 1983, Jardine ve ark., 1988) yapılan çalışmalarda farklı sonuçlar elde edilmiştir.

#### 4.3.3. PST'nin İnokuleli Tohumlarda Yaşam Süresinin Belirlenmesi

Tohum inokulasyonundan sonra tesadüf olarak seçilen 100 adet tohumun hepsinin PST ile bulaştırıldığı saptanmıştır İlk 5 ayda 100 tohumun tümünde patojen saptanırken bu oran 6., 7. ve 8. aylarda %80'e 9. ve 10. ayda %75'e 11. ve 12. ayda %70'e düşmüştür. Ayrıca PBS içinde tohumların çalkalanması sonucu elde edilen pelet sulandırılarak domates yapraklarına püskürtüldüğünde 12 ay boyunca tipik yaprak simptomlarının olduğu gözlenmiştir. Böylece bir yıl boyunca yapılan izolasyonlarda tohumlarda PST'nin canlı kaldığı tespit edilmiştir.

PST'nin inokuleli tohumlarda yaşamının araştırıldığı çalışmada etmen bir yıl boyunca tohum üzerinde canlı kalmıştır. Bashan ve ark, (1982) kuru tohumlar üzerinde PST'nin 20 yıldan fazla yaşadığını belirlemişlerdir. İnfekteli tohumlardan

yetişen fideler temiz alanlarda kullanıldıklarında hastalık kolayca yayılabilmekte ve o alanı bulaştırabilmektedir. Bu etmen bir alana bir kez giriş yaptığında hızlı bir şekilde yayılır ve hastalık yerleştiğinde de kontrolü zordur (Jardine ve ark, 1988). PST her zaman fidelerde simptom oluşturmaz. Yeterli nemi ve sıcaklığı bulamadığı durumlarda fidelerde epifitik olarak yaşamını devam ettirerek uygun iklim koşullarda epidemi oluşturur (McCarter ve ark, 1983). Bu hastalığın ülkemize ilk defa infekteli üretim materyali ile girdiğini var sayarsak bitki artıklarında yaşamını bir sonraki mevsime kadar sürdürdüğünü yaptığımız bu çalışma ile tespit etmiş bulunmaktayız. Üreticilerimizin her yıl aynı ürünü yetiştirme alışkanlıkları ve yanlış kültürel uygulamalar nedeniyle hemen hemen her yıl bölgemiz seralarında bu hastalığın nasıl ortaya çıktığı açıklanabilir. Bunların dışında PST konukçusu olmayan bitkilerde ve yabancı otlarda da epifitik olarak yaşayabilmektedir (Smitley ve McCarter, 1982).

#### 4.4. Ticari Domates Tohumlarında PST'nin Saptanması

Çeşitli antibiyotiklerle zenginleştirilmiş yarı seçici besi yerine ekim, IFAS, domateste patojenite ve bu tohumlardan gelişen fidelerin simtomolojik olarak incelenmesi temeline dayanan testlerin kombinasyonu ile ülkemizde kullanılan 47 farklı domates çeşidinde PST aranmıştır. IFAS testinde kullanılan PST antiseriminun titri 1/1600 olarak belirlenmiştir.

Ülkemizde kullanılan 47 domates çeşidinin IFAS testi ile testlenmesi sonucunda 9 domates çeşidi pozitif sonuç vermiştir. Ancak PBS içinde 18 saat çalkalanan tohumlardan elde edilen pelet seyreltilerek penicilin ve cycloheximide içeren KB besi yerine ekildiğinde IFAS testinde pozitif sonuç veren 9 örnekten sadece 1 tanesi bu ortamda floresan gelişme göstermiştir. Diğer örneklerden elde edilen pelet ortama yayıldığında ortam üzerinde gelişme olmamıştır. Floresan gelişme gösteren örnekteki bakteri kolonileriyle yapılan domateste patojenite ve IFAS testleri de pozitif sonuç vermiştir. Bu domates çeşidinden 100 adet tohum steril toprak içeren saksılara ekildiğinde yapılan gözlemlerde kotiledon yapraklarında hiçbir simptome rastlanılmamıştır. McCarter ve ark, (1983) steril

toprak içeren saksılara 100' er adet tohum ektiklerinde çıkıştan 7 gün sonra bazı tohum partisinden gelişen fidelerin kotiledonlarında ve ilk gerçek yapraklarda PST simptomlarını gözlemişlerdir. Yüksek nem sağlamak amacıyla bitkiler polietilen torba ile kaplandığında simptomların oluştuğunu bildirmişler ve nemin önemini vurgulamışlardır. Bizim çalışmamızda PST ile bulaşık olduğu petri denemeleri ve IFAS testi ile kanıtlanan tohum çeşidinin fidelerinde hiçbir simptomun ortaya çıkmaması yeterli nemin sağlanamaması veya inokulum miktarının bu yöntemle belirlenecek düzeyin altında olabileceği düşüncelerini aklımıza getirmektedir. Tohumdaki inokulum yoğunluğunun düşük oluşu nedeni ile kotiledon yapraklarda simptom oluşmamış olabilir.

Bu çalışma sonucuna göre 47 farklı tohum örneğinden sadece 1 tohum çeşidinin PST ile bulaşık olduğu saptanmıştır. Bu çeşit standart bir çeşittir ve üretici bir yıl sonra kullanmak üzere tohumu kendisi elde etmiştir. Büyük olasılıkla, hastalıklı meyvelerden tohum çıkarımı esnasında etmen tohuma bulaşmıştır.

Bu çalışma esnasında karşımıza çıkan sorunlardan biri yurt dışından gelen hibrit çeşitlerin tohumlarının ilaçlarla kaplı olmasıdır. 18 saat süresince yapılan çalkalama sonunda ilaç ve boya maddeleri bu sıvı içerisine geçmiştir. Elde edilen pelet bu madde ile kaplanmıştır. IF mikroskobu incelemelerinde mikroskop alanı bu boyar maddelerden dolayı tam olarak incelenememiştir.

Tohumlardaki patojen bakterilerin saptanması amacıyla kullanılan yöntemlerin fazla teknik bilgiye ihtiyaç duyulmayan kolay, daha az laboratuvar aletlerine ihtiyaç duyulan ucuz, güvenilir, az miktardaki inokulum düzeyini tespit edebilecek duyarlılıkta ve kısa sürede sonuç veren yöntemler olması her zaman tercih edilir (Bashan ve Assouline, 1983, Schaad, 1982). Bu amaçla petri testleri varsa seçici besi yeri ve serolojik yöntemler (özellikle IFAS) ile birlikte kullanılır (Scortichini, 1990). PST için geliştirilmiş bir seçici besi yerinin olmamasından dolayı çalışmada penicilin ve cycloheximide ile zenginleştirilmiş KB besi yeri kullanımıyla gram pozitif bakterilerin ve fungusların gelişimi engellenmiştir. IFAS testinde ölü hücrelerin de pozitif sonuç vermesi, PST' ye yakın akraba *Pseudomonas* türleri veya *P. syringae* patovarylarının cross reaksiyon oluşturabilme

olasılıkları göz önüne alındığında serolojik yöntemlerin petri teknikleri ile kombinasyon halinde kullanımı zorunlu olmaktadır. Böylece bakteri hücrelerinin canlılığı belirlenebilmektedir. Petride gelişen bakteriler ile yapılan patojenite testleri de patojenin varlığını daha kesin olarak ortaya koymaktadır. Çalışmamızda da 8 örnek bu şekilde yanlış pozitif sonuç vermiştir. Bu örneklerden elde edilen pelet besi yerine yayıldığında hiçbir bakteri gelişiminin olmaması yanlış pozitif reaksiyonu doğrulamaktadır.

Çeşitli antibiyotiklerle zenginleştirilmiş yarı seçici ortama ekim, IFAS, domateste patojenite ve bu tohumlardan gelişen fidelerin simtomolojik olarak incelenmesi temeline dayanan testlerin kombinasyonu olan yöntemimizde tohumlardan gelişen fidelerin simtomolojik olarak incelenmesi 1-2 haftalık gibi uzun bir süreye ihtiyaç duymaktadır. Ayrıca IFAS testinde canlı olmayan PST hücreleri de pozitif sonuç oluşturmaktadır. Bulaşıklıktan kesin emin olmak için IFAS testinin petri teknikleri ile desteklenmesi yararlı olacaktır. IFAS testi 4.4.1.'de anlatıldığı gibi bir gram tohumdaki  $2 \times 10^3$  PST hücrelerini tespit edecek duyarlılıktadır. İnokulum miktarı olarak  $2 \times 10^3$  hücre/g tohum veya daha yüksek konsantrasyonla bulaşık tohumlarda bu yöntem kullanılarak PST kolayca tespit edilebilir. Ancak daha düşük bakteri inokulumu ile bulaşık tohumlarda etmenin saptanması için daha duyarlı yöntemlere ihtiyaç vardır.

#### **4.4.1. Yapay Olarak Bulaştırılmış Domates Tohumlarında PST'nin Aranması**

Spektrofotometrede A660 :1.5 olarak ölçülen PST süspansiyonunun ml'de  $2.0 \times 10^9$  hücre yoğunluğuna sahip olduğu saptanmıştır.  $2.0 \times 10^8$ ,  $2.0 \times 10^6$ ,  $2.0 \times 10^4$  ve  $2.0 \times 10^3$  inokulum yoğunluğu ile bulaştırılan tohumlardan yapılan incelemelerde IFAS testinin  $2.0 \times 10^3$  hücre/ml konsantrasyonla inokule edilen tohumlardan PST hücrelerini tespit edebilecek duyarlılıkta olduğu saptanmıştır. Farklı inokulum yoğunlukları ile inokule edilen domates tohumlarından gelişen fideler hastalık gelişimi yönünden incelendiğinde Çizelge 4.6'da verilen sonuçlar elde edilmiştir.

$2.0 \times 10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^6$  ve  $10^8$  hücre/ml PST süspansiyonu ile bulaştırılan tohumlardan gelişen fidelerde hasta bitki oranı sırasıyla 3.00, 6.22, 15.00 ve 15.42 olarak saptanırken hastalık şiddeti %'si sırasıyla 77.66, 75.66, 83.33 ve 86.00 olarak saptanmıştır. Fide kotiledon yapraklarında oluşan lekeler Şekil 4.13'da görülmektedir.

Çizelge 4.6. Farklı PST inokulum yoğunlukları ile bulaştırılan domates tohumlarından yetişen fidelerde hastalık gelişimi

| İnokulum<br>Miktarı<br>(hücre/ml) | Toplam<br>Fide<br>Sayısı | Hasta<br>Fide<br>Sayısı | Toplam<br>Leke<br>Sayısı | Hastalık<br>Şiddeti<br>%'si | Hasta<br>bitki<br>oranı (%) |
|-----------------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| $2.0 \times 10^3$                 | 100                      | 3                       | 5                        | 77.66                       | 3.00                        |
| $2.0 \times 10^4$                 | 423                      | 68                      | 155                      | 75.66                       | 6.22                        |
| $2.0 \times 10^6$                 | 80                       | 12                      | 30                       | 83.33                       | 15.00                       |
| $2.0 \times 10^8$                 | 188                      | 29                      | 75                       | 86.00                       | 15.42                       |



Şekil 4.13. PST ile bulaştırılan tohumlardan gelişen fidelerde ortaya çıkan belirtiler

#### 4.5. PST' ye Karşı Fiziksel, Kimyasal ve Biyolojik Kontrol Yöntemleri Üzerine Çalışmalar

##### 4.5.1. Tohum Uygulamaları

100 mg/ml rifampicine dayanıklı PST' izolatının  $2.10^9$  hücre/ml süspansiyonu ile inokule edilen tohumlar. KB besi yerine ekildiğinde tohumların %96.88'inin PST ile bulaştırılmış olduğu saptanmıştır.

Domates tohumlarındaki PST' yi elemine edebilmek amacıyla yapılan çeşitli tohum uygulamaları petri denemelerinde % 73-100 arasında etkili olmuştur. Çizelge 4.7'de görüldüğü gibi tohumdaki PST' yi elemine etmek için 5, 10, 15 ve 30 dakika 100 ppm. streptomisin, 3 dakika % 0.2' lik bakır asetat (Şekil 4.14), 3 dakika % 0.5 ve 1' lik 8-hydroxyquinoline, 30 dakika 55°C' deki sıcak su uygulamalarında %100 başarı elde edilmiştir. Diğer uygulamalar etki sırasına göre sıralandığında 50 ppm dozundaki streptomisine 10 dakika, 0.6 M HCl'e 60 dakika, 55°C' deki sıcak suya 20 dakika, 0.6 M HCl'e 30 dakika, 50°C' deki sıcak suya 30 ve 20 dakika , %1 NaOCl'ye 5, 4, 3 dakika daldırma ve bronopol (Bronotak, Agrevo) ile kuru ilaçlama şeklinde yapılan uygulamalar farklı düzeylerde tohumdaki PST' yi elemine etmişlerdir. Çizelge 4.7' de görüldüğü gibi yapılan istatistik değerlendirmelere göre (% 5 önem düzeyinde) aynı grup içerisinde yer alan uygulamalar aynı harflerle ifade edilmiştir.

Çizelge 4.8'de görüldüğü gibi uygulamalar tohumların çimlenmesini engellememiştir. Petride yapılan çimlenme testinde tohumlar % 90-100 oranında çimlenmişlerdir. Petride en düşük çimlenme %'si 5 dakika NaOCl (%1) uygulamasında olmuştur. NaOCl uygulamalarının tohum ömrünü kısalttığından aynı mevsim içerisinde kullanılmalarının gerektiği de bildirilmiştir (Goode ve Sasser, 1980). Petride çimlenme testinde PST ile infekteli tohumdan gelişen fidelerin (Şekil 4.15) kotiledonlarında hastalık belirtilerinin varlığı tespit edilmiştir.

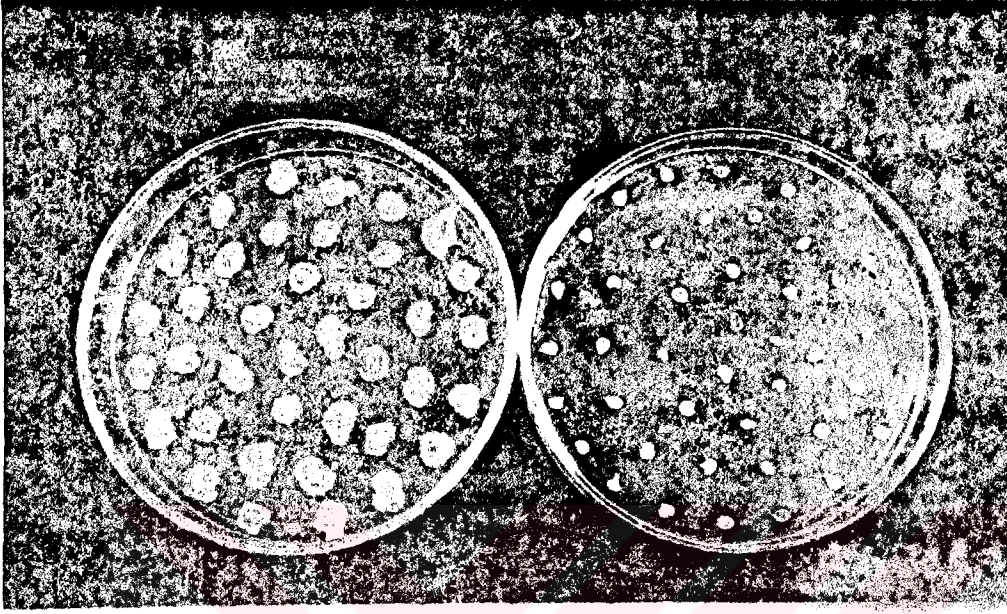
Çizelge 4.7. Çeşitli tohum uygulamalarının PST' ye olan etkisi

| Tohum Uygulamaları       | Süre<br>(Dakika) | Bulaşık Tohum<br>(%) | Etki (%) |
|--------------------------|------------------|----------------------|----------|
| Kontrol (PST)            |                  | 96.88                | -        |
| Streptomisin(50ppm)      | 10               | 1.00                 | 98.96 b  |
| Streptomisin(100ppm)     | 5                | 0.00                 | 100.00 a |
| Streptomisin(100ppm)     | 10               | 0.00                 | 100.00 a |
| Streptomisin(100ppm)     | 15               | 0.00                 | 100.00 a |
| Streptomisin(100ppm)     | 30               | 0.00                 | 100.00 a |
| Bakır asetat             | 3                | 0.00                 | 100.00 a |
| 8-hydroxyquinoline(%0.5) | 3                | 0.00                 | 100.00 a |
| 8-hydroxyquinoline(%1.0) | 3                | 0.00                 | 100.00 a |
| 55°C Sıcak Su            | 20               | 1.53                 | 98.42 c  |
| 55°C Sıcak Su            | 30               | 0.00                 | 100.00 a |
| 50°C Sıcak Su            | 20               | 11.53                | 88.09 f  |
| 50°C Sıcak Su            | 30               | 10.00                | 89.67 e  |
| HCl (0.6 M)              | 30               | 3.85                 | 96.02 d  |
| HCl (0.6 M)              | 60               | 1.54                 | 98.51 c  |
| NaOCl (%1)               | 3                | 26.15                | 73.00 j  |
| NaOCl (%1)               | 4                | 23.85                | 75.38 i  |
| NaOCl (%1)               | 5                | 19.23                | 80.15 g  |
| Bronopol                 |                  | 20.78                | 78.55 h  |

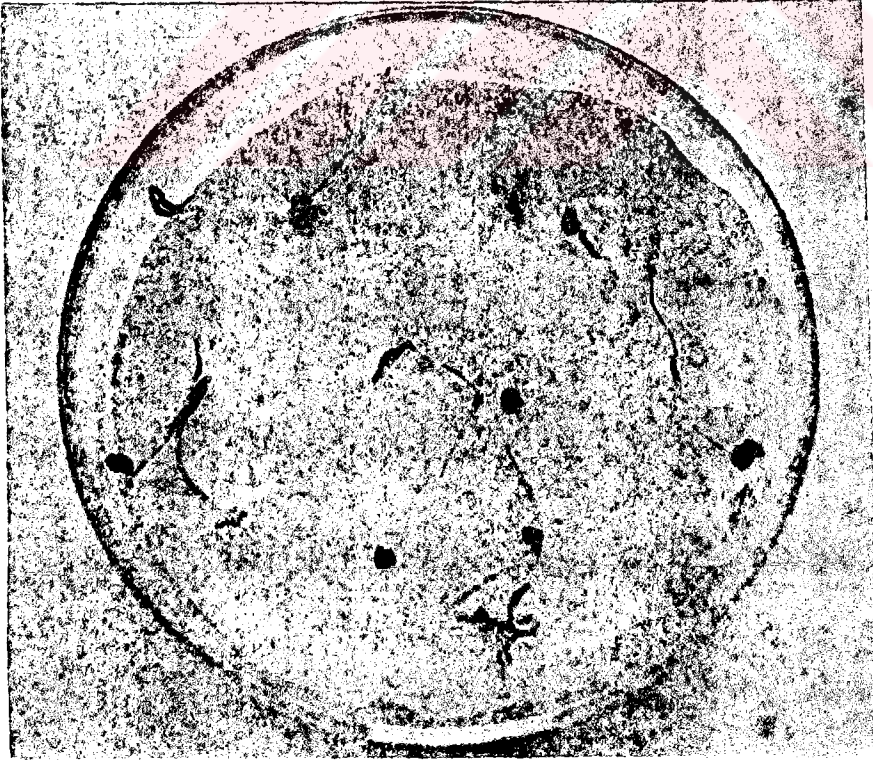
Çizelge 4.8. Çeşitli tohum uygulamalarının tohum çimlenmesine etkisi

| Tohum Uygulamaları       | Süre<br>(Dakika) | Petride<br>Çimlenme %'si |
|--------------------------|------------------|--------------------------|
| Kontrol (PST)            |                  | 92.85                    |
| Streptomisin(100ppm)     | 5                | 100.00                   |
| Streptomisin(100ppm)     | 10               | 97.50                    |
| Streptomisin(100ppm)     | 15               | 95.71                    |
| Streptomisin(100ppm)     | 30               | 94.28                    |
| Bakır asetat             | 3                | 97.50                    |
| 8-hydroxyquinoline(%0.5) | 3                | 100.00                   |
| 8-hydroxyquinoline(%1.0) | 3                | 100.00                   |
| 55°C Sıcak Su            | 30               | 94.28                    |
| Streptomisin(50ppm)      | 10               | 100.00                   |
| HCl (0.6 M)              | 60               | 97.14                    |
| 55°C Sıcak Su            | 20               | 98.57                    |
| HCl (0.6 M)              | 30               | 92.85                    |
| 50°C Sıcak Su            | 30               | 92.85                    |
| 50°C Sıcak Su            | 20               | 95.71                    |
| NaOCl (%1)               | 5                | 90.00                    |
| Bronopol                 |                  | 92.85                    |
| NaOCl (%1)               | 4                | 95.71                    |
| NaOCl (%1)               | 3                | 98.58                    |

Uygulamaların etkinliği ve çimlenme %'leri dikkate alındığında domates bakteriyel kara leke hastalığına karşı tohum ilaçlaması olarak 8-hydroxyquinoline, streptomisin (100 ppm) ve bakır asetat önerile bilinir. Antibiyotiklere karşı bakterilerin bir süre sonra dayanıklılık kazanabilmeleri göz önüne alındığında bakır asetat ve Bronopol'un diğer preparatlara göre ekonomik olmaları nedeniyle öncelik alması önerilmektedir.



şekil 4.14. Bakır asetat uygulaması görmüş domates tohumları



şekil 4.15. Petride çimlenme testinde PST ile infekteli tohumdan gelişen fidedeki simptom

#### 4.5.2. Biyolojik Kontrol Çalışmaları

##### 4.5.2.1. Aday Antagonistlerin İzolasyonu

Biyolojik kontrol çalışmalarında kullanılmak üzere domates üretiminin yapıldığı yerlerden alınan toprak ve bitki örneklerinden toplam 538 adet aday antagonist izole edilmiştir. 373 tanesi floresan, 95'i beyaz, 18'i sarı, 7'si turuncu olmak üzere toplam 493 adet bakteri, 35 aktinomycetes ve 10 Bacillus saflaştırılmıştır.

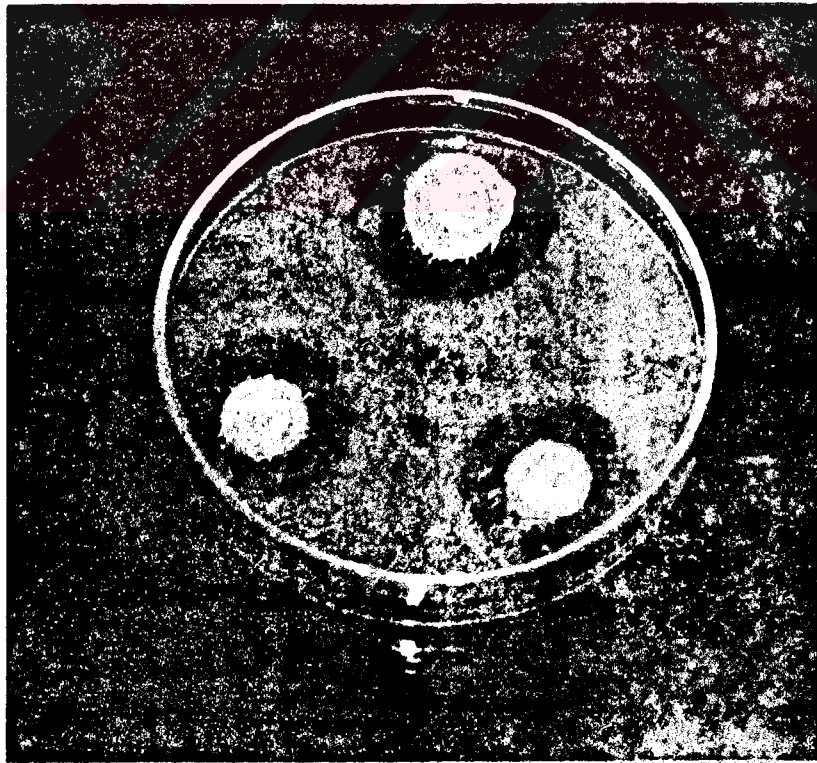
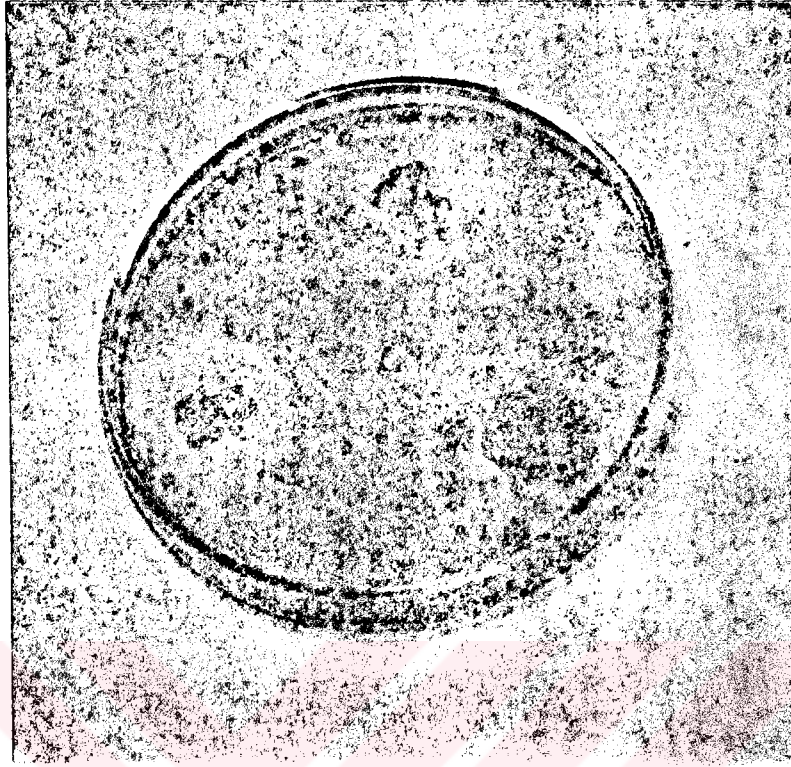
##### 4.5.2.2. Aday Antagonistlerin PST' ye Karşı Antagonistik Etkilerinin

###### *In vitro*'da Testlenmesi

İzole edilen aday antagonist izolatların PST' ye karşı antagonistik davranışların ilk elemesi KB besi yerinde yapılmıştır. İzolatlar bu besi yerinde üç nokta şeklinde 48 saat geliştirildikten sonra PST süspansiyonunun bu ortama püskürtülmesi sonucu oluşan inhibisyon zonlarının varlığı saptanmıştır. Sobiczewski (1987)' nin bildirdiğine göre Vidaver ve ark, (1972) kültürün yaşının biyolojik kontrol çalışmalarında sonucu etkileyebileceğini rapor etmiştir. Bu nedenle antagonistik etkisi testlenen izolatların yaşının 48 saatlik olmasına özen gösterilmiştir. 538 adet aday antagonistin 137 tanesi *in vitro* denemelerde 0.2-1.0 cm arasında değişen inhibisyon zonları oluşturmuştur (Şekil 4.16). Testlenen aday antagonistin antibakteriyel aktivitesine, kullanılan konsantrasyona ve ortamın sıcaklığına bağlı olarak patojenin engellenme miktarının değişebildiği bilinmektedir (Shirata ve ark, 1983. Sobiczewski, 1987'den). *In vitro* çalışmalarında etkili bulunan 137 adet izolatın aynı anda saksı çalışmalarında testlenmesinin çok uzun zaman alması ve zor olması nedeni ile 0.2-1.0 cm inhibisyon zonları oluşturan antagonistler arasından seçim yapılmıştır. *In vitro* ve *in vivo* test sonuçları arasındaki uyumsuzluk olasılıkları da göz önüne alınarak 0.2, 0.3 ve 0.4 cm inhibisyon zonuna sahip izolatlardan üçer adet, 0.5 cm inhibisyon zonuna sahip izolatlardan ikişer adet, 0.6 cm inhibisyon zonuna sahip izolatlardan dört adet, 0.7 cm inhibisyon zonuna sahip izolatlardan birer adet ve 1.0 cm inhibisyon zonuna

sahip izolatlardan ikişer adet olmak üzere toplam 18 adet antagonist izolat *in vivo* çalışmaları için seçilmiştir. Bu antagonistlerin koloni renkleri ve PST' ye karşı petride oluşturdıkları inhibisyon zonları cm olarak Çizelge 4.9'da verilmiştir. Yeşil aksamdaki PST' ye antagonistlerin etkisi belirlenirken İsrail'den getirilen fungal ve bakteriyel hastalıklar üzerine antagonistik etkisi saptanmış olan 3 bakteri ve 3 mayanın [P1(3), P1(4), G2, Mel16, Tal6, 6BA] *in vitro* deneme sonuçları da bu çizelgede gösterilmiştir.

Aday antagonistlerin PST' ye karşı etkisinin *in vitro* ' da testlenmesi sırasında son derece fazla miktarda zaman, kimyasal kaybı göz önüne alındığında testlerin daha kısa sürede daha az masraf ile yapılması zorunlu olmaktadır. Bu nedenle antagonist seçiminde *in vitro* çalışmaları atlayarak direk *in vivo* çalışmalara geçilmesi pek çok kazanç sağlamaktadır. Ayrıca bir çok durumda *in vitro* test sonuçlarıyla *in vivo* testlerden elde edilen sonuçlar birbiriyle uyumsuzluk göstermektedir. *In vitro* testleri sonucunda çok etkili bulunan güçlü inhibisyon zonları oluşturan bazı izolatlar *in vivo* çalışmalarında aynı olumlu sonucu vermedikleri pek çok araştırmacı tarafından rapor edilmiştir (Colin ve ark., 1987; Elad, 1990; Chard ve ark., 1992). Bu durumlar göz önüne alındığında antagonist seçiminde petri denemelerinin pek çok araştırmacı tarafından ikinci derecede önem teşkil ettiği görülmektedir (Elad, 1990). Bizim çalışmamızda 538 aday antagonistin *in vivo* çalışmalarda direk testlenmesinin çok zor olacağı düşünüldüğünden ilk elemeyi petri testleri ile yaptık. PST' ye karşı antagonistik elemenin yapılabileceği *Erwinia amylovora* ' da olduğu gibi yarı *in vivo* testler (Kerr ve ark, 1990) var olsaydı yada çok fazla sayıda izolat testlenmeyecek olsaydı direk *in vivo* denemelerinin yapılması yarar sağlayacaktı. Ayrıca bu testlerle izolatları karşılaştırma imkanı bularak farklı inhibisyon zonu oluşturan antagonistlerin seçimi yapılarak *in vivo* denemelere geçilmiştir.



Şekil 4.16. *In vitro* petri denemelerinde 4K3g ve MTD1 izolatlarının PST' ye karşı oluşturduğu inhibisyon zonu

Çizelge 4.9. *In vivo* çalışmalarda kullanılan antagonistlerin koloni renkleri ve PST' ye karşı petride oluşturdıkları inhibisyon zonları

| İzolat Adı | Tür     | Koloni Rengi | İnhibisyon zonu (cm) |
|------------|---------|--------------|----------------------|
| 2OK5a      | Bakteri | Krem         | 0.2                  |
| 4K1a       | Bakteri | Floresan     | 0.4                  |
| 4K1f       | Bakteri | Krem         | 0.6                  |
| 4K2b       | Bakteri | Krem         | 0.6                  |
| 4K2g       | Bakteri | Krem         | 0.7                  |
| 4K2h       | Bakteri | Krem         | 0.4                  |
| 4K2j       | Bakteri | Floresan     | 0.6                  |
| 4K3g       | Bakteri | Floresan     | 1.0                  |
| 4K4a       | Bakteri | Krem         | 0.3                  |
| 4K4b       | Bakteri | Krem         | 0.2                  |
| 4K4e       | Bakteri | Floresan     | 0.3                  |
| 4K4f       | Bakteri | Krem         | 0.3                  |
| 4K6h       | Bakteri | Krem         | 1.0                  |
| 5K2d       | Bakteri | Floresan     | 0.2                  |
| AS1a       | Bakteri | Krem         | 0.4                  |
| MTD1       | Bakteri | Krem         | 0.5                  |
| T6e        | Bakteri | Krem         | 0.5                  |
| 0-10 5c    | Bakteri | Krem         | 0.6                  |
| P1(3) *    | Bakteri | Krem         | 0.5                  |
| P1(4) *    | Bakteri | Krem         | 0.4                  |
| G2 *       | Bakteri | Krem         | 0.5                  |
| Mel 16 *   | Maya    | Beyaz        | 0.4                  |
| Tal 6 *    | Maya    | Beyaz        | 0.1                  |
| 6B*        | Maya    | Beyaz        | 0.3                  |

(\*: İsrail'den getirilen izolatlar)

#### 4.5.2.3. Antagonistlerin PST' ye Karşı Antagonistik Etkilerinin

##### *In vivo*'da Testlenmesi

#### 4.5.2.3.(1). Tohum Kökenli İnokuluma Antagonistlerin Etkisi

Çizelge 4.10'da görüldüğü gibi hasta tohumdan gelişen fidelerde hasta bitki oranı %10-67 arasında değişmiştir. Antagonistler hastalık oluşumunu %31-90 düzeyinde engellerken hastalık şiddetini % 5-84 düzeyinde engellemişlerdir. Bu sonuçlar doğrultusunda hastalık oluşumunu ve aynı zamanda hastalık şiddetini en fazla baskılayan 4K2b, 0-10 5c, 4K2h, 4K1f, MTD1 ve T6e izolatları en başarılı izolatlar olarak değerlendirilmiştir. Antagonistlerin tohuma kaplama olarak uygulanması antagonistin rizosferde kalıcı olmasını sağlamaktadır (Weller, 1984, Rovira ve ark. 1992'den).

Hastalık gelişimi için yeterli nemin oluşturulması amacıyla bitkiler nemli naylon torbalar ile kaplanmışlardır. Kotiledon yapraklarda ilk lekeler fide çıkışından 7 gün sonra olmuş fakat simptom gelişimi 3. haftanın sonuna kadar devam etmiştir. Bu nedenle son leke sayımı fide çıkışından 3 hafta sonra (tohum dikiminden bir ay sonra) yapılmıştır (Şekil 4.17). Okon ve ark, (1978) ile McCarter ve ark, (1983) tohumlardan gelişen fidelerin kotiledonlarında ve ilk gerçek yapraklarda PST simptomlarının ortaya çıkması için yüksek nem amacıyla bitkilerin nemli naylon torba ile kaplanması gerektiğini önemle vurgulamışlardır.



Şekil 4.17. PST ile bulaşık tohumlardan gelişen kontrol fidelerdeki lekeler

Çizelge 4.10. Aday antagonistların bulaşık tohumdan yetişen fidelerde hasta bitki oranı ve hastalık şiddeti %'sine etkisi

| İzolot adı | Hasta Bitki Oranı (%) | % Etki | Hastalık Şiddeti %'si | % Etki |
|------------|-----------------------|--------|-----------------------|--------|
| Kontrol    | 97                    | -      | 67.67                 | -      |
| 2OK5a      | 67                    | 31 a   | 64.11                 | 5 a    |
| 4K3g       | 60                    | 38 b   | 58.00                 | 14 b   |
| 4K2g       | 57                    | 41 c   | 55.00                 | 19 c   |
| 4K4f       | 47                    | 52 d   | 40.78                 | 53 h   |
| 4K2j       | 47                    | 52 d   | 39.22                 | 51 g   |
| 4K1a       | 40                    | 59 e   | 35.56                 | 40 d   |
| 4K4a       | 37                    | 62 f   | 35.56                 | 80 l   |
| 4K6h       | 33                    | 66 g   | 35.56                 | 47 f   |
| 4K4e       | 30                    | 69 h   | 33.22                 | 42 e   |
| 5K2d       | 27                    | 72 i   | 33.33                 | 47 f   |
| 4K4b       | 27                    | 72 i   | 31.78                 | 47 f   |
| AS1a       | 23                    | 76 j   | 25.89                 | 51 g   |
| 4K2b       | 23                    | 76 j   | 24.11                 | 65 j   |
| 0-10 5c    | 20                    | 79 k   | 14.78                 | 62 i   |
| 4K2h       | 10                    | 90 l   | 13.33                 | 84 m   |
| 4K1f       | 10                    | 90 l   | 11.11                 | 84 m   |
| MTD1       | 10                    | 90 l   | 11.11                 | 78 k   |
| T6c        | 10                    | 90 l   | 11.11                 | 84 m   |

#### 4.5.2.3.(2).Toprak Kökenli İnokuluma Antagonistlerin Etkisi

Çizelge 4.11' de görüldüğü gibi hastalık etmenleriyle bulaşık toprağa ekilen antagonist uygulaması görmüş tohumlardan gelişen fidelerde hastalıklı bitki oranı % 0-89 arasında değişmiştir. 2OK5a, 4K3g ve 4K1a izolatlarında hastalıklı bitki oranı kontrol (PST) uygulamasından daha fazla ortaya çıkarak en etkisiz izolatlar olarak değerlendirilmişlerdir.

Çizelgede görüldüğü gibi infekteli toprakta yetişen fidelerde hastalık şiddetine çeşitli antagonistlerin etkisi ise % 19-52 arasında değişmiştir. Hastalık şiddetini % 52 düzeyinde azaltan MTD1 izolatı en etkili izolat olarak değerlendirilmiştir. Çizelge incelendiğinde kontrol amacıyla PST ile bulaşık toprağa, hiçbir antagonist uygulaması yapılmayan tohum ekimi yapıldığında hastalık şiddeti %'sinin %46.67 olduğu görülmektedir. Bu değer oldukça düşüktür. Tohum kökenli inokuluma antagonistlerin etkisi testlenirken bu değer %67.67 olarak saptanmıştı. Tohumlar çimlenme esnasında infekteli bitki artıkları ile temas ettiğinde hastalık yeni fidelere geçmektedir. Kontrol saksılar dahil diğer saksılarda da tohum çimlenmesi sırasında tohum, hasta bitki artıklarıyla temas etmezse fidelerdeki hastalık oluşumu ve şiddetinin az olacağı düşüncesi aklımıza gelmektedir.

Bu sonuçlara göre sadece MTD1 izolatının toprak kökenli PST inokulumunu baskı altına almada hem hastalık oluşumunu hem de hastalık şiddetini azalttığı görülmektedir.

Bir çok araştırmada *in vitro* test sonuçlarıyla *in vivo* testlerden elde edilen sonuçların birbiriyle uyumsuzluk gösterdiği rapor edilmiştir (Colin ve ark., 1987; Elad, 1990; Chard ve ark., 1992). Bizim çalışmamızda da benzer bulgular elde edilmiştir. Çizelge 4.9'da görüldüğü gibi 4K6h izolatı petride 1.0 cm' lik inhibisyon zonu ile çok etkili izolatlar arasına girmektedir. Fakat bu izolat Çizelge 4.10' da görüleceği gibi PST' nin tohum kökenli inokulumunu baskı altına almada hastalık oluşumunu % 33 ve şiddetini % 47, Çizelge 4.11' de görüleceği gibi toprak kökenli inokulumunu baskı altına almada hastalık oluşumunu % 53 ve şiddetini % 19 düzeyinde engelleyerek başarısız izolatlar arasında yer almıştır. Büyük olasılıkla bu

izolat petride ürettiği antibiyotikle PST'nin gelişmesini engellerken saksıda ve yeşil aksamda aynı üretimi yapamamıştır. Bu izolat antibiyotik üretimi için gerekli besinleri petride bulurken toprakta aynı besinleri bulamamış olabilir. Yada antagonistin ürettiği antibiyotik toprağın kimyasal ortamında etkisini yitirmiş olabilir (Bora ve Özaktan, 1998).

Çizelge 4.11. Çeşitli antagonistlerin infekteli toprakta yetişen fidelerde hasta bitki oranı ve hastalık şiddeti %'sine etkisi

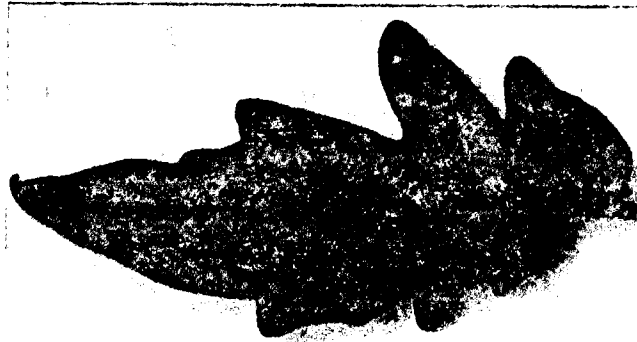
| İzolat Adı | Hasta Bitki Oranı (%) | % Etki | Hastalık Şiddeti %'si | % Etki |
|------------|-----------------------|--------|-----------------------|--------|
| Kontrol    | 63                    | -      | 1.40                  | -      |
| 2OK5a      | 73                    | -16 a  | 1.14                  | 19 a   |
| 4K3g       | 67                    | -6 b   | 1.05                  | 25 c   |
| 4K1a       | 67                    | -6 b   | 1.00                  | 29 d   |
| 4K2g       | 63                    | 0 c    | 1.06                  | 24 b   |
| 4K6h       | 53                    | 16 d   | 1.13                  | 19 a   |
| 4K4f       | 50                    | 21 e   | 1.00                  | 29 d   |
| 4K2j       | 50                    | 21 e   | 1.00                  | 29 d   |
| 4K4e       | 50                    | 21 e   | 1.00                  | 29 d   |
| 4K4a       | 50                    | 21 c   | 1.00                  | 29 d   |
| 4K4b       | 43                    | 32 f   | 1.00                  | 29 d   |
| 5K2d       | 33                    | 48 g   | 1.00                  | 29 d   |
| 4K2b       | 27                    | 57 h   | 1.00                  | 29 d   |
| AS1a       | 23                    | 63 ı   | 1.00                  | 29 d   |
| 0-10 5c    | 20                    | 68 j   | 1.00                  | 29 d   |
| 4K2h       | 17                    | 73 k   | 1.00                  | 29 d   |
| 4K1f       | 10                    | 84 l   | 1.00                  | 29 d   |
| T6e        | 10                    | 84 l   | 1.00                  | 29 d   |
| MTD1       | 7                     | 89 m   | 0.67                  | 52 e   |

#### 4.5.2.3.(3). Yeşil Aksamdaki İnokuluma Antagonistlerin Etkisi

PST'nin domates bitkilerinde simptom oluşturan en düşük inokulum yoğunluğu,  $8 \times 10^7$  hücre/ml (A660:0.06) olarak hazırlanan süspansiyonunun 1/100.000 oranında seyreltilmesi ( $8 \times 10^2$  hücre/ml) sonucu elde edilmiştir. İklim odası koşullarında bir haftalık inkübasyon sonunda bitkide oluşan ortalama leke sayısı Çizelge 4.12'de ve yapraktaki lekeler şekil 4.18'de verilmiştir tir.

Çizelge 4.12. Farklı PST yoğunluklarının domates yapraklarında oluşturdukları ortalama lezyon sayıları

| İnokulum Yoğunluğu | Bitkideki Ortalama Lezyon Sayısı |
|--------------------|----------------------------------|
| $8 \times 10^7$    | Çok yoğun sayılamadı             |
| $8 \times 10^6$    | Çok yoğun sayılamadı             |
| $8 \times 10^5$    | 250                              |
| $8 \times 10^4$    | 146                              |
| $8 \times 10^3$    | 89                               |
| $8 \times 10^2$    | 60                               |
| $8 \times 10^1$    | 18                               |
| 8                  | 0                                |



Şekil 4.18. A3f izolatının domates yaprağında oluşturduğu lekeler

Çizelge 4.13. Yeşil aksama inokule edilen PST'nin hastalık oluşturmada  
üzerine antagonistlerin etkisi

| İzolot Adı    | Lezyon Sayısı<br>Ortalaması | % Etki   |
|---------------|-----------------------------|----------|
| Kontrol (PST) | 59.67                       |          |
| T6e           | 57.00                       | 4.47 a   |
| 2OK5a         | 50.67                       | 15.09 b  |
| 4K1a          | 43.67                       | 26.82 c  |
| 6BA           | 33.53                       | 43.80 d  |
| 4K2j          | 32.33                       | 45.80 e  |
| Tal 6         | 21.43                       | 64.08 f  |
| 5K2d          | 18.00                       | 69.83 g  |
| Mel 16        | 15.53                       | 73.97 h  |
| 4K4a          | 14.67                       | 75.42 i  |
| AS1a          | 14.33                       | 75.98 j  |
| 4K2b          | 12.67                       | 78.77 k  |
| 4K6h          | 12.57                       | 78.93 k  |
| P1(3)         | 5.00                        | 91.62 l  |
| G2            | 3.33                        | 94.41 m  |
| 4K4e          | 3.17                        | 94.64 m  |
| 4K3g          | 2.33                        | 96.09 n  |
| 4K2h          | 2.33                        | 96.09 n  |
| P1(4)         | 1.67                        | 97.21 o  |
| 0-10 5c       | 1.00                        | 98.32 p  |
| 4K4b          | 0.67                        | 98.88 r  |
| MTD1          | 0.33                        | 99.44 s  |
| 4K1f          | 0.00                        | 100.00 t |

Son yıllarda kimyasallara karşı oluşan dayanıklılık sorunu ve biyolojik tarımın önem kazanması IPM programları içerisine biyolojik kontrolü alma zorunluğunu ortaya çıkarmıştır. Bu hedef doğrultusunda yeşil aksamdaki PST inokulumunun baskı altına alınması amacıyla yapılan çalışmada antagonist izolatların etkisi %4.47-100 arasında değişmiştir (Çizelge 4.13). %64'den fazla etkiye sahip bulunan izolatlar etkili antagonist olarak değerlendirilmiştir. Çalışma sonunda 17 antagonist etkili olarak saptanmıştır. 10 izolat %90'ın üzerinde etki oluştururken 1 izolat ise % 100 etkili bulunmuştur. %100'lük etkiye sahip olan 4K1f izolatı en başarılı antagonist olarak belirlenmiştir.

Yapılan denemelerde *in vitro* test sonuçlarıyla *in vivo* testlerden elde edilen sonuçların birbiriyle uyumsuzluk gösterdiğinden daha önce de bahsedilmişti. Her zaman petride etkili olup saksı çalışmalarında etkisiz olma uyumsuzluğu görülmez. Tal 6 izolatında saptandığı gibi tam tersi sonuçlar da elde etmek mümkündür. Çizelge 4.9'da görüldüğü gibi Tal 6 izolatı petride 0.1 cm'lik inhibisyon zonu ile etkisi çok zayıf bir izolat olarak görülmektedir. İsrail'den getirilen fungal ve bakteriyel hastalıklar üzerine antagonistik etkisinin olduğu bilinen bu izolat ile yeşil aksam çalışmalarında kullanıldığında olumlu sonuçlar elde edilmiştir. Bu izolat yeşil aksamdaki PST inokulumunu % 64.08 düzeyinde engellemeyi başarmıştır (Çizelge 4.13). Petri koşullarında patojen ürettiği metabolitlerle antagonistin gelişimini engellemiş fakat *in vivo* koşullarda bu durum olmadığından Tal 6 yeşil aksamda patojeni baskı altına almada başarılı olmuş olabilir (Bora ve Özaktan, 1998). Ayrıca potansiyel antagonistler besi yerindeki çok fazla besin ile yetinerek patojen ile rekabete girmeyebilir ve antagonistik etkisi maskelenebilir (Elad, 1990).

Çizelge 4.10' da görüleceği gibi 4K2b, 0-10 5c, 4K2h, 4K1f, MTD1 ve T6e izolatları tohum kökenli PST inokulumunu baskı altına almada hastalık oluşumu ve hastalık şiddetini azaltmayı başaran antagonistler olarak saptanmışlardır. Çizelge 4.13 incelendiğinde T6e hariç diğer 5 izolat aynı zamanda yeşil aksamdaki PST inokulumunu baskı altına almada yine etkili olmuşlardır. Bu çalışmada T6e isimli izolat % 4.47'lik etkiyle en etkisiz izolat olarak tespit edilirken tohum kökenli inokulumu baskı altına almada aynı izolat % 84' lik etkiyle en etkili izolatlar

arasına girmiştir (Çizelge 4.10). Bitki yüzeyi genellikle bir antagonist için uygun olmayan bir yaşam yeridir. Antagonist çevre koşullarından (yaprak eksudatları, pH, sıcaklık ve nem düzensizlikleri, osmotik basınç, atmosferik gazlar, ışık, radyasyon, rüzgar, hava kirliliği, gübreleme), kültürel pratiklerden ve kimyasal preparatlardan kolaylıkla etkilenebilir. Bu nedenlerden dolayı T6e izolatu toprakta iyi bir şekilde kolonize olurken yeşil aksamda çoğalıp patojeni baskı altına alamamış olabilir düşüncesi aklımıza gelmektedir. Genellikle yeşil aksam bitki hastalıklarının biyolojik kontrolü ile ilgili çalışmalar toprak kökenli patojenlerin biyolojik kontrolü ile karşılaştırıldığında oldukça azdır.

PST' ye karşı çeşitli mikroorganizmaların antagonistik etkileri testlenirken antagonistler yeşil aksamda testlenmelidir. Çünkü yapraktaki lekeler sayılarak sonuçlar daha görsel olarak görülmekte, simptom çıkışı için çeşitli iklim koşullarının aynı anda oluşmasına ihtiyaç duyulmamaktadır. Bundan öte PST bir yeşil aksam patojenidir ve esas zararını burada oluşturur. Sadece tohuma veya toprağa antagonist uygulaması yapmak kontrolde yeterli olmamaktadır. Antagonist toprak ve tohum kökenli inokulumu baskıarken yeşil aksama uygulandığında da etkili sonuçlar oluşturmalıdır. Wilson ve ark, (1996) da bizim bu düşüncelerimizi destekler bulgular elde etmişlerdir. Bu araştırıcılar PST' nin biyolojik kontrolünde yeşil aksama bakıra dayanıklı antagonistleri püskürtmüşler ve bunun yanında tohuma ve toprağa da dayanıklılığı teşvik eden rizobakterileri uyguladıklarında başarılı sonuçlar elde ettiklerini bildirmişlerdir.

İyi bir antagonist, çevre koşullarına kolayca adapte olabilmeli, diğer mikroorganizmalar ile uyum sağlamalı, bitki yüzeyinde aktif duruma gelmeli, patojene karşı savaşabilmeli ve fungusitlerden etkilenmeyerek yaşamını devam ettirebilmelidir. 4K1f izolatının yeşil aksamda başarılı şekilde kolonize olduğunu ve patojen ile savaşıp etkin bir mücadele verdiğini çalışmamızda görmekteyiz. Yeşil aksamdaki patojene karşı bir antagonistin bakırlı bir preparat kadar iyi bir etki göstermesi beklenemez. Genellikle ilk antagonist uygulamasında etki, bakırlı ilaçlarla karşılaştırıldığında çok fazla olmayabilir ancak bunu takip eden antagonist püskürtmelerinde etkinin attığı belirlenmiştir (Elad, 1990). Antagonist bakırlı

preparatlardan etkilenmiyorsa dönüşümlü kullanımı kimyasal kullanımını azaltacak, artık sorununa bir ölçüde çözüm getirecektir. Bu çalışmada etkili olarak saptanan antagonistlerin sera koşullarında yeşil aksamdaki populasyon dalgalanmaları gözlenerek, bitki yüzeyindeki yaşama adaptasyonları saptanmalıdır. Etkili izolatın tanısının yapılması, yeşil aksamda kullanılan preparatlarla (fungisit ve insektisitler) etkileşimi ve serada yeşil aksamdaki kolonizasyonu gelecekteki çalışma konularımız arasında yer alacaktır. PST' nin biyolojik kontrolü ile ilgili çalışmalarımızın yeni olmasına rağmen başarılı bulgularımızın olması umut vericidir.

Yeşil aksam bitki hastalıklarının mücadelesinde ucuz ve etkili fungusitlerin varlığı ve bunların yeşil aksama kolayca uygulanabilirliği bu konudaki çalışmaların az olmasına neden olmuştur. (Elad, 1990). Ancak tarım ilaçlarının toprağa ve suya diğer bir ifade ile çevreye verdiği zararın artık daha iyi anlaşılması, ilaçlara karşı patojenlerin dayanıklılık oluşturmaları, kullanılan kimyasalların ekonomik durumları ve doğal dengeye olan olumsuz etkisi göz önüne alındığında kimyasal savaşıma alternatif yöntemlerden biri olan biyolojik kontrolün önemi daha iyi ortaya çıkmaktadır. Dünyada pek çok araştırma merkezi ve özel sektör biyolojik kontrol ajanlarının toprağa, tohumu ve yaprağa uygulanması gibi konulara yönelerek bütçelerinden milyonlarca doları bu amaç için harcamaktadır (Tjamos, 1995)

### 4.5.3. Solarizasyon Çalışmaları

#### 4.5.3.1. Toprak Solarizasyonunun Hastalık Gelişimi Üzerine Etkisi

Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Araştırma ve Uygulama Parselinde yapılan toprak solarizasyonu boyunca dijital elektronik toprak termometreleri ile solarize edilen ve kontrol parselin 5, 10, 15, 30 ve 40 cm derinliğinde ölçülen toprak sıcaklıkları çizelge 4.14’ de verilmiştir.

Çizelge 4.14. Solarize edilen ve kontrol parsellerinin farklı derinliklerdeki toprak sıcaklıkları (°C)

| Derinlik | Solarizasyon |      |      | Kontrol |      |      | Fark |     |     |
|----------|--------------|------|------|---------|------|------|------|-----|-----|
|          | Max          | Min  | Ort  | Max     | Min  | Ort  | Max  | Min | Ort |
| 5 cm     | 51.6         | 40.1 | 44.5 | 41.7    | 36.7 | 36.7 | 9.9  | 9.4 | 7.8 |
| 10 cm    | 51.3         | 36.2 | 41.2 | 37.2    | 32.1 | 34.6 | 14.1 | 4.1 | 6.6 |
| 15 cm    | 40.5         | 33.1 | 38.1 | 35.6    | 30.4 | 32.4 | 4.9  | 2.7 | 5.7 |
| 30 cm    | 36.7         | 30.0 | 34.6 | 33.5    | 29.2 | 30.9 | 3.2  | 0.8 | 3.7 |
| 40 cm    | 36.0         | 29.4 | 33.8 | 31.0    | 27.0 | 29.9 | 5.0  | 2.4 | 3.9 |

Çizelge 4.14’den de görüldüğü gibi 5 cm toprak derinliğinde maksimum sıcaklık 51.6 °C’ ye yükselmiş ve kontrol parselde ise 41.7 °C’ de kalmış ve aradaki fark 9.9°C olmuştur. Solarize edilen ve kontrol parseller arasında 5-40 cm toprak derinliğindeki maksimum sıcaklık farkları 14.1-3.2 °C, minimum sıcaklık farkları 9.4-0.8 °C ve ortalama sıcaklık farkları ise 7.8-3.7 °C arasında değişmiştir. Toprak solarizasyonu sonucu oluşan sıcaklıklar genellikle toprak tipi, mevsim ve toprak derinliğine bağlı olarak artma göstermektedir (Doğan, 1995). Buna karşın genellikle solarizasyon esnasında 35-60°C toprak sıcaklığına ulaşılabilir. Bu sıcaklık sınırları içerisinde 4-8 haftalık solarizasyonla topraktaki patojenler zayıflatılarak diğer uygulamalara duyarlı hale getirilebilir (Katan 1980, Stapleton ve De Vay, 1986. Doğan, 1995’ den). Pek çok mikroorganizma 50 °C üzerindeki sıcaklıklarda birkaç saatte canlılığını kaybeder. Ayrıca 37-50 °C arasında ise ölüm yada zayıflama

2-5 hafta içerisinde görülmektedir (Stapleton ve De Vay, 1986). Bu öldürücü sıcaklıklar ve süresi organizmalara göre değişmesine karşın, genellikle 45°C üzerindeki sıcaklıklarda LD 90 değerine kısa bir sürede ulaşılır (Stapleton ve De Vay, 1991. Doğan, 1995' den). Nemli koşullarda 35°C 'de PST popülasyonunun azalmaya başladığı 48 °C 'de tamamen ölümün olduğu Devash ve ark, (1980) tarafından rapor edilmiştir. Bizim çalışmamızda solarize edilen parselde 30 cm toprak derinliği dahil maksimum sıcaklık olarak 37 °C 'ye ulaşılmıştır. 51 °C ve üzerindeki toprak sıcaklığına ise 5 ve 10 cm toprak derinliğinde ulaşılmıştır. Bu sıcaklık verilerine göre 15-30 cm toprak derinliklerinde patojen popülasyonu azalmaya başlamakta 5-10cm toprak derinliklerinde etmen yok olmaktadır.

1994 yılında ön çalışma olarak uygulanan ilk solarizasyon denemesinde alan 12 eşit parçaya bölünerek yarısı solarize edilmiş ve diğer yarısı kontrol parsel olarak bırakılmıştır. Bu parsellere Şubat ayında temiz tohum ekimi yapılarak hastalıklı bitki oranı (%) ve hastalık şiddeti saptanmıştır. Çizelge 4. 15 incelendiğinde 0-3 skalasına göre hastalık indeksi ve hastalık şiddeti %'si hesaplandığında kontrol parselde bu oran %69.28 iken solarize edilen parselde %68.28 olarak saptanmıştır. Solarizasyonun hastalık şiddetini %1.44 oranında azalttığı belirlenmiştir. Kontrol parseldeki bitkilerin yaklaşık % 24' ü hastalanırken solarize edilen parselde ise bu oran % 8 olarak saptanmıştır. Abbott formülüne göre solarizasyon uygulaması hastalık oluşumunu % 66 oranında engellemiştir.

Çizelge 4.15. 1994 yılında yapılan ön çalışmada hastalık gelişimi üzerine solarizasyonun etkisi

| Uygulama       | Hasta Bitki/<br>Toplam Bitki | Hasta bitki<br>Oranı (%) | Hastalık<br>Şiddeti %'si |
|----------------|------------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Kontrol 1      | 32/69                        | 46.38                    | 80.33                    |
| Kontrol 2      | 14/75                        | 18.67                    | 45.33                    |
| Kontrol 3      | 10/67                        | 14.93                    | 60.00                    |
| Kontrol 4      | 13/83                        | 15.66                    | 71.67                    |
| Kontrol 5      | 10/78                        | 12.82                    | 86.67                    |
| Kontrol 6      | 26/74                        | 35.14                    | 71.67                    |
| Ortalama       |                              | 23.93                    | 69.28                    |
| Solarizasyon 1 | 3/81                         | 3.70                     | 55.67                    |
| Solarizasyon 2 | 3/76                         | 3.95                     | 89.00                    |
| Solarizasyon 3 | 8/84                         | 9.52                     | 87.67                    |
| Solarizasyon 4 | 7/86                         | 8.14                     | 47.67                    |
| Solarizasyon 5 | 9/79                         | 11.39                    | 66.67                    |
| Solarizasyon 6 | 9/77                         | 11.69                    | 63.00                    |
| Ortalama       |                              | 8.07                     | 68.28                    |
| % Etki         |                              | 66.27                    | 1.44                     |

Daha sonraki yıllarda solarizasyon solarize edilen plastik sera toprağı (Şekil 4.19) Eylül ayında solarizasyon uygulaması bittikten sonra Şubat ayı ortalarına kadar boş bırakılmıştır. Şubat ayında solarize edilen ve kontrol parselin tam ortasındaki 1m eninde 18 m boyundaki alana domates tohumları ekilmiştir. Yaklaşık bir ay sonra çimlenen tohumların kotiledon yaprakları incelenerek hastalık varlığı gözlenmiştir (Şekil 4.20). 1995 ve 1996 yaz aylarında yapılan solarizasyon uygulamasının hastalık üzerine olan etkisi çizelge 4.16'da verilmiştir. 1995 yılında yapılan solarizasyon uygulaması hastalıklı bitki %'sini 79, hastalık şiddetini % 20 düzeyinde azaltmıştır. 1996 yılında ise hastalıklı bitki %'sini 75 ve hastalık şiddeti

% 25 azaltmıştır. 1997 yazında solarize edilen parsellere bir sonraki yılın Şubat ayında tohum ekimi yapıldığında kontrol ve solarize edilen parsellerin hiç birisinde hastalık belirtilerine rastlanılmadığından değerlendirme yapılamamıştır.

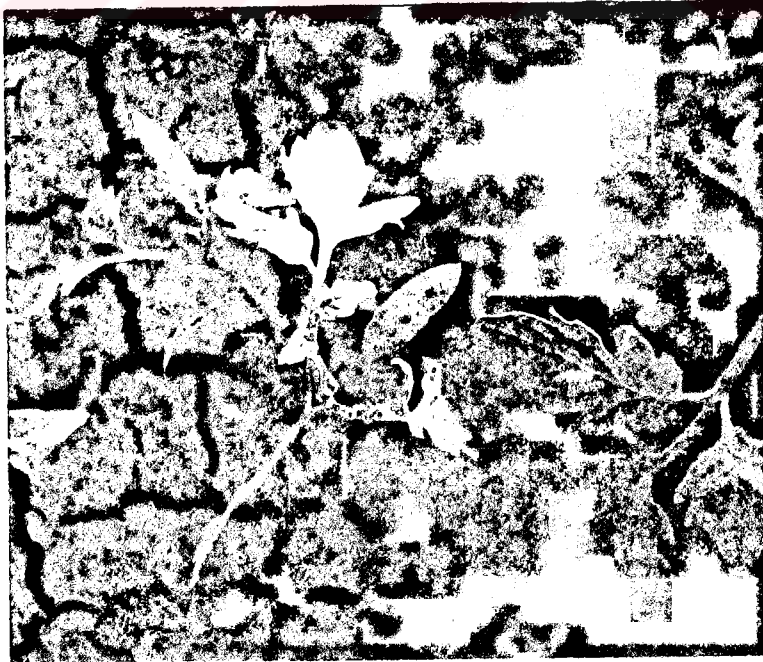
Çizelge 4.16. Plastik serada yapılan toprak solarizasyonunun hastalık gelişimi üzerine etkisi

| Yıl  | Uygulama     | Hasta Bitki/<br>Toplam Bitki | Hasta Bitki<br>Oranı (%) | Hastalık<br>Şiddeti %'si |
|------|--------------|------------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 1995 | Kontrol      | 116/1084                     | 10.70                    | 66.66                    |
|      | Solarizasyon | 21/929                       | 2.26                     | 53.33                    |
|      | %Etki        |                              | 78.87                    | 19.99                    |
| 1996 | Kontrol      | 102/825                      | 12.00                    | 75.66                    |
|      | Solarizasyon | 20/758                       | 3.00                     | 56.66                    |
|      | %Etki        |                              | 75.00                    | 25.11                    |

İki yıllık veriler değerlendirildiğinde solarizasyon hastalık oluşumunu yaklaşık % 77, hastalık şiddetini % 22.5 düzeyinde azaltarak toprak kökenli inokulumu baskı altına almada etkili bir uygulama olarak değerlendirilmiştir. Erkılıç ve ark (1994) ısıtmalı plastik serada üretici koşullarında yaptıkları denemelerinde solarizasyonun PST'nin gelişimini % 43 oranında azalttığını ve bu hastalığın kontrolünde çiftçilere önerilebilecek bir uygulama olduğunu bildirmişlerdir. Bu araştırmacılar hastalık değerlendirmesini hasata yakın gelişmiş bitkiler üzerinde oluşan belirtilerin sayımı ile yapmışlardır. Bizim çalışmamızda denemeyi yaptığımız alanın çok sayıda bitki gelişimi için yeterli olmamasından dolayı değerlendirme tohumdan gelişen fide kotiledon yapraklarındaki belirtilerin sayımı ile yapılmıştır. Deneme alanına fazla sayıda tohum ekebilme şansı solarizasyonun etkisini değerlendirmede bize kolaylık ve sonucun doğruluğunda eminlik sağlamıştır.



Şekil 4.19. Solarizasyon uygulamasının yapıldığı alan



Şekil 4.20. Solarizasyon sonrası tohum ekimi yapılan parsellerde kotiledon yapraklarda oluşan lekeler

#### 4.5.3.2. Toprakta İnfekteli Bitki Artıklarındaki Patojen Canlılığı Üzerine Solarizasyonunun Etkisi

1995 yılında solarizasyon öncesi  $8.0 \times 10^5$ , 1996 yılında  $8.6 \times 10^7$ , 1997' de ise  $3.0 \times 10^6$  hücre/g bitki artığı yoğunluğu ile bulaştırılan sera toprağından solarizasyon sonrası yapılan izolasyonlarda topraktaki bitki artıklarında PST'ye rastlanılmamıştır.

1995 yılında  $5.6 \times 10^6$  hücre/g bitki artığı yoğunluğu ile bulaştırılan sera toprağından solarizasyon sonrası 1 gram bitki artığında  $2.9 \times 10^4$  PST hücresinin bulunduğu saptanmıştır. İzole edilen floresan bakterilerin rifampicin içeren ortamda gelişmeleri, tütünde HR pozitif reaksiyon vermeleri bunların PST olduğunu kanıtlamıştır. Bu bulgu cam serada solarizasyonun etkisiz olduğunu göstermektedir. Yaz boyunca cam seraya güneş ışıkları kırılarak girmekte ve sera içerisinde gölgelenme oluşmaktadır. Seranın üst camlarını açma olanağımızın olmaması sonucu sera içindeki sıcaklık ne kadar yükselse de toprak yeterli düzeyde ısınmamıştır. Bu nedenlerden dolayı İsrail koşullarında bile pek çok cam serada solarizasyon başarısız olmaktadır (Kritzman, 1997, sözlü bildiri).

Çizelge 4.16' dan anlaşıldığı gibi 1995 ve 1996 yıllarında solarize edilen parsellerde de hastalık çıkışının olması toprakta inokulumun varlığını kanıtlamaktadır. Topraktaki patojen yoğunluğu az olduğunda klasik petri teknikleriyle bunları saptamak zor olmaktadır. 2 ay sonra hiçbir uygulamanın yapılmadığı kontrol parselde ise 1 gram bitki artığından 1995'de  $3.0 \times 10^4$  ve 1996' da ise  $7.0 \times 10^5$  PST hücresi izole edilmiştir. 1997 yılında 2 ay sonra kontrol perselden yapılan izolasyonda da PST' ye rastlanılmamıştır. Bu süre içinde sıcaklıktan dolayı etmenin toprakta yaşamını sürdüremediği düşünülmektedir.

Ayrıca 100 ppm rifampicine dayanıklı PST izolatu ile inokule edilen domates bitki parçaları naylon kadın çorabı içerisinde, solarizasyon öncesi, toprağıın 0, 5, 15, 30 ve 40 cm derinliğine gömülmüştür. Solarizasyon öncesi naylon kadın çorabı içerisindeki bitki parçalarından yapılan izolasyonda 1 gram bitki parçasının  $4.5 \times 10^7$  PST hücresi ile inokule edildiği saptanmıştır. Solarizasyon sonrası toprağıın farklı derinliklerinden çıkarılan bitki parçaları içeren naylon kadın çorabından yapılan

izolasyonlarda antibiyotik içeren ortamda PST' ye rastlanılmamıştır. Ancak solarize edilen parselin farklı derinliklerinden çıkarılan bitki artıklarından antibiyotik içermeyen KB ortamına yapılan izolasyonda besi yerinde yoğun gelişen floresan bakteriler petriden yıkanarak santrifüj edilmiş, pelet tekrar süspanse edildikten sonra tütünde HR ve domateste patojenite testleri gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemle solarize edilen parselin 40 cm derinliğinde PST'nin varlığı kanıtlanmıştır. Kontrol parselde ise 5 cm toprak derinliği hariç diğer tüm derinliklerden PST izole edilebilmiştir. Patojenin popülasyonu belirlenememiş fakat solarize edilen parselin 40 cm, kontrol parselin 10, 15, 30 ve 40 cm derinliğinde varlığı saptanmıştır.

Bu çalışmanın dışında, 7 cm boyundaki cam kavanozlarının içine YDCA ortamı üzerinde 100 ppm rifampicine dayanıklı PST izolati geliştirilerek solarizasyon öncesi, uygulama yapılacak ve kontrol olarak bırakılacak parselin 5, 15, 30 ve 40 cm derinliklerine gömülmüştür. Solarizasyon uygulaması bittikten sonra PST'nin 30 ve 40 cm derinliğinde canlı kaldığı saptanmıştır. Kontrol parselde ise 5cm toprak derinliği hariç diğer derinliklerden izole edilebilmiştir. Tanı, tütünde HR, domateste patojenite testleri ile desteklenmiştir. Cam kavanozların kalınlığından dolayı sıcaklık yeterince içeri girip patojeni öldüremediğinden uygulama yapılan parselin yalnız 30 ve 40 cm derinliğinde etmen canlı olduğu saptanmıştır.

Bu bulgulara göre hiçbir uygulamanın yapılmadığı koşullarda yazın artan toprak sıcaklığından dolayı etmen 5 cm derinlikte yaşamını sürdürememektedir. Solarizasyon uygulaması termal ölüm sıcaklığı 48 °C olan PST' ye 30 cm toprak derinliğine kadar etki göstererek etmenin canlı kalmasını engellenmektedir.

#### **4.5.3.3. Solarizasyonunun Topraktaki Toplam Mikroorganizma Popülasyonu Üzerine Etkisi**

Solarizasyonun topraktaki toplam bakteri popülasyon yoğunluğuna etkisini belirlemek amacıyla yapılan toprak izolasyonlarında solarizasyon öncesi 1995, 1996 ve 1997 yıllarında sırasıyla  $6.0 \times 10^7$ ,  $1.1 \times 10^6$  ve  $5.6 \times 10^7$  hücre/g toprak mikroorganizma popülasyonu saptanmıştır. Solarizasyon sonrası toplam

mikroorganizma popülasyonu bu yıllarda sırasıyla  $2.0 \times 10^8$ ,  $4.0 \times 10^5$ , ve  $3.6 \times 10^7$  hücre/g toprak olarak bulunmuş ve solarizasyonun toplam bakteri popülasyonu üzerine olumsuz bir etkisinin olmadığı saptanmıştır (Çizelge 4.17).

Çizelge 4.17. Topraktaki toplam bakteri popülasyonu üzerine solarizasyonun etkisi

| Yıl  | Solarizasyon Öncesi<br>(hücre/g toprak) | Solarizasyon Sonrası<br>(hücre/g toprak) |
|------|-----------------------------------------|------------------------------------------|
| 1995 | $6.0 \times 10^7$                       | $2.0 \times 10^8$                        |
| 1996 | $1.1 \times 10^6$                       | $4.0 \times 10^5$                        |
| 1997 | $5.6 \times 10^7$                       | $3.6 \times 10^7$                        |

Toprak solarizasyonunun topraktaki bakteri ve floresan Pseudomonasların popülasyonunu azalttığı bazı çalışmalarda bildirilmiştir (Yücel, 1987; Doğan, 1995). Fakat solarizasyondan 1 ay sonra floresan Pseudomonasların ve diğer bakterilerin toprağı tekrar kolonize ederek popülasyonlarını artırdığı Doğan (1995) tarafından rapor edilmiştir. Stapleton ve De Vay (1986) solarizasyonun topraktaki Agrobacterium, floresan Pseudomonas, pektolitik Pseudomonas ve bazı gram pozitif bakterilerin popülasyonlarında yaklaşık % 69-98 oranında azalışa neden olduğunu saptamışlardır. Ancak uygulamadan 3-6 ay sonra floresan Pseudomonasların tekrar toprağı kolonize ettiğini bildirmişlerdir. Solarizasyon uygulaması sonucu toprakta Aktinomiset, sıcak seven fungus ve bakterilerin popülasyonunda artışın olduğu bilinmektedir (Stapleton ve De Vay 1982, Yücel, 1987). Bizim çalışmamızda floresan ve diğer tüm bakteriler beraber sayılmıştır. Solarizasyon uygulaması sonucu sıcak duyarlı bakteri popülasyonu azalırken, sıcak seven bakterilerin artış göstermesi sonucu toplam popülasyonda fazla bir değişim olmamış olabilir.

#### 4.5.3.4. Toprak Solarizasyonunun Verime Etkisi

Çizelge 4.18' de görüldüğü gibi 1995, 1996 ve 1997 yıllarında meyve verimi sırasıyla %9, 12 ve 6 oranında artmıştır. 3 yıllık veriler değerlendirildiğinde solarizasyon meyve verimini % 9 artırdığı saptanmıştır.

Çizelge 4.18. Verim üzerine solarizasyonun etkisi

| Yıl  | Solarizasyon<br>(kg/da) | Kontrol<br>(kg/da) | %<br>Etki |
|------|-------------------------|--------------------|-----------|
| 1995 | 61                      | 56                 | 9         |
| 1996 | 84                      | 75                 | 12        |
| 1997 | 51                      | 48                 | 6         |

Verimde ortaya çıkan bu artışın solarizasyondan dolayı olduğu görülmektedir. Aysan ve ark. (1995)' nin bildirdiğine göre solarizasyon meyve verimini %47 oranında artırmıştır. Bu verim artışı solarizasyon sonucu toprak yapısının iyileştirilmesi ve hastalık azalışına bağlıdır. Bizim çalışmamızda plastik seraya meyve üretimi için fide dikimi yapıldığında solarizasyon parselinde bitkiler üzerinde hastalık oluşmazken sadece 1995 yılında kontrol parseldeki bitkilerin % 4' ü hastalanmıştır. Verimde ortaya çıkan bu artışın hastalık azalışından değil toprak yapısının iyileşmesinden yani bitki besin maddelerindeki artıştan kaynaklandığı düşünülmektedir. Solarizasyonun meyve verimini artırdığı pek çok çalışmada da rapor edilmiştir (Stapleton ve ark. 1991; Erkılıç ve ark., 1994, Aysan ve ark., 1995)

Mevcut tarım alanlarımızın yoğun olarak kullanımı sonucu toprak kökenli patojenlerden dolayı üründe verim azalışları ortaya çıkmaktadır. Toprak patojenlerine karşı fungusitler etkisizdir ve fungusitlere karşı patojenlerin dayanıklılık problemlerinden dolayı ilk akla gelen yöntem toprak fümigasyonudur. Bu uygulamanın pahalı ve toksik olması, ozon tabakasına verdiği zarar ve hatta 2000 yılından sonra kullanımına sınırlama getirileceği düşünüldüğünde fümigasyona alternatif yöntemlerin araştırılması zorunlu olmaktadır. Kimyasal kontrole alternatif olarak

toprak yönetimi (ürün rotasyonu, toprağa organik madde ekleme ve fiziksel uygulamalar), biyolojik savaş ve toprak solarizasyonun birlikte kullanımı toprak kökenli patojenlerin kontrolünde önerilmektedir (Tjamos, 1995). Ucuz, uygulaması kolay ve çevreye dost olan solarizasyon uygulamasına çevre koşulları (hava sıcaklığı, gün uzunluğu vb) ve kullanılan naylonun kalınlığı son derece etkilidir. Ayrıca toprağa eklenen organik maddeler ve biyokontrol organizmaları toprak kökenli hastalıkları baskı altına almada başarıyı artırıcı kriterlerdir (DeVay, 1997). Toprak solarizasyonu için uygun iklim koşullarına sahip bölgemizde açıkta ve örtü altında sebze, çilek ve fidancılık alanlarındaki toprak kökenli fungal ve bakteriyel patojenlere karşı solarizasyonun 1985'den beri kullanıldığı bilinmektedir (Çınar, 1983, Çınar ve Biçici, 1985, Erkılıç ve ark, 1994). Bu çalışmada denenen toprak solarizasyonu yöntemi PST' nin toprak kökenli inokulumunu baskı altına alarak hastalık oluşumunu % 77 engellemiş ve başarılı bir uygulama olarak saptanmıştır. Hastalık oluşumu direk tohumlardan gelişen fideler üzerinde testlendiğinden solarizasyonun fide toprağında kullanımı önerilebilir. Özellikle fideliklerdeki ilk bulaşmaların inokulum kaynağı olarak önemli olmasından dolayı burada yapılacak uygulamalar hastalığın yayılmasını önleyecektir. Erkılıç ve ark. (1994) solarizasyonun plastik serada hastalık çıkışını % 43 düzeyinde azalttığını bildirmişlerdir. Son yıllarda dünyada yapılan çalışmalar toprak solarizasyonu ile farklı kontrol yöntemlerinin birlikte kullanımına doğru yönelmektedir. Diğer bir deyişle hedef entegre kontrol içerisine toprak solarizasyonunu almaktır. Kimyasal kullanımını yapılan bu doktora çalışması çerçevesinde PST'nin entegre kontrolünde solarizasyonun kullanılabilirliği gösterilmiştir.

## 5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Domates bakteriyel kara leke hastalığı etmeninin (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) tanımı, ırklarının tespiti, domates tohumlarında saptanması ve kimyasal savaşıma alternatif yöntemlerin araştırılması hedeflenen bu doktora çalışmasında elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

1. Örtü altında ve açıkta domates üretiminin yapıldığı Adana, İçel, Hatay, Antalya ve Konya illerinden tipik hastalık semptomu gösteren bitkilerinden yapılan izolasyonlarda *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* izole edilmiştir.

2. Elde edilen bakteri izolatlarının tanısı fizyolojik, biyokimyasal ve domateste patojenite testlerinin yanında ELISA ve PCR testleri ile yapılmıştır. Serolojik ve moleküler yöntemlerin laboratuvarımızca tanıda rutin kullanılır hale gelmesi, gelecekte yapılacak çalışmalarımıza basamak oluşturması açısından önem taşımaktadır.

3. Ülkemizin çeşitli yörelerinden izole edilen 21 PST izolatının 5 tanesi Irk 0, 16 tanesi Irk 1 olarak tanımlanmıştır. Bu çalışma ile Irk 1'in ülkemize girişi yaptığı ve yayıldığı saptanmıştır. Bu ırk sayesinde Ontario 7710 çeşidinin dayanıklılığının kırıldığı görülmüş ve *Pto* geni ile sağlanan kontrol kısa sürmüştür. Islahçıların bu ırklara karşı, verimi ve kalitesi iyi olan domates çeşitlerine majör dayanıklı genlerin tek başına veya minör dayanıklı genler ile kombinasyon halinde yeni genler eklemeleri yararlı olacaktır.

4. Çukurova bölgesi koşullarında PST yaz ve kış ayları boyunca topraktaki infekteli bitki kalıntılarında yaşamını sürdürerek bir sonraki vejetasyon döneminde yeni fideleri infekte etme yeteneğinin sahiptir. Etmen bir yıl boyunca tohum üzerinde canlı kalmış fakat toprakta yaşamını sürdürememiştir. Bu yaşam döngüsünün belirlenmesi hastalığın kontrolünde bize yardım edecektir.

5. Çeşitli antibiyotiklerle zenginleştirilmiş yarı seçici besi yerine ekim, IFAS, domateste patojenite ve bu tohumlardan gelişen fidelerin semptomolojik olarak incelenmesi temeline dayanan testlerin kombinasyonu ile ülkemizde kullanılan 47 farklı tohum çeşidi incelendiğinde bir tohum örneğinde PST saptanmıştır. PST' nin tohumla yeni alanlara taşınabildiği bir kez daha vurgulanmış ve ayrıca bu yöntemin tohumdaki  $2.0 \times 10^3$  PST hücrelerini tespit edebilecek duyarlılıkta olduğu saptanmıştır.

Daha düşük bakteri inokulumunu saptayabilecek, daha basit ve ucuz yöntemler her zaman araştırılmaya devam edilmelidir.

6. Domates tohumlarındaki PST'yi elemine edebilmek amacıyla yapılan çeşitli tohum uygulamaları %73-100 arasında etkili olmuştur. Uygulamaların etkinliği ve çimlenme %'leri dikkate alındığında Domates Bakteriyel Kara Leke Hastalığına karşı tohum ilaçlaması olarak 8-hydroxyquinoline, streptomisin (100 ppm), ve bakır asetat önerilebilir. Antibiyotiklere karşı bakterilerin bir süre sonra dayanıklılık kazanabilmeleri göz önüne alındığında bakır asetat ve Bronopol'un önerilen diğer preparatlara göre ekonomik olmaları nedeniyle öncelik alması önerilmektedir.

7. Biyolojik kontrol çalışmalarında PST 'ye karşı 538 adet aday antagonistin 137 tane 0.2 ile 1.0 cm arasında inhibisyon zonu oluşturmuştur. Fakat bunların testlenmesi esnasında son derece fazla miktarda zaman ve kimyasal kaybı göz önüne alındığında antagonist seçiminde petri testleri yerine direk *in vivo* çalışmalarla etkili antagonistlerin tespit edilmesi önerilmiştir. Bunlar arasında seçilen 18 antagonist ile *in vivo* çalışmalar yapılmıştır. 4K1f ve MTD1 izolatları toprak, tohum kökenli ve yeşil aksamdaki inokulumu baskı altına almada etkili izolatlar olarak belirlenmiştir. Bu 2 izolatın ve İsrail' den getirilen antagonistlerin (3 bakteri ve 3 maya) PST' ye etkisi doğal koşullar altında steril olmayan sera ve tarla toprağında denenmesi önerilmektedir. Hatta antagonistler ile toprak solarizasyonu birlikte uygulanarak hastalığa etkisi denenmelidir.

8. Toprak kökenli inokulumu baskı altına almak veya azaltmak amacıyla yapılan solarizasyon uygulaması toprak sıcaklığını artırarak hastalık oluşumunu % 77 ve hastalık şiddetini %22.5 azaltırken verimi % 9 artırmıştır. Termal ölüm sıcaklığı 48° C olan PST' ye karşı solarizasyon uygulaması toprağın 30 cm derinliğine kadar etkisini göstermiştir. Ayrıca toprak solarizasyonunun topraktaki toplam mikroorganizma popülasyonu üzerine hiçbir olumsuz etkisinin olmadığı saptanmıştır. Çukurova Bölgesi koşullarında plastik seralarda ve fideliklerde solarizasyon uygulamasının kullanımı çiftçiye önerilebilir.

Son yıllarda kimyasallara karşı oluşan dayanıklılık sorunu ve biyolojik tarımın önem kazanması entegre savaş programları içerisine toprak solarizasyonu ve biyolojik kontrol gibi kimyasal savaşa alternatif mücadele yöntemlerinin dahil

edilmesi zorunluluğunu ortaya çıkarmıştır. Bu hedef doğrultusunda bu uygulamalardaki başarılar ve PST 'nin kontrolünde bu uygulamaların kullanılabilirliği yapılan bu çalışma ile ortaya konmuştur.

Tohum kökenli, topraktaki infekteli bitki kalıntılarında yaşamını devam ettirebilen, domates ve etraftaki diğer konukçu bitkiler ile yabancı otlarda efititik yaşama yeteneğine sahip bu patojene karşı tek bir kontrol yöntemi kullanmak başarısız olmaktadır. Bu nedenle Bakteriyel Kara Leke Hastalığının kontrolünde temiz tohum ve dayanıklı çeşit kullanımı, infekteli bitki kalıntılarının yok edilmesi, tohumu çeşitli uygulamaların yapılması, biyokontrol ajanlarının kullanımı ve toprak solarizasyonu işlemleri kimyasal savaşıma alternatif kontrol yöntemi olarak önerilebilir.

## KAYNAKLAR

- ABAK, K. ve LATERROT, H., 1988. Örtü altı domates tarımının önemli hastalık sorunları. Adana'da Tarım, 5:19-21.
- \_\_\_\_\_, ÖKTEM, Y. E., ve SAKİN, Ş., 1989. H 2274 ve ES 58 (2889) F domates çeşitlerinde bakteriyel kara leke hastalığına (*Pseudomonas tomato*) dayanıklılık ıslahı. TÜBİTAK, TOAG-562.
- \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, 1990. Domates bakteriyel kara leke hastalığına (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) dayanıklılık ıslahı. Doğa-Tr. J. of Agriculture and Forestry. 14:239-249.
- AGARWAL V. K. and SINCLAIR, J. B., 1987. Principles of seed pathology. Volume I, II. CRC Press Inc. Baco Raton, Florida.
- ANTONIOU, P. P., TJAMOS, E. C., and PANAGOPOULOS, C. G., 1995. Use of soil solarization for controlling bacterial canker of tomato in plastic houses in Greece. Plant Pathology 44:438-447.
- ARSENJEVIC, M. and JOCANOVIC, O., 1993. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, a pathogen of tomato transplants. Zostita-Bilja, 44(1):73-83,(Abstract English).
- AUSUBEL, I., and FREDRIK, M., 1987. Preparation of genomic DNA from bacteria. Current Protocols in Molecular Biology. Unit 2:4.
- AYSAN, Y., SARI, N., ERKILIÇ, A., ÇINAR, Ö. ve ABAK, K., 1995. Domates Bakteriyel Kara Leke Hastalığına karşı dayanıklı çeşit ile toprak solarizasyonunun hastalık gelişimi ve verim üzerine etkileri. 7. Türkiye Fitopatoloji Kongresi, 26-29 Eylül, Adana. 418-422.
- \_\_\_\_\_, ÇINAR, Ö. and RUDOLPH, K., 1997. The effect of soil solarization on the survival of bacterial speck on the tomato plant debris in soil. Second International Conference on Soil Solarization and Integrated Management of Soilborne Pests. March 16-21, ICARDA, Aleppo, Syria. Abstract no 23.
- BALOĞLU, S., 1988. Doğu Akdeniz Bölgesi turuncgillerde zararlı Tristeza virüs hastalığının tanınması, artırılması, özellikleri ve serolojik yöntemlerle (ELISA, SDS-İmmunodiffision testleri) saptanması. Çukurova Üniversitesi Fenbilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilin Dalı, Doktora Tezi.

- \_\_\_\_\_. , AYSAN, Y., Ö. ÇINAR, ve A. ERKILIÇ, 1998. Ticari domates tohumlarından ve bitki örneklerinden *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*' nun serolojik yöntemlerle saptanması. Ç. Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi 13(2):7-16.
- BASHAN, Y., OKON, Y., and HENIS, Y., 1978. Infection studies of *Pseudomonas tomato* causal agent of bacterial speck of tomato. *Phytoparasitica* 6(3):135-143.
- \_\_\_\_\_. , OKON, Y., and HENIS, Y., 1982. Long-term survival of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in tomato and pepper seeds. *Phytopathology* 72 : 1143-1144.
- \_\_\_\_\_. , and ASSOULINE, I., 1983. Complementary bacterial enrichment techniques for the detection of *Pseudomonas syringae* pv *tomato* and *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in infested tomato and pepper seeds. *Phytoparasitica* 11(3-4):187-193.
- BENLİOĞLU, K., ve BENLİOĞLU, S., 1998. *Pseudomonas syringae* pv *tomato* 'ya karşı bakır dayanıklılığı üzerinde çalışmalar. 8. Türkiye Fitopatoloji Kongresi, 21-25 Eylül, Ankara. 52-56.
- BENNETT, M. A., CALLAN, N. W., and FRITZ, V. A., 1991. Seed treatments for disease control. *Hort Technology*, 1(1):84-87.
- BOGATZEVSKA, S. N., SOTIROVA, V., and STAMOVA, L., 1989. Races of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (OKABE) Young et al. in Bulgaria. *TGC Reports* 39:7.
- \_\_\_\_\_. , VITANOV, M., and BONEVA, K. P., 1989. Disinfecting tomato seeds against bacterial pathogens. *Rasteniev'dni-Nauki* 26(4):92-97. (Abstract in English).
- \_\_\_\_\_. , and BONEVA, K. P., 1991. Survival of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* in seeds of weeds. *Proceedings of the Working Group Pseudomonas syringae pathovars in Italy*. 209 p.
- BOLKAN, H. A., 1987. Tomato seed assays. *California Plant Disease Conference Workshop*, 11-14 August, Cal-Poly, San Luis Obispo, USA. 13-25.
- BONN, W. G., 1980. Incidence and severity of bacterial speck of tomato in southwestern Ontario in 1979. *Plant Disease* 64:586-587.

- BORA, T., ve ÖZAKTAN, H., 1998. Bitki hastalıklarıyla biyolojik savaş. Prizma Maatbaası, İzmir. 205s.
- BOSSHARD-HEER, E. and VOGELSANGER, J., 1977. Überlebensfähigkeit von *Pseudomonas tomato* (Okabe) Alstatt in verschiedenen Böden. Phytopath. Zeitsch. 90:193-202.
- BRINKERHAFF, L. A., 1970. Variation in *Xanthomonas malvecearum* and its relation to control. Annu. Rev. Phytopathol. 8:85-110.
- BRYAN, M. K., 1933. Bacterial speck of tomatoes. Phytopathology 23:897-904.
- BUONAURIO, R., STRAVATO, V.M. and CAPPELLI, C., 1996. Occurrence of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* race 1 in Italy on Pto gene-bearing tomato plants. Journal of Phytopathology 144:437-440.
- CHAMBERS, S. C. and MERRIMAN, P. R., 1975. Perennation and control of *Pseudomonas tomato* in Victoria. Aust. J. Agric. Res. 26:657-663.
- CHARD, J. M., VAN GARDINGEN, J. and GRAHAM, D. C., 1992. Biological control of Erwinia diseases of potato. New Approaches in Biological Control of Soilborne Diseases Proceeding Workshop, 30.June-4.July, Copenhagen Denmark. 133-135.
- CLARK, M. F., and ADAMS, A. N., 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme linked immune sorbent assay for the detection of plant viruses. J. Gen. Virol. 3(3):475-483.
- COLIN, J., and MAHTAJ, B., 1984. Study on the survival of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* under natural conditions in Morocco. Review of Plant Pathology 64:3544.
- \_\_\_\_\_, 1985. Presence of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Okabe) Young et al. on tomato crops in Morocco. Review of Plant Pathology, 65:3194.
- \_\_\_\_\_, and CHAFIK, Z., 1986. Comparison of biological and chemical treatments for control of bacterial speck of tomato under field conditions in Morocco. Plant Disease 70:1048-1050.
- \_\_\_\_\_, FAISSOILI, M., and AZAMI, M., 1987. Influence of biological and chemical protective treatment on the epiphytic populations of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* on tomato leaves. Review of Plant Pathology 66:4476.

- COLYER, P. D., and MOUND, M. S., 1984. Bacterization of potatoes with *Pseudomonas putida* and its influence on postharvest soft rot diseases. *Plant Diseases* 68:703-706.
- CONLIN, K. C., and MCCARTER, S. M., 1983. Effectiveness of selected chemicals in inhibiting *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* in vitro and in controlling bacterial speck. *Plant Disease* 67:639-644.
- COOKSEY, D. A., 1986. Inducibility of copper resistance in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *Phytopathology* 76:1076.
- CUPPELS D. A., 1983. Isolation and characterization of phages useful for identifying in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *Phytopathology* 73:1376-1382.
- \_\_\_\_\_, 1994. The use of pathovar-indicative bacteriophages for rapidly detecting *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* in tomato leaf and fruit lesions. *Phytopathology* 74:891-894.
- ÇINAR, A., 1983. Toprak solarizasyonu. Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Teknik Bülteni.
- ÇINAR, Ö., 1977a. Akdeniz Bölgesi domateslerinde bakteriyel bir hastalık. *Bitki* 4(2):282-288.
- \_\_\_\_\_, 1977b. Doğu Akdeniz Bölgesi domateslerinde görülen bakteriyel kara leke hastalığı etmeni (*Pseudomonas tomato* Okabe)' nin biyokimyasal yöntemlerle tanımı. Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yıllığı, 8(4):288-296.
- \_\_\_\_\_, 1978. Anfälligkeit verschiedener sorten von *Lycopersicon esculentum* Mill gegenüber *Pseudomonas tomato* (Okabe) Alstatt. *J. Turkish Phytopath.* 7(2-3):75-81.
- \_\_\_\_\_, and BİÇİCİ, M., 1985. The group studies investigating various methods as an alternative to chemical control measures for pathogenic fungi. *J.Turk. Phytopat.* 14(3):88-89.
- \_\_\_\_\_, ve AYSAN, Y., 1995. Domates bakteriyel leke etmeninin (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* ) canlılığı üzerine toprak solarizasyonunun etkisinin ve biyolojik kontrolde antagonistlerin kullanılma olanaklarının araştırılması. 7. Türkiye Fitopatoloji Kongresi, 26-29 Eylül, Adana. 423-425.

- ÇÖKMÜŞ, C., 1984. Bazı domates çeşitlerinin *Pseudomonas tomato* 'ya karşı reaksiyonları üzerinde araştırmalar. Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi.
- DENNY, T. P., 1988. Differentiation of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* from *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* with a DNA hybridization probe. *Phytopathology* 78:1186-1193.
- DE VAY, J. E., 1997. Soil solarization : past, present, and future. Second International Conference on Soil Solarization and Integrated Management of Soilborne Pests. March 16-21, ICARDA, Aleppo, Syria. Abstract no 1.
- DEVASH, Y., OKON, Y., and HENIS, Y., 1980. Survival of *Pseudomonas tomato* in soil and seeds. *Phytopath. Zeitsch.* 99:175-185.
- DEVLET İSTATİSTİK ENSTİTÜSÜ, 1996. Tarımsal Yapılar ve Üretim, DİE. T. C. Başbakanlık Devlet İstatistik Matbaası, Ankara.
- DOĞAN, N., 1995. Yerfistğinde gövde çürüklüğü (*Sclerotium rolfsii* Sacc.) hastalığına karşı solarizasyonun etkinliğinin araştırılması. Çukurova Üniversitesi Fenbilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi.
- EL-ABYAD, M. S., EL-SAYED, M. A., EL-SHANSHOURY, A. R., and EL-SABBAGH, S. M., 1993. Towards the biological control of fungal and bacterial diseases of tomato using antagonistic *Streptomyces* spp. *Plant and Soil* 149:185-195.
- ELAD, Y., 1990. Reasons for the delay in development of biological control of foliar pathogens. *Phytoparasitica* 18(2):99-105.
- ERKAN, S ve SAYGILI, H., 1987. The preliminary studies on the isolation of the bacteriophages of some phytopathogenic bacteria. *J. Turk. Phytopathol.*, 16(2):71-76.
- ERKILIÇ, A., ÇINAR, Ö., and AYSAN, Y., 1994. Effects of soil solarization and chemical methods on bacterial speck (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) on tomato. 9<sup>th</sup> congress of the Mediterranean Phytopathological Union, 18-24 September, Kuşadası-Aydın, Türkiye. 397-399.

- GETZ, S., STEPHENS, C. T., AND FULBRIGHT, D. W., 1981. Winter survival of *Pseudomonas tomato* in Michigan. *Phytopathology* 71:218.
- GITAITIS R. D., JONES, J. B., and MCCARTER, S. M., 1986. Evaluation of chemical control of bacterial disease of tomato. In : *Methods for Evaluating Pesticides for Control of Plant Pathogens*. 205-209. APS Press , The American Phytopathological Society 312p.
- GOODE, M. K. and SASSER, M., 1980. Prevention- the key to controlling bacterial spot and bacterial speck of tomato. *Plant Disease* 64:831-834.
- JARDINE, D. J., and STEPHENS, C. T., 1987. Influence of timing of application and chemical on control of bacterial speck of tomato. *Plant Disease* 71:405-408.
- \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, and FULBRIGHT, D. W., 1988. Potential sources of initial inoculum for bacterial speck in early planted tomato crops in Michigan : debris and volunteers from previous crops. *Plant Disease* 72:246-249.
- JONES, J. B., MCCARTER, S. M., and SMITLEY, D. R., 1981. A vacuum infiltration technique for detecting *Pseudomonas tomato* in soil and plant tissue. *Phytopathology* 71:1187-1190.
- \_\_\_\_\_, DAVE, D. L., and MCCARTER, S. M., 1983. Separation of strains of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* into serovars by three serological methods. *Phytopathology* 73:573-576.
- \_\_\_\_\_, GITAITIS, R. D., and MCCARTER, S. M., 1985. Fluorescence on single carbon sources of fluorescent pseudomonads for separation of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* from *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* on tomato transplants. *Plant Diseases* 70:151-153.
- \_\_\_\_\_, MCCARTER, S. M., and GITAITIS, R. D., 1989. Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* in tomato. In : *Detection of Bacteria in Seed and Other Planting Material* (Seattler, A. V., Schaad, N. W., and Roth, D. A. Edits.). 50-58. APS Press, The American Phytopathological Society St. Paul, Minnesota.
- JURCHAK, T. B., MACNAB, A. A., and LUKEŽIĆ, F. L., 1982. A speck not trifling but action solves problem. *Review of Phytopathology*. 62(9):3996.

- KAAYA, N. A. K. F. and MORTENSEN, C. N., 1993. Evaluation of a testing method in the detection of phytopathogenic bacteria in tomato seeds. First ISTA Plant Disease Committee, Symposium on Seed Health Testing, August 9-11, Ottawa-Canada, 23-30.
- KARACA, İ. ve SAYGILI, H., 1982. Batı Anadolu'nun bazı illerinde domates ve biberde görülen bakteriyel hastalıkların oranı, etmenleri ve konukçu çeşitlerinin duyarlılığı üzerinde araştırmalar. 3. Türkiye Fitopatoloji Kongresi, 12-15 Ekim, Adana, 182-192.
- \_\_\_\_\_, ve DEMİR, G., 1988. Investigations on seedborne bacterial pathogens in some plants. . Doğa-Tr. J. of Agriculture and Forestry. 12(2):120-131.
- KARMAN, M., 1971. Bitki Koruma Araştırmalarında Genel Bilgiler. Denemelerin Kuruluşu ve Değerlendirme Esasları. T.C. Tarım Bakanlığı Zirai Mücadele ve Zirai Karantina Genel Müdürlüğü Yayınları. 279s.
- KATAN, J., 1980. Solar pastozization of soil for disease control : status and prospects. Plant Disease 64(5):450-454.
- \_\_\_\_\_, 1989. Soil solarization : Present status and future prospects. International Symposium on New Applications of Solar Energy in Agriculture. Abstract no.1.
- KERR, E. A., BEER, S. V., SCHROTH, M. N., and BAHME, J. B., 1990. Biological control. In : Methods in Phytobacteriology (Klement, Z., Rudolph, K., and Sands, D. C. Edits) 369-379. Academia Kiado, Budapest 567p.
- \_\_\_\_\_, and COOK, F. I., 1983. Ontario 7710-a tomato breeding line with resistance to bacterial speck, *Pseudomonas syringae* pv .tomato (OKABE). Can. J. Plant Science 63:1107-1109.
- KIM, S. II., 1979. Dissemination of seed-borne *Pseudomonas tomato* by transplants. Phytopathology 79:535.
- KING, E. O., WARD, M. K., and RANEY, D. E., 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluoresin. J. Lab. Clin. Med. 44:301-307.
- KLOPPER, J. M., SCHIRTH, M. N., and MILLER, T. D., 1980. Effects of rhizosphere colonization by plant growth promoting rhizobacteria on potato plant development and yield. Phytopathology 70:1078-1082.

- KRITZMAN, G., 1991. A method for detection of seed borne bacterial diseases in tomato seeds. *Phytoparasitica* 19(2):133-141.
- \_\_\_\_\_, 1993a. The need for standard methods for detection of bacteria in tomato seeds. First ISTA Plant Disease Committee, Symposium on Seed Health Testing, August 9-11, Ottawa-Canada, 31-33.
- \_\_\_\_\_, 1993b. A chemi-thermal treatment for control of seedborne bacterial pathogens of tomato. *Phytoparasitica* 21(2):101-109.
- \_\_\_\_\_, 1994. Detection of bacteria in seed. *Phytoparasitica* 22(1):52-53.
- KUDELA, V., TICHA, H., and SUECOVA, M., 1984. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* in Czechoslovakia. *Rev. of Plant Pathology* 65(11):5123.
- LATEROT, H., and RAT, B., 1981. Efficacite de l'origine Canadienne de Resistance a *Pseudomonas tomato*, Genetique et selection de la tomato. Proceeding of the meeting of the Eucarpia Tomato Working Group, Avignon, 157-266.
- LATORRE, B., and LOLAS, M., 1988. Identification of bacterial speck and bacterial spot of tomato. *Ciencia-e-Investigacion Agraria*. 15(3):151-157.
- LAWTON, M. B. and MACNEIL, B. H., 1986. Occurrence of race 1 of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* on field tomato in south western Ontario. *Canadian Journal of Plant Pathology* 8:85-88.
- LELLIOTT, R.A. and STEAD, D. E., 1987. Media and methods. In : Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. 169-199. Oxford London Edinburg.
- MACNAB, A. A., 1980. Tomato bacterial speck and early blight control with fungicides. In : Fungic. Nematic. Tests. 36:161. Ontario.
- MARIANO, R. L. R. and MC CARTER, S. M., 1992. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Pseudomonas viridiflava* : survival on seeds and epiphytic growth on tomato seedlings originated from contaminated seeds. *Summa Phytopathologica* 18:247-254.
- MAVRIDIS, A. and RUDOLPH, K., 1981. Bacterial speck of tomato [*Pseudomonas tomato* (Okabe) Alstatt] in Greece. Characterization of isolates by physiological features and production of chlorosis-inducing toxin. *Proc. Fifth. Int. Conf. Plant Path. Bact.*, California. 45-53.

- MC CARTER, S. M., JONES, J. B., GITAITIS, R. D., and SMITLEY, D. R., 1983. Survival of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* in association with tomato seed, soil, host tissue and epiphytic weed hosts in Georgia. *Phytopathology* 73:1393-1398.
- MCLAUGHLIN, R. J. and CHIEN, T. A., 1990. ELISA methods for plant pathogenic prokaryotes. 197-204. In : *Serological Methods for Detection and Identification of Viral and Bacterial Plant Pathogens*. (Edts. Hampton, R., Ball, E., and DeBoer, S.). APS Press The American Phytopathological Society St. Paul Minnesota, USA. 389p.
- MEW, T.W., VERA CRUZ, C. M., and MEDALLA, E. S., 1992. Changes in race frequency of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in response to rice cultivars planted in Phillippines. *Plant Diseases* 76:1029-1032.
- MITCHEL, R. E., 1992. Metabolites from pseudomonads that inhibit the growth of *Erwinia amylovora*. Sixth Int. Workshop on Fire Blight, Athens, Greece. 21.
- NABIZADEH-ARDEKANI, F., KOOPMAN, B., and RUDOLPH, K., 1995. Detection of bacterial diseases of tomatoes by the polymerase chain reaction (PCR) and serology. International Symposium 75 Years of Phytopathological and Resistance Research at Aschersleben. 12-16 June, Aschersleben, Germany. 251-254.
- NAUMANN, K., KARL, H., GIERZ, E., and GRIESBACH, E., 1986. On the detection of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, the causal agent of the bacterial speck disease, on tomato seeds. *Review of Plant Pathology* 66:1142.
- \_\_\_\_\_, and GRIESBACH, E., 1990. Recent findings on the prevention and control of bacterial diseases of vegetables. *Review of Plant Pathol.* 69(12)7909.
- NORELLI, J., and ALDWINCKLE, H., 1992. Orchard evaluation of chemical and biological spray materials to control fire blight. *Acta Horticulture* 338:363-368.
- OKON, Y., BASHAN, Y., and HENIS, Y., 1978. Studies of bacterial speck of tomato caused by *Pseudomonas tomato*. *Proc. 4 th Int. Conf. Plant Path. Bact.*, Angers. 699-702.

- \_\_\_\_\_, DEVASH, Y., YUNIS, H., GOK, B., BASHAN, Y., and HENIS, Y., 1979. Physiology, epidemiology, and control of *Pseudomonas tomato*, causal agent of bacterial speck of tomato. *Phytoparasitica* 7:1.
- OLIVERIA, M. H. M. C. F. C. ve De SANTA-MARTA, J. M. C. D., 1985. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, a new bacterial disease of tomato in Portugal. *Rev. of Plant Pathology*. 65(11):5123.
- ÖKTEM, Y. E., 1985. Domates çeşitlerinin *Corynebacterium michiganense* 'ye karşı duyarlılıklarının tespiti üzerinde çalışmalar. 4. Türkiye Fitopatoloji Kongresi, 8-11 Ekim, İzmir, 18s.
- ÖZAKTAN, H., 1991. Domates Bakteriyel Solgunluğu (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) ile savaşım olanakları üzerinde araştırmalar. Ege Üniversitesi Fenbilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilin Dalı, Doktora Tezi.
- \_\_\_\_\_, ÖDEN, S., ve DELEN, N., 1991. Domates bakteriyel benek hastalığı etmenine bazı bakırlı preparatların etkileri üzerinde araştırmalar. 6. Türkiye Fitopatoloji Kongresi, 7-11 Ekim, İzmir. 291-294.
- PALA, H., 1987. Çileklerde kök çürüklüğü etmeni ve antagonistlerin saptanması, hastalık çıkışı üzerine toprak solarizasyonunun etkisinin araştırılması. Çukurova Üniversitesi Fenbilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilin Dalı, Doktora Tezi.
- PEREZ, J. M., PENNYPECKER, S. D., and LUKEZIC, F. L., 1987. Overwintering of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* in Pennsylvania. *Phytopathology* 77:988-989.
- PERNEZNY, K., KUDELA, V., KOKOSKOVA, B., and HLADKA, I., 1995. Bacterial diseases of tomato in the Czech and Slovak Republics and lack of streptomycin resistance among copper-tolerant bacterial strains. *Crop Protection* 14(4):267-270.
- PITBLADO, R. E., and SHANKS, A. K., 1980. Copper fungicide combinations for the control of tomato foliar disease. *Fungic. Insectic. Tests. Ontario*.
- \_\_\_\_\_, and KERR, E. A., 1980. Resistance to bacterial speck (*Pseudomonas tomato*) in tomato. *Acta Hort.* 100:379-382.

- PYKE, N. B., MILNE, K. S. and NEILSON, H. F., 1984. Tomato seed treatments for the control of bacterial speck. *Review of Plant Pathology* 64:2162.
- RAMOS, R. S., SINIGAGLIA, C. and CHIBA, S., 1989. Chemical control of bacterial speck (*Pseudomonas tomato*) of tomato. *Biologica* 55(1-2):1-3.
- RHODES, M.E., 1959. The characterization of *Pseudomonas fluorescens*. *J. Gen. Microbiol.* 21.
- ROVIRA, A., RYDER, M. and HARRIS, 1992. Biological control of root disease with *Pseudomonas*. In: *Biological Control of Plant Disease* (Tjamos, E. C., Papavizas, G. C., and Cook, R.J. Edits). Plenum Press, New York.
- SALCEDO, G., RAMIREZ, M. E., FLORES, C., and GALINDO, E., 1992. Preservation of *Xanthomonas campestris* in *Brassica oleracea* seeds. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37: 723-727.
- SALI, G., 1994. Producing healthy seeds. *Phytoparasitica* 22(1):50-51.
- SAYGILI, H., 1975. Investigation on new bacterial disease of tomatoes in Ege. *The Journal of Turkish Phytopathology* 4:83-88.
- \_\_\_\_\_, KÖSEOĞLU, T., DEMİR, G., 1985. Batı Anadolu Bölgesi domates ekim alanlarında hastalık etmeni olan bakterilerin toprakta yaşam durumları ve kullanılan suni gübrelerin bu etmenlere etkileri üzerinde araştırmalar. *Doğa Bilim Dergisi*, D2, 9(3):367-383.
- SCHAAD, N. W., 1982. Detection of seed borne bacterial plant pathogens. *Plant Disease* 66 (10):885-890.
- SCHNEIDER, R. W. and GROGAN, R. G., 1977. Bacterial speck of tomato : Sources of inoculum and establishment of a resident population. *Phytopathology* 64:388-394.
- SCORTICHINI, M., 1990. Diagnosis of seedborne bacterial diseases. *Petria* 1, Suplemento 1, 31-45.
- SHARON, E., OKON, Y., BASHAN, Y., and HENIS, Y., 1982. Detected leaf enrichment : a method for detecting small numbers of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in seed and symptomless leaves of tomato and pepper. *Journal of Applied Bacteriology* 53:371-377.

- SHERF, A. F., and MACNAB, A. A., 1986. Bacterial speck. In : Vegetable Diseases and Their Control. 610-614. A Wiley-Interscience Publication. 728 p.
- SIVIERO, P., 1991. Tomato seed disinfection from bacteria and TomMV. *Informatore Agrario* 47(5):61-74.
- SMITLEY, D. R., and MCCARTER, S. M., 1982. Spread of of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and role of epiphytic populations and environmental conditions in disease development. *Plant Disease* 66:713-717.
- SOBICZEWSKI, P., 1987. Antagonistic bacteria in relation to *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* occurring in necroses and cankers of sour cherry trees. *Fruit Science Reports* 14(4):179-185.
- STAPLETON, J. J. and DE VAY, J. E., 1982. Effects of soil solarization on the populations of selected soilborne microorganisms and growth of deciduous fruit tree seedlings. *Phytopathology* 72:323-326.
- \_\_\_\_\_, and \_\_\_\_\_, 1986. Soil solarization : a non-chemical approach for management of plant pathogens and pests. *Crop Protection* 5(3):190-198.
- \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, and LEERT, B., 1991. Simulated and field effects of amonia-based fertilizers and soil solarization on pathogen survival, soil fertility and crop growth. *FAO Plant Production and Plant Protection Paper* 301-342.
- STOCKINGER, E. J. and WALLING, L. L., 1994. *Pto3* and *Pto4* : novel genes *Lycopersicon hirsutum* var. *glabratum* that confer resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *Theor. Appl. Genet.* 89:879-884.
- TAMIETTI, G., and CUGUDDO, L., 1987. Note on epidemics caused by *Pseudomonas tomato* in Italy by two plant pathogenic bacteria on tomatoes grown under cover. *EPPO Bulletin* 17 (2) 295-297.
- TJAMOS, E., 1995. Biological control of plant diseases : A possible mission. *J. Turk. Phytopath.* 24(2)83-92.
- XU, G. W., and GROSS, D. C., 1986. Selection of fluorescent *Pseudomonads* antagonistic to *Erwinia carotovora* and suppressive of potato seed piece decay. *Phytopathology* 76:414-422.

- VARVARO, L., FANIGLIULO, R., and BABELEGOTO, N. M., 1993. Transmission electron microscopy of susceptible and resistant tomato leaves following infection with *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. J. Phytopath. 138:265-273.
- VOLKANI, Z., ZUTRA, D., and COHEN, R., 1971. Bacterial speck of tomato. Hassadeh 51:751-753.
- WILKIE, J. P. and DYE, D. W., 1974. *Pseudomonas tomato* in New Zealand. N. Z. J. Agric Res 17:131-135.
- WILSON, M., 1996. An integrated biological control strategy for foliar bacterial diseases on tomato. International Conference : Technology Transfer in Biological Control : From Research to Practice, 9-11 September, Montpellier, France.
- \_\_\_\_\_, MOSS, W. P., CAMPBELL, H. L., WANG, S. Y., JI, P., BYRNE, J. M., and JONES, J. B., 1997. Molecular approaches involved in the development of biocontrol agents of bacterial speck and spot of tomato. IOBC/OILB European Foundation for Plant Pathology, Biological Control Working Group, Molecular Approaches in Biological Control, 15-18 September, Delemont, Switzerland.
- YILDIZ, M., YILDIZ, F., ve DELEN, N., 1991. Türkiye' de sera domateslerinde kök hastalıkları etmenlerinin saptanmasına yönelik çalışmalar. VI. Türkiye Fitopatoloji Kongresi Bildiri Özetleri. 7-11 Ekim 1991, İzmir, s. 40.
- YORGANCI, Ü., ERKAN, S., ÖZAKTAN, H., and ESER, B., 1994. Detection of the agents of viral and bacterial diseases in seeds of paper, tomato, eggplant, cucumber, and their inactivation ways. 9<sup>th</sup> Congress of the Mediterranean Phytopathological Union, Kuşadası, Aydın, TÜRKİYE, 1994. 37-39.
- YUNIS, H., BASHAN, Y., and HENIS, Y., 1980. Weather dependence, yield losses, and control of bacterial speck of tomato caused by *Pseudomonas tomato*. Plant Disease 64:937-939.
- YÜCEL, S., 1987. Domateste Fusarium Solgunluğuna karşı biyolojik kontrolde antagonistlerin ve toprak solarizasyon uygulamasının karşılıklı etkileşimlerinden yararlanm olanakları üzerinde araştırmalar. TÜBİTAK, TOAG-543.

## ÖZGEÇMİŞ

1970 Adana doğumluyum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Adana'da tamamladım. 1986 yılında Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümünde lisans öğrenimime başladım ve 1990 yılında mezun oldum. Aynı yıl Ç. Ü. Fen Bilimleri Enstitüsünde yüksek lisans çalışmaya başladım. “Turunçgil Dal Yanıklığı Hastalığı Etmeninin (*Pseudomonas syringae* pv. *syringae* van Hall) Tanımı ve Etmene Karşı Turunçgil Çeşitlerinin Dayanıklılığının Saptanması” isimli yüksek lisans tezimi 1993 yılında tamamladım. Aynı yıl aynı enstitüde doktora programına başladım. Ekim 1995-Şubat 1996 tarihleri arasında Georg-August Üniversitesi, Göttingen (Almanya)'de “Domates Bakteriyel Hastalık Etmenlerinin Serolojik (ELISA, western blot) ve Moleküler (PCR) Yöntemlerle Tanısı” konusunda çalışmalar yaptım. Ayrıca Mayıs 1997-Ocak 1998 tarihleri arasında Çukurova Üniversitesi ile Volcani Center (ARO, İsrail) arasındaki bilimsel iş birliği çerçevesinde İsrail'de Plant Pathology Bölümünde “Patates Bakteriyel Hastalık Etmenlerine (*Erwinia* yumuşak çürüklükleri ve *Streptomyces* spp) Karşı Biyolojik Kontrolün Kullanma Olanaklarının Araştırılması” ve “Domates Bakteriyel Etmenlerin ELISA ve Yağ Lipit Analizleri İle Tanısı” isimli konularda araştırmalar yaptım. 1991 yılından beri Bitki Koruma Bölümünde araştırma görevlisi olarak çalışmaktayım. Evli ve bir çocuk annesiyim.

### **EK : Kullanılan Besi Yerleri ve İçerikleri**

Kullanılan besi yerleri 121°C'deki otoklavda 15 dakika steril edildikten sonra kullanılmıştır.

#### **King's Medium B (KB) (King ve ark, 1954)**

|                                      |         |
|--------------------------------------|---------|
| Proteose pepton                      | 20 g    |
| Gliserin                             | 8.0 ml  |
| K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>       | 1.5 g   |
| MgSO <sub>4</sub> x7H <sub>2</sub> O | 1.5 g   |
| Agar                                 | 15 g    |
| Distile su                           | 1 litre |

#### **Yeast extract dextrose calsiyum carbonat agar (YDCA) (Lelliott ve Stead, 1987)**

|                   |         |
|-------------------|---------|
| Yeast extract     | 10 g    |
| CaCO <sub>3</sub> | 20 g    |
| D-glikoz          | 20 g    |
| Agar              | 15 g    |
| Distile su        | 1 litre |

#### **Yeast Pepton Sodium Chloride (YPS) (Rhodes, 1959)**

|               |         |
|---------------|---------|
| Yeast extract | 3 g     |
| Pepton        | 10 g    |
| NaCl          | 5 g     |
| Distile su    | 1 litre |

YATIRIMCI BANKASI  
KURUMSAL MENKUL DEĞERLER  
YATIRIM MENKUL DEĞERLER A.Ş.