



## Nanopartiküller, Bitki Aktivatörü ve Bazı Kimyasalların Domates Bitkilerinde Bakteriyel Kanser ve Solgunluk Hastalığının Baskılanması Üzerine Antibakteriyel Etkisi

Omar Hatif ABDULRAZZAQ<sup>1</sup>, Benian Pınar AKTEPE<sup>2</sup>, Yeşim AYSAN<sup>3\*</sup>

<sup>1,3</sup> Cukurova University, Faculty of Agriculture, Department of Plant Protection, 01330, Adana, Türkiye

<sup>2</sup> Osmaniye Korkut Ata University, Kadirli Applied Sciences Faculty, Department of Organic Agricultural Management, 80760, Osmaniye, Türkiye

<sup>1</sup><https://orcid.org/0000-0002-2258-2430>

<sup>2</sup><https://orcid.org/0000-0002-4731-9954>

<sup>3</sup><https://orcid.org/0000-0003-2647-5111>

\*Sorumlu yazar: aysanys@gmail.com

### Araştırma Makalesi

### ÖZ

#### Makale Tarihi:

Geliş tarihi: 01.12.2023

Kabul tarihi: 11.02.2024

Online Yayınlanma: 16.09.2024

#### Anahtar Kelimeler:

Nanopartikül

*Clavibacter michiganensis* subsp.

*michiganensis*

SPP

DOT

Bakteriyel kanser ve solgunluk hastalığına neden olan *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*) domateste önemli bir patojendir. Bu çalışmada iki farklı metal nanopartikül [nano gümüş (AgNps) ve nano bakır (CuNps)], bitki aktivatörü (ISR-2000), bakır hidroksit ve iki yeni kimyasal bileşiğin [sodyum pentaborate pentahidrat (SPP), disodyum octaborate tetrahidrat (DOT)] hastalık üzerine olan baskılayıcı etkisi araştırılmıştır. Nanopartiküller (AgNps ve CuNps) hariç diğer dört uygulama hastalık çıkışını *in vivo* koşullarda baskılamada başarı göstermiştir. ISR-2000 ve bakır hidroksit uygulamaları domates bitkisinde hastalık çıkışını sırasıyla %78 ve %46 oranında baskılayan en başarılı uygulamalar olarak belirlenmiştir. SPP ve DOT uygulamaları hastalık çıkışını %28 ve %33 oranlarında baskılayan diğer başarılı uygulamalar olmakla birlikte domates yapraklarında fitotoksik etki göstermiştir. Bu nedenle SPP ve DOT içerikli kimyasallar, pestisitlerin aktif maddelerine eklenerek pestisitlerin etkisi artırılabilir ancak daha detaylı araştırmalara ihtiyaç olduğu açıktır. Nanopartiküller (AgNps ve CuNps) *in vitro* denemelerde umut verici antibakteriyel sonuçlar verirken, *in vivo* denemelerde aynı etkiyi göstermemiştir. Bu sonuçlar bitki aktivatörlerinin bakteriyel enfeksiyonu baskılamada en başarılı uygulama olduğunu göstermektedir. Bu uygulamalar özellikle kimyasallara direnç geliştirmiş patojenlere karşı alternatif, çevreye dost uygulamalar olarak büyük önem taşımaktadır.

## Antibacterial Effect of Nanoparticles, Plant Activator and Some Chemicals on Suppression of Bacterial Cancer and Wilt Disease in Tomatoes

### Research Article

### ABSTRACT

#### Article History:

Received: 01.12.2023

Accepted: 11.02.2024

Published online: 16.09.2024

#### Keywords:

Nanoparticules

*Clavibacter michiganensis* subsp.

*michiganensis*

SPP

DOT

*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*), causal agent of Bacterial Canker and Wilt Disease are the important pathogens in tomatoes. In this study, the effects of two different nanoparticles [nano silver (AgNps) and nano copper (CuNps)], a plant activator (ISR-2000), copper hydroxide (a commercial fungicide, Kocide 2000) and two new chemical compounds [sodyum pentaborate pentahidrat (SPP), disodyum octaborate tetrahidrat (DOT)] were investigated on Suppression of Bacterial Canker and Wilt diseases in tomatoes. Except for nanomaterials (AgNps and CuNps), four other applications were successful in suppressing the disease. ISR-2000 and copper hydroxide applications were determined as the most successful applications by suppressing Bacterial Wilt Disease in tomato plants by 78% and 46%, respectively, and were in the same statistical group. SPP and DOT were the other

successful treatments that suppressed disease emergence by 28% and 33%, but showed phytotoxic effects on tomato leaves. For this reason, chemicals containing SPP and DOT can be added to the active ingredients of pesticides to increase the effect of pesticides, but more detailed research is needed. While nanoparticles (AgNps and CuNps) gave promising antibacterial results in *in vitro* trials, they could not show the same effect in *in vivo* trials. Nanoparticles were evaluated as unsuccessful because they were statistically in the same group as the positive control. These results show that plant activators are the most successful application in suppressing bacterial infection. These applications are of great importance as alternative, environmentally friendly applications, especially against pathogens that have developed resistance to chemicals.

**To Cite:** Abdulrazzaq OH., Aktepe BP., Aysan Y. Nanopartiküller, Bitki Aktivatörü ve Bazı Kimyasalların Domates Bitkilerinde Bakteriyel Kanser ve Solgunluk Hastalığının Baskılanması Üzerine Antibakteriyel Etkisi. *Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi* 2024; 7(4): 1526-1539.

## 1. Giriş

*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in (*Cmm*) ((Smith) Davis et al.) (EPPO,2022) neden olduğu Bakteriyel Solgunluk ve Kanser Hastalığı domateste (*Solanum lycopersicum*) en tahripkar hastalıklardan biridir (Sen ve ark., 2018). Hastalık ilk kez 1909 yılında Kuzey Amerika'da tanımlanmıştır ve şu anda domates üretiminin tüm alanlarında mevcut olup EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization) bölgesinde oldukça yaygın bir şekilde ortaya çıkmaktadır (EPPO, 2016). Domates üretim alanlarında üreticilerin korkulu rüyası durumunda olan bir iletim demeti hastalığıdır. Patojen bakteri bulaşık tohum ve fidelerle üretim alanına gelmekte, bitkinin tüm yeşil aksamında ve meyvelerinde hastalık belirtileri oluşturarak verimi azaltmaktadır. Patojen; hareketsiz, 20°C ile 30°C arasındaki sıcaklıklarda gelişen gram pozitif bir bakteridir. Bu iletim demeti patojeni bakteri, genellikle köklerden, yaprakta tüylerin kırılması sonucu açılan yaralardan ve yapraktaki doğal açıklıklardan bitkiye giriş yaparak ksileme ilerlemekte ve bitki içinde çoğalmaktadır. Bitkide artan popülasyona bağlı olarak, iletim demetlerinde renk değişimi, yapraklarda solgunluk ve sapta kanser olarak adlandırılan açık yara belirtileri ortaya çıkmaktadır (de León ve ark. 2011;Blank ve ark., 2016). Sistemik bir enfeksiyon sırasında bitkiler ilk başta herhangi bir belirti göstermeyebilir. Patojen yüksek bir seviyeye ( $10^9$ - $10^{10}$  hücre/ml) ulaştığında belirtiler 6-8 hafta sonra ortaya çıkar (de León ve ark. 2011). Hastalığın ilk aşamalarında suyun yukarıya taşınması engeller ve solgunluk gözlenir (Eichenlaub ve Gartemann 2011). Üretim alanında sekonder yayılmalar sonucu, bakteri yapraklardaki yaralardan giriş yaptığında yaprak yanıklıkları gözlenir. Etkilenen meyvelerde ise belirtiler küçük, hafif kabarık, beyaz kenarlı veya haleli lezyonlar şeklinde ortaya çıkabilir. Bu lezyonların çapı birkaç milimetreye kadar büyüyebilir ve “kuş gözü” olarak bilinen kahverengi, pürüzlü merkezler geliştirebilir. Meyve salkımlarında kalipse yakın birçok lezyon oluşabilir. Kaliks izinin altında damar dokuları ve tohumlara giden dokular koyu sarıdan kahverengiye kadar değişen renklerde olabilir (Ahmad ve ark. 2015; Aysan ve ark., 2019; Mirik ve Altın, 2020).

Bitki hastalıklarına neden olan patojenler, tarımsal üretimde verimliliği olumsuz etkileyerek ekonomik ve çevresel zararlara yol açabilen önemli bir tehdit oluşturmaktadır (Mahapatra ve ark., 2022). *Cmm*, oluşturduğu ciddi ekonomik tehdit nedeniyle EPPO tarafından karantina organizması olarak

sınıflandırılmıştır (EPPO, 2016). Patojenin yayılması, bulaşık tohumların ve fidelerin kullanımıyla olduğu kadar *Cmm* ile enfekte toprak, alet ve ekipman yoluyla meydana geldiğinden, mücadelede kültürel, biyolojik ve kimyasal uygulamaları kapsayan entegre hastalık yönetimi son derece önemlidir. Hastalık mücadelesinde en etkili uygulamalar olarak fiziksel, kimyasal ve biyolojik tohum uygulamaları, yeşil aksama bakır bileşiklerin püskürtülmesi, üretimin her aşamasında hijyen kurallarına uyulması ve toprak solarizasyonu önerilmektedir (Hausbeck ve ark., 2000; Kasselaki ve ark., 2011; de Le on ve ark., 2008; Werner ve ark., 2002). Bu patojen bakteriyi etkili bir şekilde baskılayan tek bir uygulama maalesef yoktur. Yoğun pestisit kullanımıyla bitkide fitotoksite problemleriyle karşılaşmakta veya patojen kimyasallara direnç geliştirmektedir (de Le on ve ark., 2008). Alınacak tüm önlemler bakteriyel etmenin bitki içerisine girişini önleme veya bitkinin hastalıklara karşı direncini artırma üzerine olmalıdır.

Son yıllarda bitkilerin pek çok patojene karşı savunma mekanizmasını aktive eden bitki aktivatörlerinin, organik/inorganik gübrelerin ve bazı kimyasalların kullanımı üzerine pek çok araştırma yapılmıştır (Soylu ve ark., 2003; Çetinkaya Yıldız ve Aysan, 2014; Karaca ve ark., 2016). Ayrıca bitki patojen bakterilerle bakteriyofaj içerikli biyolojik mücadele araştırmaları da umut verici bir alternatif olarak görülmektedir (Jones ve ark., 2007; Cemen ve ark., 2018). Bunların yanında kimyasalları çok küçük partiküllerde hazırlayarak bitkinin içine daha iyi girişini sağlayan nanoteknolojik yöntemler de kullanılmaya başlanmıştır (Vijayakumar ve ark., 2019). Bitki patolojisi literatüründe henüz yeni incelenmeye başlamış olan çinko, bakır, gümüş gibi birçok metal bazlı nanopartiküller, bitkilerde tohum büyümesini, çimlenmesini ve biyotik stres faktörleriyle mücadelede kullanılmaktadır (Elmer and White, 2018; Shukla ve ark., 2019; Noshad ve ark., 2020; Mishra ve ark., 2020; Şahin et al., 2021; Atiq ve ark., 2022; Méndez-Andrade ve ark., 2022; Soylu ve ark., 2022; Şahin et al., 2022). Nanopartiküller, bir veya daha fazla boyutu 1 ila 100 nm arasında olan bir malzemedir. Bu tanım, nanopartiküller olarak hem sentetik hem de doğal kompozitlerin/malzemelerin geniş bir yelpazesine olanak sağlamıştır. Nanopartiküller, volkanik toz ve okyanus tuzu spreylere de dahil olmak üzere birçok formda doğal olarak oluşur (Frewer ve ark., 2011). Nanopartiküllerin küçük boyutları ve yüzey alanı/hacim oranının büyük olması nedeniyle, küçük moleküllü ilaçlar, DNA, RNA, proteinler ve problemler gibi maddeleri etkili bir şekilde bağlayabilir, entegre edebilir ve emebilirler (Albanese ve ark., 2012).

Bu çalışmada iki farklı metal nanopartikül [nano gümüş (AgNps) ve nano bakır (CuNps)], bitki aktivatörü (ISR-2000), bakır hidroksit ve iki yeni kimyasal bileşiğin [sodyum pentaborate pentahidrat (SPP), disodyum octaborate tetrahidrat (DOT)] *Cmm*'in neden olduğu bakteriyel solgunluk ve kanser hastalığına etkisi araştırılmıştır.

## 2. Materyal ve Metot

### 2.1. Materyal

**Patojen bakteri:** Çalışmada kullanılan *Cmm* izolatu Çukurova Üniversitesi Fitobakteriyoloji laboratuvarı kültür koleksiyonundan temin edilmiştir.

**Nanopartiküller, bazı kimyasallar ve bitki aktivatörleri:** Çalışmada kullanılan tüm nanopartiküller bitki aktivatörü ve kimyasalların içeriği ve temin edildiği yer Tablo 1'de belirtilmiştir.

**Domates fideleri:** Saksı çalışmasında kullanılan Tutku F1 çeşidi ticari bir fidelik olan Atlas Fide'den temin edilmiştir.

**Tablo 1.** Denemelerde kullanılan nanopartiküller, bitki aktivatörü ve bazı kimyasallar

Materyal	Formülasyon	Kaynak
Nano Gümüş (AgNps)	Sıvı	Okhygiene Medikal ve
Nano Bakır (CuNps)	Sıvı	Kimyasal Ürünler
Disodyum Oktaborat Tetrahidrat (DOT)	Toz	Kozmetik San.Tic.Ltd
Sodyum Pentaborat Pentahidrat (SPP)	Granül	
ISR-2000 (855,81 g/l <i>Lactobacillus acidophilus</i> fermente ürünü, Yucca bitki ekstraktı, maya ekstraktı, riboflavin, benzoic acid, nicotinamide ve thiamine)	Sıvı	Improcrop USA
Bakır Hidroksit (%35 Metalik Bakıra Eşdeğer Bakır Hidroksit)	Granül	Corteva Agriscience

### 2.2. Metot

#### 2.2.1 Nanopartiküllerin, Bazı Kimyasalların, Bitki Aktivatörlerinin ve Patojen Popülasyonlarının Hazırlanması

Tablo 1'de görüldüğü gibi nanopartiküller ve kimyasallar firma beyanına göre belirtilen miktarda 50 ml besi yerine ilave edilmesiyle hazırlanmıştır. ISR-2000 ve bakır hidroksit ticari preparatları firma beyanına göre hazırlanmıştır.

King B besi yerinde 48 saat geliştirilen patojen bakteri izolatları spektrofotometrede 600 nm dalga boyunda 0,2 ölçüm değerinde hazırlanan süspansiyondan seyreltme serisi hazırlanmıştır. Söz konusu konsantrasyonun petrilere koloni sayımı yapılarak patojen popülasyonu  $10^8$  hücre/ml'ye eşit olduğu belirlenmiş ve çalışmada kullanılmıştır (Çetinkaya Yıldız ve Aysan, 2014; Yigenoglu ve ark., 2017).

#### 2.2.2. Domates Bitkilerinde Patojenite Testi

Uzun yıllar buzlukta saklanan *Cmm* izolatının virülensliğini arttırmak için iki domates bitkisi üzerinde patojenite testi yapılmıştır. Hazırlanan patojen solüsyonu domates bitkisinin gövdesine steril bir şırınga yardımıyla inokule edilmiştir. Enfekteli bitkiler oda sıcaklığında laboratuvarında tutulmuştur. Hastalık belirtileri gözlemlendikten sonra domates fideleri kesilerek iletim demetlerinde enfekteli

kısımdan re-izolasyonlar yapılarak Koch postülatları tamamlanmıştır. Elde edilen virülent re-izolat çalışmada kullanılmıştır.

### 2.2.3. Nanopartiküllerin, kimyasalların ve bitki aktivatörünün bakteriyel kanser ve solgunluk hastalığına *in vitro* koşullardaki Minimum İnhibisyon Konsantrasyonun (MİK) belirlenmesi

Nanopartiküller ve kimyasal malzemelerin *in vitro* koşullardaki Minimum İnhibisyon Konsantrasyonun (MİK) belirlenmesine yönelik çalışmalar disk difüzyon yöntemiyle yapılmıştır (Noshad ve ark., 2019). Dört kimyasalın ve patojen için üç konsantrasyon ve üç disk kullanılmıştır. TSA besi yeri içeren petrilere patojen süspansiyondan 100 µl eklenerek drigalski spatülüyle yayılmıştır. Petriler kuruduktan (yaklaşık 3 saat) sonra, 6 mm çapında yuvarlak steril kağıt disk birbirinden eşit uzaklıkta olacak şekilde petrilerin üç ayrı noktasına yerleştirilmiştir. Her bir kimyasal solüsyonundan 10 µl alınıp kağıt disk üzerine damlatılmıştır. Petriler 25°C’de 48 saat inkübe edildikten sonra kağıt disklerin çevresinde oluşan engelleme zonları mm olarak ölçülerek kayıt edilmiştir. İnhibisyon zonu ölçümlerine göre elde edilen verilerle CoStat İstatistik Yazılımında (CoHort Software, Pacific Grove, CA, ABD, Sürüm 6.4) ANOVA istatistik programıyla LSD çoklu karşılaştırma testiyle P<0,05 önem düzeyine göre uygulamalar arasındaki fark saptanmıştır.

### 2.2.4. Nanopartikül, kimyasal ve bitki aktivatörünün *in vivo* koşullarda bakteriyel kanser ve solgunluk hastalığı çıkışı üzerine etkisi

Nanopartiküllerin, kimyasalların ve bitki aktivatörünün Bakteriyel Kanser ve Solgunluk Hastalığına etkisinin araştırıldığı bu çalışma 08 Kasım 2022-24 Ocak 2023 tarihleri arasında Çukurova Üniversitesi, Bitki Koruma Bölümü Araştırma ve Uygulama Parseli’nde bulunan ısıtmasız cam serada (27±3°C) yapılmıştır. Denemede kullanılan Tutku F1 çeşidi domates fideleri 4-5 yapraklı dönemde içerisinde toprak bulunan 3kg’lık saksılara şaşırtılmıştır. Çalışma tesadüf blokları deneme desenine göre her uygulama 6 tekrarlı ve her tekrarda 1 bitki olacak şekilde toplam 48 bitki ile deneme kurulmuştur. Denemede kullanılacak nanopartiküller ve kimyasallar MIC’de belirlenen konsantrasyona göre, ISR-2000 ve bakır hidroksit üretici firmanın önerdiği dozda hazırlanmış ve Tablo 2’de belirtilen şekilde uygulanmıştır.

**Tablo 2.** Nanopartiküllerin, kimyasalların ve bitki aktivatörünün uygulama yöntemi

Uygulama zamanı	Uygulamalar	Uygulama şekli
1.Uygulama	ISR-2000	Fide şaşırtmadan önce 15 dk kök daldırma
1.Uygulamadan 1 gün sonra	ISR-2000	Yeşil aksama püskürtme
1.Uygulamadan 3 gün sonra	Nanopartiküller ve kimyasallar	Yeşil aksama püskürtme
1.Uygulamadan 6 gün sonra	Patojen inokulasyonu (10 <sup>8</sup> hücre/ml)	Gövdeye enjeksiyon
1.Uygulamadan 7 gün sonra	Tüm uygulamalar	Yeşil aksama püskürtme
1.Uygulamadan 14 gün sonra	Tüm uygulamalar	Yeşil aksama püskürtme

Hastalık belirtileri, son uygulamadan 21 gün sonra 0-4 skalası (Tablo 3) kullanılarak değerlendirilmiştir (Klement ve ark., 1990). Değerlendirme Hastalık İlerleme Eğrisi Altındaki Alan (AUDPC)'a göre beş günde bir 8 kez yapılmıştır. Elde edilen skala değerleri Tawsend-Heuberger formülünden (% Hastalık şiddeti:  $\Sigma(n.v)/V.N \times 100$ , n: Skalada belirli bir hastalık derecelerine denk gelen örnek miktarı, v: Skala değeri, V: En yüksek skala değeri, N: Gözlem yapılan toplam örnek sayısı) faydalanılarak hastalık şiddetine dönüştürülmüştür. Uygulamaların hastalık şiddetine % etkisi Abbott formülüne (% etki= (kontrol-uygulama) /kontrol)  $\times 100$ ) göre hesaplanmıştır (Karman, 1971; Zhou ve ark., 2023). Skala değerleri ve AUDPC verileri, CoStat İstatistik Yazılımında (CoHort Software, Pacific Grove, CA, ABD, Sürüm 6.4) varyans analizi (ANOVA) kullanılarak LSD çoklu karşılaştırma testiyle  $P < 0.05$  önem düzeyine göre uygulamalar arasındaki farklılık ortaya konulmuştur. AUDPC verileri aşağıda verilen formüle göre hesaplanmıştır.

$$AUDPC = \sum_{i=1}^{n-1} \left( \frac{y_i + y_{i+1}}{2} \right) (t_{i+1} - t_i)$$

t: i. gözlemdaki zaman,  $y_i$ : i'inci gözlemden hastalık şiddet, n: toplam gözlem sayısı

**Tablo 3.** Değerlendirmede kullanılan skala

Skala Değeri	Hastalık Belirtisi
0	Hastalık yok
1	Bitkide % 1-25 solgunluk
2	Bitkide % 26-50 solgunluk
3	Bitkide % 51-75 solgunluk
4	Bitkide % 76-100 solgunluk ve bitkinin ölümü

### 3. Bulgular ve Tartışma

#### 3.1. Domates Bitkilerinde Patojenite Testi

Domates fidelerinde yapılan patojenite testi sonucunda inokülasyondan 10 gün sonra bitkinin yapraklarında ve dallarında solgunluk, iletim demetlerinde kahverengileşme gözlenmiştir. Fideler boydan uzunlamasına steril bistüri yardımıyla kesilerek kahverengileşmiş iletim demetinden patojen bakteri izolasyonu yapılmış ve virülensliği artırılmış bu izolatın saf kültürü elde edilmiştir. King B besisi yerinde sarı renkte gelişen saf kültürlerin KOH testine göre gram pozitif olduğu tespit edilen re-izolatları çalışmada kullanılmak üzere +4 °C'de saklanmıştır.

#### 3.2. Nanopartiküllerin, kimyasalların ve bitki aktivatörünün bakteriyel kanser ve solgunluk hastalığına *in vitro* koşullardaki Minimum İnhibisyon Konsantrasyonunun (MİK) belirlenmesi

AgNps'nin MİK sonucuna göre, *Cmm* 0,02 ppm konsantrasyona sahip gümüş nanopartikülü içeren petride herhangi bir koloni büyümesi göstermemiş ve bu doz minimum inhibisyon konsantrasyonu

olarak kabul edilmiştir. CuNps'nin MİK sonucuna göre, *Cmm* 0,0035 ppm konsantrasyona sahip bakır nanopartikülü içeren petride herhangi bir koloni büyümesi göstermemiştir. Bu nedenle, bu doz minimum inhibisyon konsantrasyonu olarak kabul edilmiştir. DOT'un MİK sonucuna göre, *Cmm* 0,0025 ppm konsantrasyona sahip Disodyum oktaborat tetrahidrat içeren petride herhangi bir koloni büyümesi göstermemiş ve bu doz minimum inhibisyon konsantrasyonu olarak kabul edilmiştir. SPP'nin MİK sonucuna göre, *Cmm* 0,00375 ppm konsantrasyona sahip Sodyum pentaborat pentahidrat içeren petride herhangi bir koloni büyümesi göstermediği için bu doz minimum inhibisyon konsantrasyonu olarak kabul edilmiştir (Tablo 4). Noshad ve arkadaşlarına (2020) göre AgNps ve Cunps, *Cmm* ve farklı bitki patojenik bakterilere karşı benzer şekilde performans gösterdiğini tespit etmişlerdir.

**Tablo 4.** Farklı nanopartikül ve kimyasalların *Cmm*'e karşı minimum inhibisyon konsantrasyonları

Materyal	MİK (ppm)
Nano Gümüş (AgNps)	0,02
Nano Bakır (CuNps)	0,0035
Disodyum Oktaborat Tetrahidrat (DOT)	0,0025
Sodyum Pentaborat Pentahidrat (SPP)	0,00375

### 3.3. Nanopartikül, kimyasal ve bitki aktivatörünün in vivo koşullarda bakteriyel kanser ve solgunluk hastalığı çıkışı üzerine etkisi

Tablo 5'teki verilere göre sadece patojenle bulaştırılmış bitkilerdeki hastalık oranı %60 olarak tespit edilmiştir. Benzer şekilde nano gümüş ve nano bakır uygulanmış bitkilerde de hastalık oranı %60 ve %66,62 olmuştur. Bu 3 uygulama istatistiksel olarak aynı grupta yer alan başarısız uygulamalar olarak değerlendirilmiştir. Bitkide dayanıklılık mekanizmasını aktive eden ticari bir bitki aktivatörü olan ISR-2000, ticari bir bakırlı preparat (%35 metalik bakır hidroksit) ve 2 yeni kimyasal olan DOT ve SPP hastalığı baskılamada başarılı uygulamalar olarak değerlendirilmiş ve istatistiksel olarak pozitif kontrolden farklı oldukları belirlenmiştir.

En başarılı uygulamanın bir bitki aktivatörü olan ISR-2000 olduğu belirlenmiştir. ISR-2000 uygulanmış bitkilerin %13'ünde hastalık görülmüş ve *Cmm*'in neden olduğu Domateste Bakteriyel Solgunluk Hastalığını baskılama oranı %77,91 olarak tespit edilmiştir. Soykan ve Aysan (2011) tarafından yapılan benzer bir araştırmada, ISR-2000 uygulanmış *Cmm* ile bulaşık bitkilerde hastalığın %62,09 oranında baskıladığını bildirmiştir. Çetinkaya Yıldız ve Aysan (2014), yerel PGPR izolatlarının aynı hastalığı %43 oranında, ISR-2000'in ise %26,1 oranında hastalığı baskıladığını belirtmiştir. Yapılan diğer araştırmalarda ve bu denemede olduğu gibi ISR-2000 adlı ticari bitki aktivatörü *Cmm*'in neden olduğu Domateste Bakteriyel Solgunluk Hastalığını başarıyla engelleyen bir uygulamadır.

Yapılan bu araştırmada, ISR-2000 ile aynı istatistiki grupta yer alan bakır hidroksit uygulaması, bu hastalığı %46 oranında baskılayan bir diğer başarılı uygulama olarak belirlenmiştir. Bastas (2014),

bazı kimyasalların ve bitki aktivatörlerinin *Cmm* üzerindeki etkisini iki domates çeşidi (Newton ve Orient) üzerinde *in vivo* koşullarda araştırdığı çalışmasında bakır hidroksitin kontrole göre Newton çeşidinde hastalığı %17, Orient çeşidinde ise hastalığı %12 oranında baskıladığını bildirmiştir. Ashraf ve ark. (2022), farklı kimyasalların *Cmm*'ye karşı antibakteriyel etkilerini *in vitro* ve *in vivo* koşullarda araştırdıkları çalışmada bakır hidroksit uygulanan bitkilerde hastalık şiddetini ortalama %38 oranında baskıladığını tespit etmişlerdir. Bizim deneme bulgularımıza göre bakır hidroksitin Domateste Bakteriyel Solgunluk Hastalığını benzer şekilde baskılaması önceki çalışmaları destekler niteliktedir. DOT ve SPP adlı iki yeni kimyasal, *Cmm*'in neden olduğu Domateste Bakteriyel Solgunluk Hastalığını %32,5 ve %27,5 oranında baskılayarak aynı istatistiki grupta yer alan diğer başarılı bir uygulama olarak belirlenmiştir. Bu kimyasallar yeni üretilmiş olması nedeniyle daha önceden bu hastalığa etkisi ortaya konmamış ve diğer çalışmalarla karşılaştırma olanağı olmamıştır. Ancak bu iki yeni kimyasal olan DOT ve SPP, uygulanmış domates bitkilerinin yapraklarının kenarlarında yanıklıklar gözlenmiş ve DOT ve SPP'nin domates yeşil aksamında fitotoksitete neden olduğu gözlenmiştir. Kimyasalların fitotoksitesi üzerine yapılan bir araştırmada farklı bakırlı bileşiklerin domates yeşil aksamında fitotoksitete neden olduğu rapor edilmiştir (Rajasekaran ve ark., 2016).

**Tablo 5.** Nanopartiküllerin, kimyasalların ve bitki aktivatörünün *Cmm*'in neden olduğu Bakteriyel Kanser ve Solgunluk Hastalığına etkisi

Uygulama	Skala Değeri ort.	Hastalık Şiddeti (%)	% Etki
ISR-2000	0,53±0,63 d*	13,25	77,91
Bakır Hidroksit	1,29±1,52 d	32,25	46,25
DOT	1,62±1,81 c	40,50	32,50
SPP	1,74±1,95 c	43,50	27,50
AgNps	2,40±2,76 ab	60,00	0
Pozitif kontrol	2,40±2,75 ab	60,00	-
CuNps	2,66±3,04 a	66,62	-11,04

\*: Farklı harfi içeren ortalamalar LSD (0.05) testine göre istatistiksel olarak farklıdır

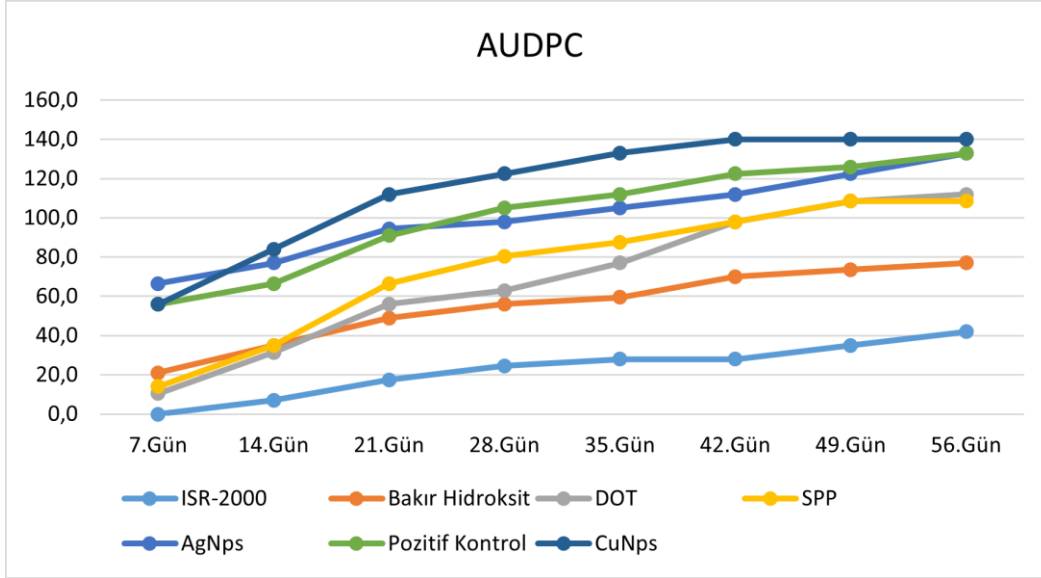
Hastalığın ilk çıktığı yedinci gün de hastalık oranları tespit edilmiş ve bunun dışında yedi kere daha hastalık skalaya göre değerlendirildiğinde hastalığın ilerleme eğrisi belirlenmiştir (Şekil 2). Uygulamalar arasında sekiz hafta boyunca ilerleme eğrisi altında kalan alan (AUDPC) karşılaştırıldığında 7.günde yapılan değerlendirmede pozitif kontrolde AUDPC değeri 56 olarak belirlenmiş ve nano bakırda benzer şekilde aynı değer hesaplanmıştır. Nano gümüşte ise bu değer pozitif kontrolden daha fazla (66,5) olduğu saptanmıştır. Bakır hidroksitte bu değer 21, SPP ve DOT uygulamalarında sırasıyla 14 ve 10 iken ISR-2000 uygulanmış bitkilerde yedinci günde herhangi bir hastalık gözlenmemiştir. Bu değerlendirmeden 7 gün sonra değerlendirildiğinde AUDPC değerleri pozitif kontrolde 66,5, nano gümüş ve bakırda sırasıyla 77 ve 84, SPP ve Bakır hidroksitte 35 iken DOT uygulamasında 31,5 olarak hesaplanmıştır. Başarılı uygulama olan ISR-2000'nin AUDPC



değerinin sadece 7 olduğu belirlenmiştir. 21. ve 28. Gün yapılan değerlendirmede benzer şekilde AUDPC değerlerinde artış gözlenmiştir. Beşinci ve altıncı hafta değerlendirmelerinde ise Bakır Hidroksit, DOT, SPP, AgNps, Pozitif Kontrol ve CuNps'nin AUDPC değerlerinde artış devam ederken ISR-2000 uygulanmış bitkilerde hastalık ilerleyişi durmuştur. Tüm veriler değerlendirildiğinde pozitif kontrolündeki toplam AUDPC değeri 812, Nanopartiküller AgNps ve CuNps'nin uygulandığı bitkilerde hastalık ilerleme düzeyi 808,5 ve 927,5 olarak belirlenmiş ve pozitif kontrol ile aynı istatistiki grupta yer alarak başarısız uygulamalar oldukları bir kez daha tespit edilmişlerdir. İki yeni kimyasal olan DOT ve SPP uygulamalarında hastalık ilerleyişi toplam 556,5 ve 598,5 olarak hesaplanmış ve hastalığı pozitif kontrole göre %31,5 ve %26,3 oranında baskıladığı tespit edilmiştir. Bu iki uygulama pozitif kontrolden farklı olarak aynı istatistiki grupta yer alan başarılı uygulamalardır. Bakır hidroksit uygulaması bakteriyel solgunluk hastalığını %45,7 baskılayarak toplam AUDPC değeri 441 olarak belirlenmiş ve pozitif kontrolden ayrı grupta yer alan başarılı bir diğer uygulama olmuştur. ISR-2000 uygulaması hastalığın ilerleyişini pozitif kontrole ve diğer uygulamalara göre en başarılı şekilde baskılamış (%77,6) ve en düşük AUDPC değeri (182) bu uygulamada belirlenmiştir (Tablo 6).

**Tablo 6.** *Cmm*'in neden olduğu Bakteriyel Kanser ve Solgunluk Hastalığı'nın 8 hafta boyunca ilerleme düzeyi

	7.Gün	14.Gün	21.Gün	28.Gün	35.Gün	42.Gün	49.Gün	56.Gün	Toplam	%Etki
ISR-2000	0,0	7,0	17,5	24,5	28,0	28,0	35,0	42,0	182,0	a 77,6
Bakır Hidroksit	21,0	35,0	49,0	56,0	59,5	70,0	73,5	77,0	441,0	ab 45,7
DOT	10,5	31,5	56,0	63,0	77,0	98,0	108,5	112,0	556,5	bc 31,5
SPP	14,0	35,0	66,5	80,5	87,5	98,0	108,5	108,5	598,5	bc 26,3
AgNps	66,5	77,0	94,5	98,0	105,0	112,0	122,5	133,0	808,5	cd 0,4
Pozitif Kontrol	56,0	66,5	91,0	105,0	112,0	122,5	126,0	133,0	812,0	cd -
CuNps	56,0	84,0	112,0	122,5	133,0	140,0	140,0	140,0	927,5	d -14,2



Şekil 2. *Cmm*'in neden olduğu Bakteriyel Kanser ve Solgunluk Hastalığı'nın ilerleme eğrisi

Bu sonuçlara göre *Cmm*'in neden olduğu Bakteriyel Kanser ve Solgunluk Hastalığı en başarılı şekilde ISR-2000 uygulaması tarafından baskılanmıştır. ISR-2000 *Lactobacillus* bakterilerini içeren bitkide dayanıklılık mekanizmalarını aktive eden bir bitki aktivatörüdür. Bu hastalığın mücadelesinde yeni nesil bor içerikli kimyasalları, nano partikülleri kullanmak yerine bu hastalığa karşı dayanıklılık mekanizmasını aktive etmenin daha iyi sonuç verdiği yapılan bu çalışmayla ortaya konmuştur. Biyolojik mücadele çalışmaları özellikle çevre dostu olması hedef dışı canlılara olumsuz etkilerinin bulunmaması ve bitkide dayanıklılık mekanizmasını aktive ederek sadece Bakteriyel Solgunluk Hastalığına değil diğer fungal ve viral hastalıklara karşı da dayanıklılığı teşvik ettiğinden öncelikli olarak kullanılması gerektiği bir kez daha bu çalışmayla gösterilmiştir.

#### 4. Sonuçlar

Bu çalışma, nanopartiküllerin (AgNps ve CuNps), bir bitki aktivatörü (ISR-2000), bakır hidroksit adı verilen ticari bir fungusit ve sodyum pentaborat pentahidrat (SPP) ve disodyum oktaborat tetrahidrat (DOT) adlı iki yeni kimyasal bileşiğin *Cmm*'in neden olduğu Domateste Bakteriyel Kanser ve Solgunluk Hastalığını baskılayıcı etkisini ortaya koymuştur. Ayrıca bu uygulamaların sera koşullarında *Cmm* patojeninin domates bitkilerinde neden olduğu hastalık ilerleme eğrisi altındaki alan (AUDPC) üzerindeki etkisini de ortaya koymuştur.

Sera denemelerinin sonucunda bitki aktivatörü ISR-2000, Bakteriyel Solgunluk hastalığını %77,91 oranda baskılayarak en etkili uygulama olmuştur. Bunu hastalığı %46,25 oranda baskılayan bakır hidroksit uygulaması takip etmiştir. Bu sonuç bakırlı preparat olan bakır hidroksitin bakır direnci olmayan alanlarda da başarıyla kullanılabileceğini göstermektedir. İki yeni kimyasal olan DOT ve SPP, hastalığı %32,5 ve %27,5 oranında baskılamış ancak domates yapraklarında fitotoksik etki göstermiştir. Bu nedenle bu kimyasalların pestisitlerde aktif madde olarak kombinasyon şeklinde

kullanımıyla ilgili daha fazla araştırma yapılmalıdır. Bitkilerin doğal savunma sistemini güçlendiren, bitkisel üretimde hastalık etkenleri ve stres koşullarına karşı doğal dayanıklılık sağlayan benzersiz bileşenlere sahip ISR-2000, bu tez çalışmasında en başarılı uygulama olduğu kanıtlanmıştır. Bu tür ürünler, bitkilerin doğal savunma mekanizmalarını harekete geçirerek hastalık etkenlerine ve stres koşullarına karşı daha dayanıklı olmalarına yardımcı olabilmektedir. ISR-2000 veya benzeri bitki aktivatörleri tarım sektöründe mahsul verimini artırmak ve hastalık yönetiminde kimyasal pestisit kullanımını azaltmak için kullanılabilir. Bitkinin gelişme periyodu boyunca kimyasal pestisit kullanımının mümkün olmadığı durumlarda entegre yönetime de dahil edilebilir.

### **Teşekkür**

Bu çalışma (FDK-2022-14795) Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.

### **Çıkar Çatışması Beyanı**

Makale yazarları arasında herhangi bir çıkar çatışması yoktur.

### **Kaynaklar**

- Ahmad A., Mbofung GY., Acharya J., Schmidt CL., Robertson AE. Characterization and comparison of *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis* strains recovered from epiphytic and symptomatic infections of maize in Iowa. PLoS One, 2015; 10(11): e0143553.
- Albanese A., Tang PS., Chan CW. The effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems. Annual Review of Biomedical Engineering, 2012; 14: 1–16.
- Ashraf M., Atiq M., Rajput NA., Akram A., Fatima T., Ghaffar A., Ramzan S. Determination of antibacterial potency of different chemicals towards bacterial canker of tomato caused by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Agricultural Sciences Journal, 2022; 4(2): 63-73.
- Aysan Y., Üstün N., Mirik M., Saygılı H., Şahin F. Domates bakteriyel benek hastalığı, sayfa 159-165. In: Bitki Bakteri Hastalıkları (Ed: Saygılı, H., Aysan, Y., Şahin, F., Soylu, S., Mirik, M.), Toprak Ofset Matbaacılık, Tekirdağ, 2019; 382 sayfa
- Atiq M., Mazhar HMR., Rajput NA., Ahmad U., Hameed A., Lodhi AM., Usman M., Nawaz A., Ammar M., Khalid M. Green Synthesis of silver and copper nanoparticles from leaves of eucalyptus globulus and assessment of its antibacterial potential towards xanthomonas citri Pv. Citri Causing Citrus Canker Applied Ecology and Environmental Research, 2022; 20(3): 2205–13.
- Baştaş K. Effects on tomato bacterial canker of resistance inducers and copper compounds in greenhouse. Selcuk Journal of Agriculture and Food Sciences, 2014; 28(1): 1-10.

- Blank L., Cohen Y., Borenstein M., Shulhani R., Lofthouse M., Sofer M., Shtienberg D. Variables associated with severity of bacterial canker and wilt caused by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato greenhouses. *Phytopathology*, 2016;106: 254–261.
- Cemen A., Saygili H., Horuz S., Aysan Y. Potential of bacteriophages to control bacterial speck of tomato (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*). *Fresenius Environmental Bulletin*, 2018; 27(12A): 9366-9373.
- Çetinkaya Yıldız R., Aysan Y. Domates bakteriyel solgunluk hastalığının bitki büyüme düzenleyici kök bakterileri ile biyolojik mücadelesi. *Türkiye Biyolojik Mücadele Dergisi*, 2014; 5(1): 9-22.
- Çetinkaya Yıldız R., Belgüzar S., Aysan Y. Domates bakteriyel solgunluk hastalığı. In: Saygılı, H., Aysan Y., Şahin, F., Soylu, S., Mirik M. (ed.) *Bitki Bakteri Hastalıkları: Toprak Ofset*; 2019; 39-48.
- Davis MJ., Gillaspie Jr AG., Vidaver AK., Harris RW. *Clavibacter*: A new genus containing some phytopathogenic coryneform bacteria, including *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* sp. nov., subsp. nov. and *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis* subsp. nov., pathogens that cause ratoon stunting disease of sugarcane and bermudagrass stunting disease. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 1984; 34: 107–117.
- de León L., Felipe S., María ML. Ana R. *Clavibacter michiganensis* Subsp. *michiganensis*, a seedborne tomato pathogen: Healthy seeds are still the goal. *Plant Disease* 2011; 95(11): 1328–1339.
- Eichenlaub R.; Gartemann KH. The *Clavibacter michiganensis* subspecies: molecular investigation of gram-positive bacterial plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 2011;49: 445-464.
- EPPO 2016. PM 7/42 (3) *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Bull OEPP/EPPO Bull* 46:202–225.
- EPPO 2022. EPPO Datasheet: *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. <https://gd.eppo.int/taxon/CORBMI/datasheet>. Erişim Tarihi:21.02.2024
- Frewer LJ., Norde W., Fischer A., Kampers F. (Eds.) *Nanotechnology in the agri-food sector: implications for the future*. John Wiley-VCH, Germany, 2011.
- Hausbeck M., Bell J., Medina-Mora C., Podolsky R., Fulbright D. Effect of bactericides on population sizes and spread of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on tomatoes in the greenhouse and on disease development and crop yield in the field. *Phytopathology*, 2000; 90: 38–44.
- Jones J., Jackson L., Balogh B., Obradovic A., Iriarte F. Momol M. Bacteriophages for plant disease control. *Annual Review of Phytopathology*, 2007; 45: 245–262.
- Karaca K., Belgüzar S., Yanar Y., Karadağ A. Antibacterial effects of disiyanido complex against *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. 27th International Scientific-Expert Congress of Agriculture and Food Industry, 26-28 September 2016, sayfa no:105, Bursa.

- Kasselaki AM., Goumas D., Tamm L., Fuchs J., Cooper J., Leifert C. Effect of alternative strategies for the disinfection of tomato seed infected with bacterial canker (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*). NJAS –Wageningen Journal Life Science, 2011; 58: 145–147.
- Klement Z., Mavridis A., Rudolph K., Vidaver A. Inoculation of plant tissue. In: Klement, Z., Ruholph, K., and Sands, D. C (Edts) Methods in Phytobacteriology, Budapest: Akadémiai Kaidó, 1990;99.
- Mahapatra S., Chakraborty S., Samanta M., Das, S., Islam T. Current understanding and future directions of biocontrol of plant diseases by bacillus spp., with special reference to induced systemic resistance. In Bacilli in Agrobiotechnology: Plant Stress Tolerance, Bioremediation, and Bioprospecting, In: Islam, M.T., Rahman, M., Pandey, P. (eds) Springer International Publishing, 2022; 127-150.
- Mirik M., Altın İ. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* Bakteriyel Kanser In: Mirik M. (ed.) Domates Hastalıkları, Göktuğ Ofset, 2020; 538-543, Ankara.
- Méndez-Andrade R., Moisesm R., Vallejo P., Esperanza L., Gladys D., Luis AG., Ileana V.. Efficacy of biosynthesized silver nanoparticles from *larrea tridentata* against *Clavibacter michiganensis*. Journal of Phytopathology, 2022; 170(2): 91–99.
- Mishra S., Xiaodong Y., Shatrupam R., Leonardom FF., Singh HB. Antibacterial and biofilm inhibition activity of biofabricated silver nanoparticles against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* causing blight disease of rice instigates disease suppression. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2020; 36(4): 1–10.
- Noshad A., Iqbal M., Hetherington C., Wahab H. Biogenic AgNPs—A nano weapon against bacterial canker of tomato (BCT). Advances in Agriculture, 2020; Article ID 9630785.
- Noshad A, Crispin H., Mudassar I. Impact of agnps on seed germination and seedling growth: a focus study on its antibacterial potential against *Clavibacter michiganensis* infection in *Solanum lycopersicum*. Journal of Nanomaterials, 2019; 1-12.
- Rajasekaran P., Kannan H., Das S., Young M., Santra S. Comparative analysis of copper and zinc based agrichemical biocide products: materials characteristics, phytotoxicity and *in vitro* antimicrobial efficacy. AIMS Environmental Science, 2016; 3(3): 439-455.
- Sen Y., Aysan Y., Mirik M., Ozdemir D., Meijer-Dekens F., van der Wolf JM., Visser RGF., van Heusden S. Genetic characterization of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* Population in Turkey. Plant Disease, 2018; 102(2): 300-308.
- Shukla P., Parul C., Kaiser Y., Ovais SQ., Soban AF., Gaurav S. Nanotechnology in sustainable agriculture: studies from seed priming to post-harvest management. Nanotechnology for Environmental Engineering, 2019; 4(1): 1–15.
- Soykan Ö., Aysan Y. Bazı bitki aktivatörleri ile organik ve inorganik gübrelerin domates bakteriyel kanser ve solgunluk hastalığına etkisi. Türkiye IV: Bitki Koruma Kongresi Bildirileri, 28-30 Haziran 2011, S:317.

- Soylu S., Baysal Ö., Soylu EM. Induction of disease resistance by the plant activator, acibenzolar-S-methyl (ASM), against bacterial canker (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) in tomato seedlings. *Plant Science*, 2003; 165: 1069-1075.
- Soylu S., Kara M., Türkmen M., Şahin B. Synergistic effect of *Foeniculum vulgare* essential oil on the antibacterial activities of Ag- and Cu-substituted ZnO nanorods (ZnO-NRs) against food, human and plant pathogenic bacterial disease agents. *Inorganic Chemistry Communications*, 2022; 146: 110103.
- Şahin B., Soylu S., Kara M., Türkmen M., Aydın R., Çetin H. Superior antibacterial activity against seed-borne plant bacterial disease agents and enhanced physical properties of novel green synthesized nanostructured ZnO using *Thymbra spicata* plant extract. *Ceramics International*, 2021; 47, 341-350.
- Şahin B., Aydın R., Soylu S., Türkmen M., Kara M., Akkaya A., Çetin H., Ayyıldız E. The effect of *Thymus syriacus* plant extract on the main physical and antibacterial activities of ZnO nanoparticles synthesized by SILAR Method. *Inorganic Chemistry Communications*, 2022; 135: 109088
- Vijayakumar MD., Surendhar GJ., Natrayan L., Pravin P., Bupathi Ram PM., Prabhum P., Seral Y. Evolution and recent scenario of nanotechnology in agriculture and food industries. *Nano-Biopesticides Today and Future Perspectives* 2019; 7(13): 57–67.
- Werner NA., Fulbright DW., Podolsky R., Bell J. Hausbeck, M.K. Limiting populations and spread of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on seedling tomatoes in the greenhouse. *Plant Disease*, 2002; 86: 535–542.
- Yigenoglu CY., Işık O., Aysan Y., Ak B., Uslu L. Biological control of tomato bacterial wilt and canker disease by *Spirulina platensis*. *Proceedings of the IOBC/WPRS Working Group "Integrated Control in Protected Crops, Temperate Climate, Niagara Falls, Canada, 4-8 June 2017.*
- Zhou H., Li Q. X., Zeng L., Cao C., Zhang T., Zhou Y., He H. Uracil hydrazones: Design, synthesis, antimicrobial activities, and putative mode of action. *Pest Management Science*. 2023; 1-12. <https://doi.org/10.1002/ps.7771>