

PSEUDOMONAS SOLANACEARUM'UN BAZI DOMATES ÇEŞİTLERİNE ENFEKSİYONUNDA BİTKİ PARAZİTİ NEMATODLARIN ROLÜ ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR. (x)

Yazan: Kâşif TEMİZ (1)

Bu çalışmanın danışman Profesörlüğünü yapan N.C. State University Plant Pathology Departmanı öğretim üyelerinden Dr. Samuel F. Jenkins'e teşekkür ederim.

G İ R İ Ş

Kısmen «literatür taraması» bölümünde görüleceği üzere, aynı konukçu bitki üzerinde zararlı olan toprakaltı patojenlerinin ilişkileri ilginç sonuçlar vermektedir. Bu ilişkiler, ya patojenlerin birbirlerinin patojenisitelerini artırma, ya yavaşlatma ya da serbest yaşama şeklinde olmaktadır.

Bu ilişkilerin bilinmesinde yetiştiricilik yönünden büyük faydalar var. Örneğin, *Fusarium*'a resistant olan bir sebze çeşidi, yalnız *Fusarium*'la bulaşık toprakta normal gelişip - büyürken, nematod zararı gördükten sonra aynı *Fusarium*'a olan resistantlığını kaybedebilmektedir.

Gerek pratik fayda ve gerekse bu patojenik ilişkilerin daha karışık kombinezonlar altında aydınlatılması yönünden, bitki paraziti olan nematodların bazı önemli speciesleriyle *Pseudomonas solanacearum* arasındaki işbirliğinin,

a— Nematoda hassas fakat *P. solanacearum*a resistant,,

b— Her ikisine hassas,

c— Nematodlara resistant fakat *P. solanacearum*a hassas olan konukçu bitkiler üzerinde incelenmesinin, ilginç ve faydalı olacağı düşüncesiyle bu çalışma sera şartlarında ele alındı.

LİTERATÜR TARAMASI

Bu konuda yapılan ilk çalışmalarda *Pseudomonas solanacearum*'un işleme aletleri, böcekler ve nematodlar (6, 7, 8, 9) tarafından açılmış ya da olmadan enfeksiyon yapamayacağı kayıtlıdır. Fakat daha sonraları yapılan çalışmalar gelişme devamınca hiç yaralanmamış bitkilerin de suni olarak patojenle bulaştırılmış toprakta bakteriyel solgunluğa yakalan-

(1) Yalova - Bitki Koruma Lâb. Şefi

(x) Bu çalışma N.C. State University Plant Pathology Departmanı'nda yapılmıştır.

dıklarını ve ölümün de meydana geldiğini göstermiştir (3, 4). Bununla beraber, bu çalışmaların hiçbirisi, yaralanmanın bakteri enfeksiyonundaki önemini inkâr etmemiştir. Her iki görüş, bakterinin enfeksiyonu için yaralanma mutlak değil, fakat yaralanmanın, solgunluğun artışıındaki rolü mutlaklıtır, şeklinde ortak bir prensipte toplanmıştır. (5)

MATERYAL VE METOD

DENEMEDE KULLANILAN BİTKİLERİN ÖZELLİKLERİ VE YETİŞTİRME USULÜ :

Denemede domates çeşitlerinden Atkerson, Floradel ve bir de S—12 hibridi kullanıldı. Deneme başlatılmazdan önce Atkerson'un *Meloidogyne incognita*'ya resistant, Flaradel'in her iki tip patojene, hem *Pseudomonas solanacearum*'a ve hem de nematodlara (*P. brochyurus*, *T. christiei*, *M. incognita*) hassas; S—12 hibrid domatesinin de *P.solanacearum*'a resistant olduğu bilinmekteydi ve denemede, karışık bir kombinezon bulunması için bilhassa seçildiler.

Domates tohumları Dr. S. F. Jenkins'den (X) alındı.

Tohumlar, içinde vermiculate denen bir çeşit talaş dolu 25 cm. çaplı saksılara serpme usulü ekildi. Hergün normal çeşme suyu ile sulandı. On gün sonra küçük domates fideleri - her saksıya bir adet olmak üzere - 5 cm. lik plâstik saksılara aktarıldı. Fideler bu ufak saksılarda 5 haftalık olunca, içinde 3 toprak 1 kum karışımı harç bulunan 15 cm. lik saksılara topraklarıyla aktarıldı. Bu transfer sırasında muhtemel yaralanmaları önlemek için, aktarılan saksıya 5 cm. lik saksılar batırılarak çukurlar açıldı. Bu çukurlara toprağıyle birlikte fideler oturtulmazdan önce, çukuru çevreleyen üç yönde, düşey bir şekilde üçer adet inokülasyon tüpü her saksıya yerleştirildi. Bu dikim işlemi bittikten sonra saksılar, serada, randomize blok içine düzenlenen split - split plot desenine (üç tekerrürlü olarak) göre yerleştirildiler Bu desende tam - ünite nematodlar (A), alt ünite bakteri (B) ve alt - alt ünite de domatesler (C) kabuledildi.

DENEME MATERYALİ NEMATODLARIN ÖZELLİKLERİ, ÇOĞALTILMALARI VE İNOKÜLASYONLARI :

Denemeye alınan nematodların seçiminde, bölümlerinde açıklandığı üzere, kökün değişik dokularında zarar yapan nematodlar olmalarına dikkat edildi.

Nematod nümuneleri N. C. State University, Plant Pathology Departmentı, nematoloji bölümünden alındı ve üretildi. Alınan üç ayrı ge-

nusa bağılı nematoddan **Meloidogyne incognita** hassas domates bitkisiyle, **Trichodorus christiei** mısırla ve **Pratylenchus brochyurus** da fasülye ile saksılarda beslenerek çoğaltıldı.

Deneme yönünden nematodların özellikleri :

Kök ur nematodu (**M. incognita**) lârvaları, köke girmeden önce, bir müddet köklerin epidermal hücreleriyle beslenirler; içeriye girdikten sonra da hareket kabiliyetini kaybetmiş sabit parazit olarak yaşarlar. Bulundukları kısımda aşırı hücre çoğalmasına, hücrelerinin normalden çok büyük olmasına sebeb olduklarından «ur» teşekkül ettirirler. Bitki de büyümeyi, yavaşlatır veya durdururlar. Enfekteli kökler, enfeksiyon noktasına yakın yerlerden yeni kökler verme temayülündedirler. Nekroz görülmesi tabii değildir (1).

Bodur kök (Stubbyroot) nematodu (**T. christiei**) çoğuncalık köklerin ucunda ve taze - sulu dokulu köklerin yan taraflarında beslenir. Kök ucunu öldürür ve büyümeyi durdurur. Birçok hallerde zarar gören kök ucu az veya hiç renk değişmesi, nekroz veya yaralanma belirtileri göstermez.

Çayır nematodu (**P. brochyurus**) köke girdikten sonra parenkima dokusunda beslenir. Genellikle çok sayıda nematod küçük bir sahada, bir leke yaparak, gelişir. Nematodlar beslendikçe yara sathi olarak büyür ve kırmızımtırak - kahverengi bir leke halini alır.

Üretilmeleri :

Üretim amacıyla kök ur nematoduyla aşılanmış domates, bodur (Stubby) kök nematodlarıyla aşılanmış mısır ve çayır nematoduyla aşılanmış fasülye bitkileri, serada 50 gün müddetle ve normal bakımla büyütüldü. Bu müddetin sonunda kök-ur nematodlarıyla çayır nematodları bitki dokularından, bodur (Stubby) kök nematodu ise topraktan - suda inkübasyon ve elek metodlarıyla - izole edildiler.

İzole edilen nematodların mikroskop altında ayırım ve sayımları yapıldı. Enteksiyon için gerekli inokülüm böylece hazırlanmış oldu.

Bakteri kültürü (**P. solanacearum**) :

Saf bakteri kültürü numunesi Dr. Jenkins'den alındı ve yarı - sentetik ortamda üretildi.

Yarı - sentetik ortamın 1 litre solusyonunda yeralan maddeler şunlardır :

- (1— 10 ml. fosfat - bafır solusyonu,
- 2— 10 ml. NH_4SO_4 , 3—5 ml. $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 4—1 ml. ZnSO_4
- 5— 1 ml. Ferric citrate, 6—1 ml. $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$.
- 7— 20 gr. Sukroz, 8—1 gr. yeast extract,
- 9— 1 gr. Casamino asit).

Bunlardan (7, 8, 9 nolar) 15 dakika otoklavda sterilize edildi. Ayrıca 7 gr./1 lt. CaCO_3 solusyonu büyükçe bir tüp içinde 45 dakika otoklavda sterilize edildi. Hepsinin karışımı bir litreye varacak şekilde yarı - sentetik ortam solusyonu hazırlandı. Pipetle 2 ml. nümune bakteri verilerek aşılama yapıldı ve 48 saat çalkalayıcı üzerinde çalkalıyarak solusyonda bakterinin üremesi sağlandı. Bu müddetin sonunda 5000 g. da santrifüjden geçirildi. Tortu ayrıldı. Elde edilen bakteri solusyonu mililitrede 30×10^7 bakteriyel hücre bulunacak şekilde tekrar sulandırıldı. Mililitrede hücre sayımı kan - sayacıyla yapıldı.

Solusyondaki virulent hücre sayısı T Z C ortamına (Triphenyl tetrazolium chloride agar) bilinen sayıda verilen hücrenin, 48 saatte ve 32°C de, çimlenen miktarıyla mukayesesi yapılarak tesbit edildi.

Muameleler ve inokülasyonlar :

Denemede 24 muamele yeraldı. Şöyleki :

	<u>F.brochvurus</u>		<u>T.christiei</u>		<u>M.incognita</u>		<u>M.nematodorum</u>	
A- Nematodlar:	a_1		a_2		a_3		a_4	
B- Bakteri :	$b_1 (+)$	$b_2 (-)$	$b_1 (+)$	$b_2 (-)$	$b_1 (+)$	$b_2 (-)$	$b_1 (+)$	$b_2 (-)$
C- Varyeteler:								
Atkerson-c ₁	$a_1 b_1 c_1$	$a_1 b_2 c_1$	$a_2 b_1 c_1$	$a_2 b_2 c_1$	$a_3 b_1 c_1$	$a_3 b_2 c_1$	$a_4 b_1 c_1$	$a_4 b_2 c_1$
	T-1	T-4	T-7	T-10	T-13	T-16	T-19	T-22
Floradel-c ₂	$a_1 b_1 c_2$	$a_1 b_2 c_2$	$a_2 b_1 c_2$	$a_2 b_2 c_2$	$a_3 b_1 c_2$	$a_3 b_2 c_2$	$a_4 b_1 c_2$	$a_4 b_2 c_2$
	T-2	T-5	T-8	T-11	T-14	T-17	T-20	T-23
S - 12 -c ₃	$a_1 b_1 c_3$	$a_1 b_2 c_3$	$a_2 b_1 c_3$	$a_2 b_2 c_3$	$a_3 b_1 c_3$	$a_3 b_2 c_3$	$a_4 b_1 c_3$	$a_4 b_2 c_3$
	T-3	T-6	T-9	T-12	T-15	T-18	T-21	T-24

Yetiştirme usulü bölümünde açıklandığı şekilde seraya yerleştirilmiş olan bitkiler ortalama 12 cm. yüksekliğe erişir - erişmez, T-1 den T-18'e kadar ki (T-18 dahil), muamelelere tabi tutulan saksılara her saksıya - nematodun izolasyon bölümünde Solüsyonunun nasıl elde edildiği açıklanan - 1600 nematod düşecek şekilde, 10 ml. lik solüsyonlar halinde, pipetlerle inokülasyon tüplerinden köklere verildi.

Nematodun köklere verilışinden 10 gün sonra, yine dikim sırasında yerleştirilmiş olan inokülasyon tüpleri yoluyla, 1, 2, 3, 7, 8, 9, 13, 14, 15, 19, 20, 21 nolu «T» (muamelelere) konu olan saksıların herbirine 30×10^7 /ml. bakteri hücresi 10 ml. lik solüsyonlar halinde, pipet yardımıyla, verildi.

Bakterinin aşılmasından sonra bitkiler müşahedeye alındı ve normal bakımları yapıldı.

DEĞERLENDİRMEDE KULLANILAN ÖLÇME BİRİMLERİ :

Değerlendirme üç ayrı varyasyon üzerinden yapıldı: a— Solgunluk, b— Gövdelerin toprak yüzeyinden 15 cm. yüksekliklerinden alınan 2 mm. uzunluğundaki kesitlerinin 5 ml. damıtık su içinde 24 saat bekletilmele-riyle verdikleri bakteri yoğunluğu, c— Kök hacmi ve renk değişimi,

Solgunluk: Bitki tamamen çökmüş (7); bütün yapraklar solmuş fa-kat sap dik (6); mevcut yaprakların % 81 i solmuş (5); yaprakların % 61-80 i solmuş (4); yaprakların % 41-60 ı solmuş (3); yaprakların % 21-40 ı solmuş (2); yaprakların % 20 den azı solmuş veya bir - iki yap-rakta epinastik (1) ve hiç solgunluk göstermeyenler de (0) la derecelendi.

Bakteriyel yoğunluk: Takriben toprak yüzeyinden 15 cm. yükseklikten 2 mm. kalınlığında sap kesitleri alınıp saksılarının numaralarını taşıyan ve içlerinde 5 ml. damıtık su bulunan tüplere kondu. 24 saat bekletildik-ten sonra, 575 m de spektrofotometreyle herbirinin ayrı - ayrı yoğunluk-ları ölçüldü.

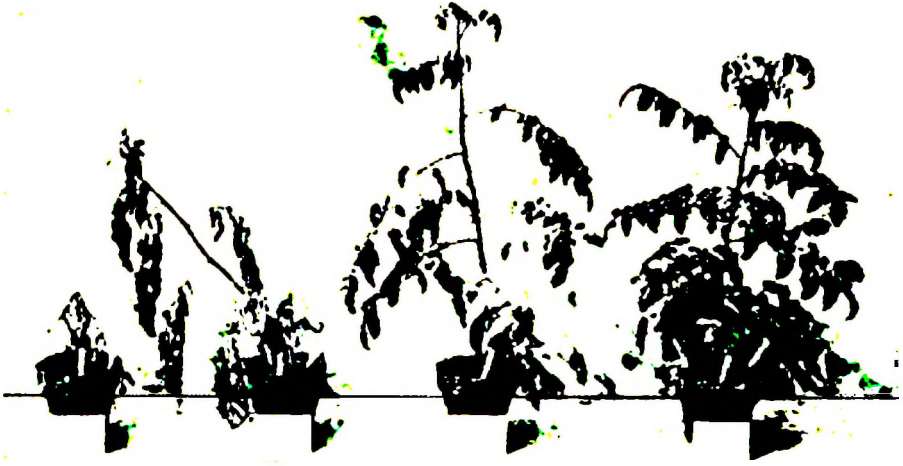
Kök hacmi ve renk değişimi: Kontrol bitkileri (1); en çok zarar gör-müş olanları (4); en çok zarar görenin kök hacminin iki misli hacme sa-hibolanlara (3); üç misli sahibolanlara da (2) dereceleri verildi. Ayrıca, % 0-10 rengi değişmiş olanlara (a); % 11-30 olanlara (b); % 31-50 olanla-ra (c); % 51-70 olanlara (d) % 71 den yukarı olanlara da (e) dereceleri verildi.

SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Bakteri inokülasyonundan altı gün sonra ilk bakteriyel solgunluk At-kerson varyetesinin **T. christiei** nematoduyla muamele görmüş saksıların-da görüldü. Dört gün sonra Floradel varyetesi ve yedi gün sonra da S—12 hibridi üzerinde solgunluk tesbit edildi. Floradel ve S—12 üzerinde sol-gunluk tedrici bir ilerleme gösterirken Atkerson, ilk symptomu gösterdi-ği tarihten 10 gün sonra, nematodsuz olanlar da dahil, tamamen çöktü.

Atkerson, Floradel çeşitlerinin ve S—12 hibridinin ne kontrol bitkile-rinde ve ne de yalnız nematodlarla muamele görmüş saksılarında hiçbir solgunluk belirtisi görüldü.

Soldan saęa: Atkerson, Ploradel, S-12 ve Kontrol



RESİM: 1 — *T. Christiei* ile *P. Solanacearum*'un ortak yaptıkları solgunluğun kontrollla mukayeseli görünüşü.



RESİM: 2 — *P. Brochyurus* ile *P. Solanacearum*'un ortak yaptıkları solgunluğun kontrollla mukayesesi.



RESİM: 3 — *M. Incognita* ile *P. Solanacearum*'un ortak yaptıkları solgunluğun kontrollu mukayesesi.



RESİM: 4 — Denemeden sonra yıkanan köklerin kategori derecelerine karşılık olan kök hacimlerinin 1 nolu kontrol köke göre mukayeseli görünüşleri.

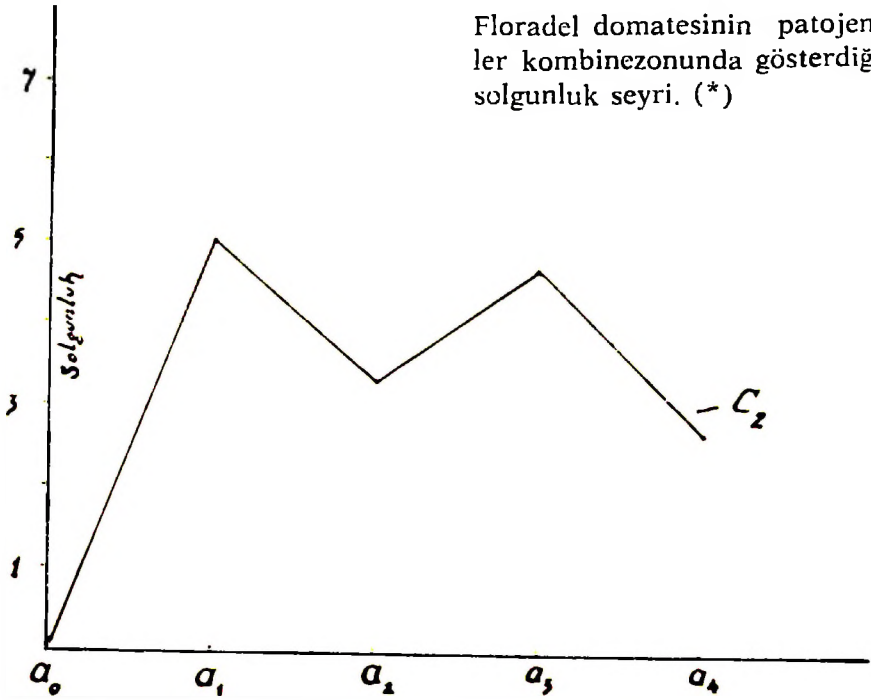
Ölçme sonuçları : Denemeye esas olan üç tip ölçmelerin muamele toplamları aşağıdaki tabloda gösterilmiştir.

Muamele nosu (T'ler)	Solgunluk	Bakteri yoğunluğu	Kök hacmi ve renk
1	16	1.180	3.3—e
2	15	0.825	3.3—e
3	6	0.149	2.66—d
4	0	0.055	1.7—c
5	0	0.007	1.3—b
6	0	0.065	2.0—b
7	21	2.77	4.0—e
8	10	1.886	3.6—d
9	11	1.325	2.0—d
10	0	0.033	1.3—a
11	0	0.058	1.3—a
12	0	0.070	1.6—a
13	8	0.830	1.7—d
14	14	1.738	2.6—d
15	10	0.042	3.0—d
16	0	0.052	1.3—b
17	0	0.040	1.3—b
18	0	0.053	1.7—b
19	21	3.25	4.0—e
20	8	0.183	3.0—e
21	0	0.099	1.0—a
22	0	0.055	1.0—a
23	0	0.050	1.0—a
24	0	0.064	1.0—a

Solgunluk kıymetlerine göre F (5 %) seviyede ANOVA, bütün nematod, bakteri ve varyetelerin denemeye «farklı sonuçlar verdiren etkililiklerini» gösterdi. Seviye kıyaslamalarında (nematod X varyete); (bakteri X varyete); (nematod X bakteri X varyete) de farklılık etkenliklerini gösterdi.

(Bakteri yoğunluk kıymetleri de A (az bir farkla hariç) aynı paralelde sonuçlar verdi. Kök hacim ve renk değerleri, sadece köklerde nematodların fonksiyonlarını belirtmek için tabloya alındı.)

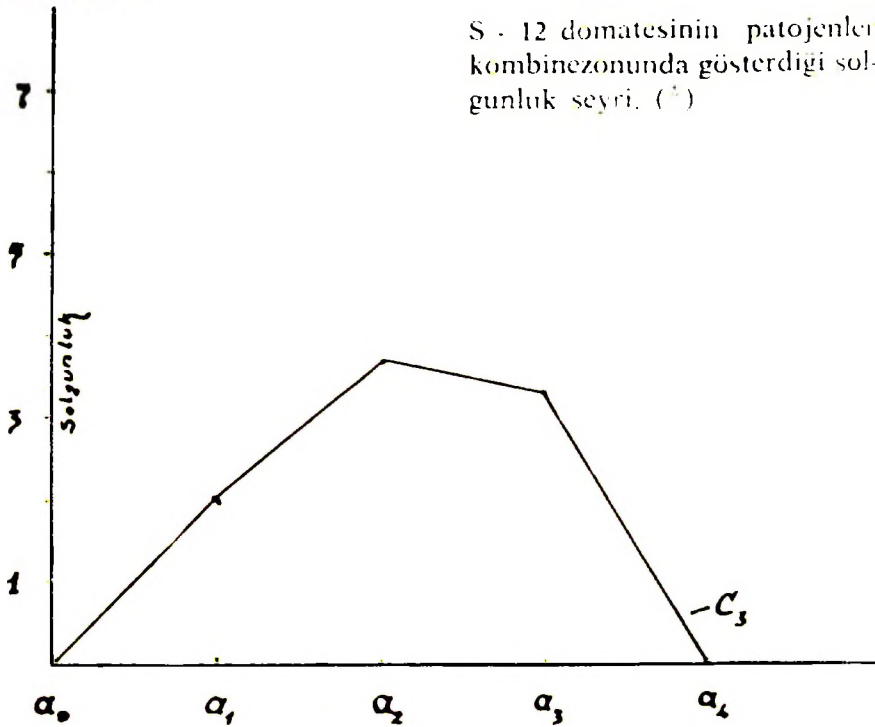
Floradel domatesinin patojenler kombinasyonunda gösterdiği solgunluk seyri. (*)



Bakterili

GRAFİK — 2

S - 12 domatesinin patojenler kombinasyonunda gösterdiği solgunluk seyri. (*)



(*) a_0 = Nematod ve bakteri yok; a_1 = P. brochyurus (+ bakteri); a_2 = T. christieff (+ bakteri); a_3 = M. incognita (+ bakteri); a_4 = Nematodsuz (+ bakteri); c_2 = Floradel;

Faktörlerin (bakteri sabit) alt kademelerinin iki yönlü tablolardaki durumu :

Nematodların varyeteler içinde kıyaslanması için gerekli LSD (% 5'e göre) 1.3688 bulundu. Buna göre alınan sonuçlar aşağıdadır.

1— Her bir domates varyetesi içinde nematodlu muamelelerle nematodsuzların mukayesesi :

$a_1 b_1 c_1^X$	$a_2 b_1 c_1$	$a_3 b_1 c_1^X$	$a_4 b_1 c_1$
$a_1 b_1 c_2^X$	$a_2 b_1 c_2$	$a_3 b_1 c_2^X$	$a_4 b_1 c_2$
$a_1 b_1 c_3^X$	$a_2 b_1 c_3^X$	$a_3 b_1 c_3^X$	$a_4 b_1 c_3$

2— Herbir domates varyetesi içinde *M. incognita* muamelelerinin nematodsuz ve diğer nematodların katıldıkları muamelelerle mukayesesi:

$a_1 b_1 c_1^X$	$a_2 b_1 c_1^X$	$a_3 b_1 c_1$	$a_4 b_1 c_1$
$a_1 b_1 c_2$	$a_2 b_1 c_2$	$a_3 b_1 c_2$	$a_4 b_1 c_2$
$a_1 b_1 c_3^X$	$a_2 b_1 c_3$	$a_3 b_1 c_3$	$a_4 b_1 c_3^X$

3— Herbir domates varyetesi içinde *T. christiei* muamelelerinin nematodsuz ve diğer nematodların katıldıkları muamelelerle mukayesesi:

$a_1 b_1 c_1^X$	$a_2 b_1 c_1$	$a_3 b_1 c_1^X$	$a_4 b_1 c_1$
$a_1 b_1 c_2^X$	$a_2 b_1 c_2$	$a_3 b_1 c_2$	$a_4 b_1 c_2$
$a_1 b_1 c_3^X$	$a_2 b_1 c_3$	$a_3 b_1 c_3$	$a_4 b_1 c_3^X$

Varyetelerin nematodlar içinde kıyaslanması için gerekli LSD (% 5'e göre) 1.2484 bulundu. Buna göre :

4— Herbir nematod patojeni içinde Atkerson domates varyetesinin diğerleriyle mukayesesi :

$a_1 b_1 c_1$	$a_2 b_1 c_1$	$a_3 b_1 c_1$
$a_1 b_1 c_2$	$a_2 b_1 c_2^X$	$a_3 b_1 c_2^X$
$a_1 b_1 c_3^X$	$a_2 b_1 c_3^X$	$a_3 b_1 c_3$

5— Herbir nematod patojeni içinde Floradel domates varyetesinin diğerleriyle mukayesesi:

$a_1 b_1 c_1$	$a_2 b_1 c_1^X$	$a_3 b_1 c_1^X$
$a_1 b_1 c_2$	$a_2 b_1 c_2$	$a_3 b_1 c_2$
$a_1 b_1 c_3^X$	$a_2 b_1 c_3^X$	$a_3 b_1 c_3$

Bütün tabloların incelenmesinden anlaşılacağı üzere bakteriyel solgunlukta nematodların işbirliği vardır ve solgunluğun derecesi, aynı zamanda konukçu bitkinin çeşit özelliğine bağlıdır.

Bu çalışma, bu konuda Kelman'ın (3) «inokülümdeki bakteri hücre sayısı her konukçu için belirli bir miktarı aştıktan sonra kökü yaralayıcı bir mekanizmaya ihtiyaç olmadan enfeksiyon vukubulur» görüşü «Atkerson» domatesinden alınan sonuçla desteklenmektedir. Buna karşılık, S—12 hibridinde nematodsuz 30×10^7 /ml. konsantrasyonunda (% 90-95 virulent) bakteri inoküle edilmiş olmasına rağmen, konukçuda en ufak bir solgunluğun görülmemesi, adı geçen araştırmacının görüşünde konukçu bitki çeşidi faktörünün dikkate alınmadığını ortaya koymaktadır. Bakterinin konukçuya enfeksiyonu için yaralanmayı şart gören Smith'i, (9) hernekadar S—12 misali onaylıyorsa da, Atkerson misali kendisinin, Kelman'ın hatasını aksi yönde yaptığını göstermektedir.

Bu deneme sonuçları bazı çeşitlerin P. Solanacearum tarafından enfeksiyonu için yaralanmanın gerektiğini, bazı çeşitlerin enfeksiyonun da ise bu gereğin olmadığını ortaya koymaktadır.

SUMMARY

A Greenhouse experiment was conducted with three specieses of plant parasitic nematodes (*Pratylenchus brochyurus*, *Trichodorus christiei* and *Meloidogyne incognita*) to determine their interacting potential in development of bacterial wilt on the three different tomato varieties (Atkerson, Floradel and S—12). At the end of this experiment it was determined that the bacteria added to each pod with the number of 30×10^7 cells didn't need nematode contribution in order to make very severe damage on the variety of Atkerson. In the other words, Atkerson showed a great susceptibility even in the case of absence of nematode interaction. Nematodes assisted *P. solanacearum* in Floradel, significantly. In variety S—12 bacteria failed to success of wilting precisely without nematode interactions.

LİTERATÜR KAYNAKLARI

1. CHRISTIE, J. R. 1959 Plant nematodes, their bionomics and control. University of Florida Agr. Expt. Station 256 p.
2. KELMAN, Arthur, 1954. The relationship of pathogenicity in *P. solanacearum* to colony appearance on a tetrozoliun medium. Phytopathology 44: 693 - 695.
3. KELMAN, and Sequeira. 1962. Root infection in relation to spread of *P. solanacearum*. Phytopathology 52: 16.
4. KELMAN, Arthur and Sequeira 1965. Root to Root Spread of *P. solanacearum*. Phytopathology 55: 304 - 309.
5. LIBMAN, Gerald, J. G. Leach, and Robert E. Adams, 1964. Role of Certain Plant - Parasitic Nematodes in Infection of Tomatoes by *P. solanacearum*. Phytopathology 54: 152 - 153.
6. PITCHER, R. S., 1963. Role of Plant - Parasitic Nematodes in bacterial Diseases. Phytopathology. 53: 35 - 39.
7. LUCAS, G. B., J. N. Sasser, and A. Kelman. 1955. The relationship of root - knot nematodes to Granville Wilt resistance in tobacco. Phytopathology 44: 693 - 695.
8. SMITH, E. F. 1908. The Granville tobacco wilt, P. 17 - 24 U. S. Dep. Agr. Bur. Ind. Bull., 141 (part-II)
9. SMITH, E. F. 1914. Bacteria in relation to plant diseases. Vol. 3 Carnegie Institution of Washington Publ. No: 27.
10. STEWART, R. U. and A. F. Schinder. 1956. The effect of some ectoparasitic nematodes on the expression of bacterial wilt of carnations. Phytopathology 46: 219 - 222.