

Domates bakteriyel kanser ve solgunluk hastalığıyla [*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis et. al] biyolojik mücadelede bakteriyel antagonistlerin etkinliğinin araştırılması

Senem AKAT¹, Hatice ÖZAKTAN¹

Investigation of efficiency of bacterial antagonists on biological control of Bacterial cancer of tomato [*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis et. al]

Abstract: The aim of the this study were to isolate potential antagonistic rhizobacteria of *Cmm*, and to investigate their efficiency on *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*) *in vitro* and on tomato plants. A collection of 49 bacterial strains, antagonistic of *Cmm* were isolated from rhizoplane of healthy plants as epiphytes and endophytes, originating from different provinces of Aegean Region, Turkey. Of these 49 strains, 40% inhibited *Cmm* with zones of inhibition ranged from 2 to 37 mm *in vitro* tests. The most efficient strains were fluorescent Pseudomonads according to *in vitro* test results. Eleven strains (S6/2EP, 19a, 2/9, S6/3EP, 11/1, S5/4, 30, 35EN, P.f. Bo, *Serratia*, 51) were screened *in vivo* pot experiments for control of bacterial canker. Experiment was set up as a randomized parcels with two replicates in two different growing seasons. According to the first experiment results; only four of the 11 strains reduced infection between the rate of 54 to 86% when applied as a seed treatment compared to the non treated control. These strains reduced the disease incidence by the rate of 80 to 97% when applied as a seed treatment followed by a root treatment before transplanting. This combined treatment was significantly more efficient than the seed treatment alone. In the second experiment; the disease was being controlled 50-60% with only the seed treatment. In the seed and root treatment before the transplanting of the seedlings, the antagonistic bacteria inhibited the *Cmm* by rate of 59 to 74%.

Key words: Bacterial canker of tomato, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, biological control, rhizobacteria

Özet: Bu çalışmanın amacı, domates bitkilerinden izole edilen kök bakterilerinin domateste bakteriyel kanser ve solgunluk etmeni *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*)'i engelleme potansiyellerinin *in vitro* ve *in vivo* koşullarda denenmesidir. Çalışmada Ege bölgesinde sağlıklı bitkilerin köklerinden elde edilen toplam 49 adet epifitik ve endofitik antagonist aday bakteri izolatu kullanılmıştır. Testlenen bakteriyel antagonistlerin % 40'ı *in vitro* testlerde 2-37 mm arasında değişen engelleme zonları oluşturarak *Cmm*'i engellemiştir. *In vitro* test sonuçlarına göre en etkili

¹Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, 35100, İzmir
Sorumlu yazar (Corresponding author) e-mail: senem.akat@hotmail.com
Alınış (Recieved): 30.05.2011 Kabul ediliş (Accepted): 16.08.2011

antagonistlerin floresan Pseudomonaslar olduğu saptanmıştır. Onbir bakteri izolatu (S6/2EP, 19a, 2/9, S6/3EP, 11/1, S5/4, 30, 35EN, P.f. Bo, *Serratia*, 51) *in vivo* sakı denemelerinde kullanılmak üzere seçilmiştir. Deneme iki farklı dönemde tekrarlanmıştır. İlk deneme sonuçlarına göre, on bir bakteriyel antagonistin dördü domates tohumlarına uygulandığında, Pozitif kontrol'e göre bakteriyel solgunluğu % 54-86 oranında engellemiştir. Bu isolatlar, tohum bakterizasyonu uygulamasını takiben şaşırtma sırasında köklere uygulandığında hastalık çıkışını % 80-97 oranında engelleyerek tek başına tohum uygulamasından daha başarılı bulunmuştur. İkinci denemede ise; tek başına tohum bakterizasyonu uygulaması ile hastalık % 50-60 oranında engellenirken, şaşırtmadan önce fideye yapılan tohum bakterizasyonu + kök daldırma biçimindeki uygulamada *Cmm*'e karşı % 59-74 oranında engelleme saptanmıştır.

Anahtar sözcükler: Domateste bakteriyel kanser ve solgunluk, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, biyolojik mücadele, kök bakterileri

Giriş

Ülkemizde domates yetiştiriciliğinin yapıldığı her bölgede görülebilen Domates bakteriyel kanser ve solgunluk hastalığı (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensi*,) ilk kez Bremer et al. (1952) tarafından Ankara ilinde saptanmıştır. Kahveci & Gürcan (1993)'ün bildirdiğine göre, sonraki yıllarda Karahan (1965) İç ve Güney Anadolu'da, Karaca & Saygılı (1977) Marmara ve Ege Bölgesi'nde, Ulukuş (1982) Elazığ, Diyarbakır ve Mardin'de, Çınar (1980) Çukurova Bölgesi'nde, Öktem (1985) Ankara ve Eskişehir'de etmenin varlığını saptanmışlardır. Domates bakteriyel kanser ve solgunluk hastalığının oldukça yıkıcı ve önemli kayıplara neden olduğu bilinmektedir. Etmen 1910 yılında A.B.D'de ilk rapor edilışinden bu yana, tüm dünya'ya yayılmış; tarla ve seradaki domateslerde ciddi kayıplara neden olmuştur (Hayward & Waterson 1964).

Domates bakteriyel kanser ve solgunluk hastalığının primer inokulum kaynağının tohum kabuğu veya embriyoda bulunan bakteri olması nedeniyle, bu hastalığa karşı alınabilecek mücadele önlemleri tohumdaki patojeni elimine etmeye yönelik olmalıdır (Özaktan & Bora 1991). Ancak uygulanabilirliği kabul edilmiş olan tohum uygulamaları *Cmm*'e karşı her zaman etkili olmayabilir (Thyr et al. 1973; Shoemaker & Echandi 1976). İkincil bulaşmalarda ise, yağmur, su, pestisit damlacıkları, budama, koltuk alma gibi kültürel işlemler ve şaşırtma rol oynamaktadır (Agrios 2005; Fatmi & Schaad 1988).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda *Cmm*'e karşı biyolojik mücadelenin alternatif bir yöntem olabileceği belirtilmektedir ve *Cmm*'in önlenmesine yönelik çalışmalarda bakteriyel antagonistlerle biyolojik mücadele çalışmaları dikkati çekmektedir (Umesha 2001; Boudyach et al. 2001). Bakterinin birincil bulaşma kaynağı infekteli tohumdur. Hastalık bitki içerisinde iletim demetleri boyunca sistemik olarak yayılmakta ve çiçeklenme döneminde solgunluk ve kanser lezyonları belirginleşmeye başlamaktadır. Etmenin bitkiye oldukça erken dönemde giriş yapması nedeniyle, bu aşamadan sonra hastalığı önlemek mümkün değildir (Özaktan & Bora 1991).

Bu çalışmanın amacı; domates bitkilerinden izole edilen kök bakterilerinin yanı sıra Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi (E.Ü.Z.F.) Bitki Koruma Bölümü Bakteriyoloji laboratuvarı stoklarında bulunan çeşitli konukçu x patojen sisteminde biyolojik mücadele açısından etkililiği kanıtlanmış antagonist bakterilerin domateste bakteriyel kanser ve solgunluk etmeni *Cmm*'i engelleme potansiyellerinin *in vitro* ve *in vivo* saksı denemeleriyle belirlenmesidir.

Materyal ve yöntem

Araştırmada kullanılan bitkisel materyal

Bu çalışmada test bitkisi olarak standart domates çeşidi olan Rio Grande kullanılmıştır. Domates tohumları steril torfta çimlendirilmiş, fideler 3 hafta sonra 1:1:1 torf, kum, gübre karışımına şaşırtılmıştır.

Araştırmada kullanılan test patojeni

Çalışmada test patojeni bakteri olarak, daha önce E.Ü.Z.F. Bitki Koruma Bölümü Bakteriyoloji laboratuvarı stoklarında bulunan, kesin tanısı yapılmış *Cmm* strainlerinden virülensi en yüksek olan *Cmm 7* straini kullanılmıştır.

Araştırmada kullanılan bakteriyel antagonistler

Çalışmada, İzmir ve çevresinde sanayi domatesi üretim alanlarından ve seralarda yetişen domates bitkilerinin kök bölgesinden izole edilen bakteriyel biyolojik mücadele elemanları kullanılmıştır. İzole edilecek epifitik antagonist aday bakterilerin izolasyonunda, sağlıklı domates kök dokularından yüzeysel kesitler alınarak 100 ml Fosfat tamponu (0.1 M) içinde 30 dakika süreyle çalkalayıcıda tutulduktan sonra (Geels & Schippers, 1983) King-B (King et al. 1954; Cuppels & Elmhirst 1999) besi yerlerine ekim yapılmıştır.

Endofitik antagonist aday bakterilerin izolasyonunda ise; sağlıklı domates kök dokularından kesit alındıktan sonra yüzey dezenfeksiyonu yapılmış (% 0.5 NaOCl) ve bu kesitler steril havanda ezilerek homojenize edilmiştir. Elde edilen homogenattan King-B besi yerine çizgi ekim yapılmıştır. 24-48 saatlik inkubasyondan sonra besi yerlerinde gelişen koloniler incelenerek saflaştırılmıştır. Gram (+) bakteriler ve UV ışık altında (366 nm) fluoresens gösteren strainler aday antagonist olarak seçilmiştir.

Bu izolatlarla ek olarak, E.Ü.Z.F Bitki Koruma Bölümü Bakteriyoloji laboratuvarı stoklarında bulunan çeşitli konukçu x patojen sisteminde biyolojik mücadele açısından etkililiği kanıtlanmış 26 adet antagonist bakteriler de bu çalışmada kullanılmıştır (Çizelge 1).

Çizelge 1. Bakteriyoloji laboratuvar kültür stoklarında bulunan ve çalışmada kullanılan antagonist bakterilerin listesi

Table 1. The list of antagonistic bacterial isolates used in this study from bacteriology laboratory culture collection

İzolat kodu	İzole edildiği konukçu bitki	Türü
15/1	Hıyar	<i>Pseudomonas putida</i>
114/2	Hıyar	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
31/1m	Fasulye	Gram (-)
30/1 m	Fasulye	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
6a	Fasulye	Gram (+)
8/3en	Zeytin	Gram (+) <i>Brevibacillus</i>
39 ep	Zeytin	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
180	Kavun	<i>Pseudomonas putida</i>
22ep	Zeytin	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
62	Domates	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Serratia</i> spp	Domates	<i>Serratia liquefaciens</i>
70	Domates	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
30	Kavun	<i>Pseudomonas putida</i>
11/1	Fasulye	Gram (+)
2/9	Fasulye	Gram (+)
19a	Nohut	<i>Bacillus micoides</i>
40/2 ep	Zeytin	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
51	Bezelye	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
50	Bezelye	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
35 en	Zeytin	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Pf bo	Domates	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
31/1 en(+)	Zeytin	<i>Bacillus sereus</i>
66/3	Domates	<i>Bacillus</i> sp.
18/1K	Domates	<i>Pseudomonas putida</i>
10/1en	Zeytin	<i>Bacillus mycoides</i>
109	Kavun	<i>Pseudomonas fluorescens</i>

Bakteriyel antagonistlerin *Clavibacter michiganensis*'e karşı biyolojik mücadele potansiyellerinin testlenmesi

In vitro testler: Antibiosis etkisi testlenecek kökbakterileri nokta ekim ile Nutrient Broth Yeast Extract Agar (NBYA) besiyerine birbirine eşit uzaklıkta 4 noktaya ekilerek, 48 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra bu petrilere, 10^8 cfu/ml konsantrasyonunda patojen *Cmm* süspansiyonu pülverize

edilerek 72 saat süreyle, 24 °C' de inkubasyona bırakılmıştır (Jetiyanon & Kloepper 2002; Boudyach et al. 2001). Kökbakterilerinin çevresinde oluşan engelleme zonları mm olarak ölçülmüştür. *In vitro* antagonistik etki testlerinde bakteriyel antagonistlerin etkililiği ile karşılaştırmak amacıyla % 6.8 w/w Cu içeren Labicuper (üretici firma, Mavesa) ve % 6.3 w/w Cu içeren Sergomil L-60 (üretici firma, Servalesa) gibi kimyasallar kullanılmıştır. *In vitro* testlerde bu kimyasalların 3, 10 ve 30 µg/ml'lik dozları denenmiştir. Belirtilen dozlar, sterilize edildikten sonra, 40-45 °C'ye soğutulmuş King-B besiyerine karıştırılmıştır. *Cmm*'in 48 saatlik kültüründen 2.5×10^9 hücre/ml yoğunluğuna sahip olan bir süspansiyon hazırlanmıştır. Elde edilen bu süspansiyondan petrilere 100 µl oranında verilmiş ve steril cam bağıet ile petri yüzeyine yayılmıştır. Petrilere 48 saat süreyle inkubasyona bırakılmış ve gelişen koloniler sayılarak kimyasalların *Cmm*' e etkisi değerlendirilmiştir. *In vitro* testler 3 tekerrürlü olarak kurulmuştur.

***In vivo* testler:** *In vitro* antibiosis testlerinde *Cmm*'in gelişimini başarıyla engelleyen bakteriyel antagonistler, *in vivo* saksı denemelerinde *Cmm*'e karşı etkililikleri açısından testlenmiştir. Bakteriyel antagonistler tohum ve fideye uygulanmıştır. Bu uygulamalar (1) tohum ve (2) tohum bakterizasyonunu takiben domates fidelerinin saksılara şaşırtılmasından önce kök uygulaması şeklinde yapılmıştır.

Tohum bakterizasyonu: Antagonist bakteri uygulaması yapılacak domates tohumlarına yüzey dezenfeksiyonu (% 1'lik NaOCl) yapıldıktan sonra 2 kez yıkanıp kurutulmuştur. Triptic soya agar (TSA)'da 24 saat süreyle geliştirilen bir petri kabı dolusu bakteriyel inokulum % 1.5'lük orta viskozitedeki carboxy methyl cellulose (CMC, 5 ml) ile süspanse edilmiştir. Domates tohumları (5g tohum / 5ml süspanسیون) bu bakteri süspanسیونu ile 30 dakika boyunca dairesel çalkalayıcıda (120 rpm) kaplanmış ve 1 saat süreyle oda sıcaklığında kurutulmuştur (Callan et al. 1997). Bakterizasyon yapılmış tohumlar içinde steril torf bulunan viyollere ekilmiş, bakterizasyon yapılmamış tohumları içeren viyoller ise kontrol olarak kullanılmıştır. Viyoller 3- 4 hafta süreyle 24 °C'de 12 saatlik fotoperiyotta iklim odasında tutulmuştur.

Tohum bakterizasyonu ve kök uygulaması: Yukarıda belirtildiği şekilde tohum bakterizasyonu yapılan 3-4 haftalık domates fidelerin torfu artırılarak kökleri hafif tıraşlanmış, şaşırtma sırasında önce antagonist bakteri süspanسیونuna (10^8 cfu/ml konsantrasyonunda, 600 nm'de OD: 0.45) 5 dakika süreyle daldırılmış, daha sonra, 30 dakika süreyle *Cmm* süspanسیونuna daldırılarak saksılara şaşırtılmıştır. Antagonist uygulamalarının etkililiğini karşılaştırmak amacıyla, *in vivo* etki testlerinde Labicuper (% 6.8 w/w Cu) ve Sergomil L-60 (% 6.3 w/w Cu) adlı preparatlar üretici firmalar tarafından önerilen uygulama dozunda (3 µg/ml) kullanılmıştır (tohum bakterizasyonu ve tohum bakterizasyonu + kök uygulaması). Bu preparatlar domates fideleri şaşırtıldıktan sonra köklere içirme şeklinde (100 ml/ 3 bitki/ saksı) verilmiştir. Pozitif kontrolde ise, domates fidelerinin köklerine yalnızca *Cmm* süspanسیونu uygulanmıştır. *In vivo* saksı testleri 4 yinelemeli

olarak yapılmıştır, her yinelemede 2 bitki yer almıştır. Patojen uygulamasından 30 gün sonra, her yinelemede yer alan bitkilerde *Cmm*'den kaynaklanan solgunluğu 0-4 skalasına göre değerlendirilmiştir (0: Hiç hastalık görülüyor, 1: Aşağıdan yukarıya bitkinin 1/4'ü solmuş veya kurumuş, 2: Aşağıdan yukarıya bitkinin 1/2 si solmuş veya kurumuş, 3: Aşağıdan yukarıya bitkinin 3/4'ü solmuş veya kurumuş, 4: Tüm bitki solmuş veya kurumuş).

Bulgular ve tartışma

Araştırmada kullanılan antagonist bakterilerin izolasyonu

Yapılan izolasyon çalışmaları sonucunda, 23 antagonist aday bakteri straini elde edilmiştir. İzole edilen bu bakterilerin % 80'inin epifitik kök bakterisi, % 20'inin ise endofitik kökbakterisi olduğu saptanırken, tüm bu etmenlerin % 70'inin

Çizelge 2. Domates bitkilerinin kök bölgesinden izole edilen antagonist adayları
Table 2. The antagonistic bacteria isolated from rhizosphere of tomato plants

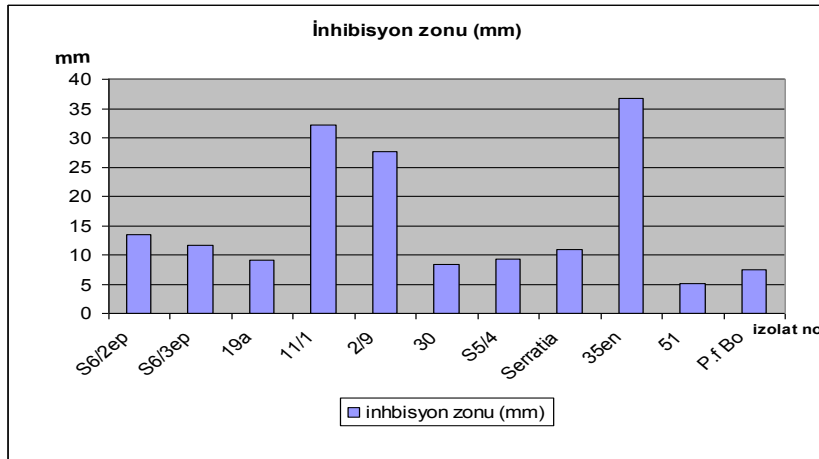
İzolat kodu	Konukçu	İzole edildiği yer		Türü
S1/1	Domates	Tire/Atalan tarla 1	Flourosent	Epifitik
S1/2	Domates	Tire/Atalan tarla 1	Flourosent	Epifitik
S2FL	Domates	Tire/Atalan tarla 2	Flourosent	Epifitik
S2/1	Domates	Tire/Atalan tarla 2	Gram (+)	Endofit
S2/2	Domates	Tire/Atalan tarla 2	Gram (+)	Endofit
S3FL	Domates	Torbalı / Ege fideyanı	Flourosent	Epifitik
S3/1	Domates	Torbalı / Ege fideyanı	Gram (+)	Endofit
S4/1	Domates	Bayındır /Zeytinova	Flourosent	Endofit
S4/2	Domates	Bayındır /Zeytinova	Flourosent	Epifitik
S4/3	Domates	Bayındır /Zeytinova	Flourosent	Endofitik
S4/4	Domates	Bayındır /Zeytinova	Gram (+)	Epifitik
S4/5	Domates	Bayındır /Zeytinova	Gram (+)	Epifitik
S4/6	Domates	Bayındır /Zeytinova	Gram (+)	Endofitik
S5/1 ep	Domates	Akçapınar /Turgutlu	Gram (+)	Epifitik
S5/1en	Domates	Akçapınar /Turgutlu	Flourosent	Endofitik
S5/3en	Domates	Akçapınar /Turgutlu	Flourosent	Endofitik
S5/4	Domates	Akçapınar /Turgutlu	Gram (+)	Endofitik
S6/1ep	Domates	Sart / Turgutlu	Flourosent	Epifitik
S6/1en	Domates	Sart / Turgutlu	Flourosent	Endofitik
S6/2en	Domates	Sart / Turgutlu	Flourosent	Endofitik
S6/2ep	Domates	Sart / Turgutlu	Flourosent	Epifitik
S6/3ep	Domates	Sart / Turgutlu	Flourosent	Epifitik
S6/6	Domates	Sart / Turgutlu	Fluoresent(+)	Epifitik

fluorescent pseudomonas (F.P) olduğu, Biomerieux 50 CHB/E Medium API tanı kiti kullanılarak % 26'nın Bacillus spp, 32 GN ve Biomerieux API 20E tanı kiti kullanılarak % 4'ünün ise *Serratia* spp. olduğu belirlenmiştir (Çizelge 2).

Bakteriyel antagonistlerin *Clavibacter michiganensis*'e karşı biyolojik mücadele potansiyellerinin testlenmesi

In vitro test sonuçları

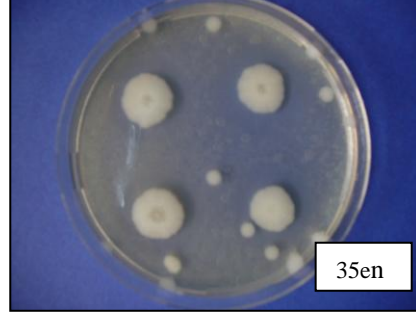
Bu çalışma sırasında 23'ü izole edilen toplam 49 antagonist adayı bakteri *Cmm*'e karşı *in vitro* biyolojik mücadele potansiyeli açısından testlenmiştir. *In vitro* test sonuçlarına göre; 19 izolat 5–37 mm arasında değişen engelleme zonları oluşturarak *Cmm*'in kolonyal gelişimini başarıyla engellemiştir. En yüksek engelleme zonunu 35 ENen kodlulu izolat 37 mm oluştururken (Şekil 1, Şekil 2), en düşüğünü ise 51 kodlu izolat (5 mm) oluşturmuştur. *Cmm*'e karşı bakteriyel antagonistlerden toplam 30 adeti *in vitro*'da hiçbir etki gösterememiştir. Bu test sonuçlarına göre; engelleme zonu oluşturma potansiyellerine bakılarak 11 izolat (S6/2EP, 19a, 2/9, S6/3EP, 11/1, S5/4, 30, 35EN, P.f.Bo, *Serratia*, 51) *in vivo* testlerde kullanılmak üzere seçilmiştir (Şekil 1).



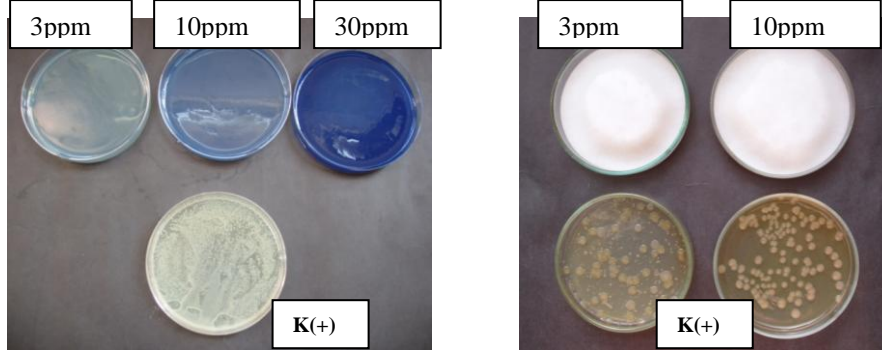
Şekil 1. Antagonist bakterilerin *in vitro* testlerde *Clavibacter michiganensis*'e karşı oluşturdukları engelleme zonları (mm).

Figure 1. The inhibition zones (mm) produced by antagonistic bacteria against *Clavibacter michiganensis*.

In vitro testlerde en yüksek engelleme zonu oluşturan antagonist adayı bakterilerin yanı sıra daha düşük engelleme zonu oluşturanlara da *in vivo* saksı denemelerinde yer verilmiştir. Denemede, düşük engelleme zonu oluşturan antagonist adaylarına yer verilmesinin sebebi; *in vitro* ve *in vivo* testlerin sonuçlarının her zaman uyumlu olmamasıdır. *In vitro* testlerde etkililiği araştırılan preparatlar, testlendikleri her 3 oz uygulamasında (3, 10, 30 ppm) da *Cmm*'i tamamen engellemeyi başarmıştır (Şekil 3).



Şekil 2. 35en antagonisinin *Clavibacter michiganensis*'e *in vitro*'da antagonistik etkisi.
Figure 2. The antagonistic activity of the bacteria strain 35en against to *Clavibacter michiganensis in vivo*.



Şekil 3. Labicuper (solda) ve sergomil (sağda) preparatlarının *Clavibacter michiganensis*'e karşı *in vitro* testlerde etkililiği.
Figure 3. The efficacy of Labicuper (left) and sergomil (right) against *Clavibacter michiganensis in vitro*.

***In vivo* test sonuçları**

In vitro'da elde edilen sonuçlara göre, seçilen 11 antagonist bakteri ve iki referans preparat *in vivo* saksı testlerine alınmıştır. *In vivo* saksı denemeleri 2 kez yinelenmiştir. Saksı denemelerinde tohum bakterizasyonundan elde edilen sonuçlar Çizelge 3'de, tohum bakterizasyonu + kök uygulamalarının sonuçları ise Çizelge 4'te yer almaktadır. Tohum bakterizasyonu şeklinde yapılan uygulamaların pozitif kontrolde hastalık şiddeti % 60 olarak saptanırken, *Serratia* spp. kodlu izolatin hastalığı % 49'luk bir etki ile engellediği sonucuna varılmıştır. *Serratia* spp. uygulaması hem hastalık bakımından hem de vejetatif aksam gelişimi yönünden oldukça iyi sonuç vermiştir (Şekil 4). Referans olarak seçilen Sergomil *Cmm*'nin bitkideki gelişimini % 39 oranında engellerken, Labicuper ise hastalığı % 5'lik bir etki ile oldukça düşük bir oranda önleyebilmiş ve bitkilerde gelişme geriliği gözlenmiştir (Şekil 5).



Şekil 4. *Serratia* spp. antagonistinin *Clavibacter michiganensis*'e karşı *in vivo* testlerde etkililiği.

Figure 4. The efficacy of the bacteria strain *Serratia* spp. against *Clavibacter michiganensis* *in vivo* tests.



Şekil 5. Labicuper (solda) ve sergomil (sağda) preparatlarının *Clavibacter michiganensis*'e karşı *in vivo* testlerde etkililiği.

Figure 5. The efficacy of Labicuper(left) and sergomil (right) against *Clavibacter michiganensis* *in vivo*.

Tohum bakterizasyonu + kök uygulaması biçiminde sisteme verilen antagonist bakterilerin domates bitkilerinde ortalama hastalık şiddetini % 10-97 oranında azalttığı gözlenmiştir. Bu bakterilerden 19A, S6/2 EP, S6/3 EP, 30 ve 51 kodlu izolatlar *Cmm*' in solgunluk gelişimini % 80-97 oranında engelleyerek en başarılı antagonistler olmuştur. S6/2EP kodlu izolat tohum + kök uygulaması biçiminde patosisteme verildiğinde *in vivo* saksı denemelerinde hastalığı % 97 oranında engelleyen en başarılı kök bakterisi olmuştur (Şekil 6).Tohum bakterizasyonu ile tohum bakterizasyonu + kök uygulamaları karşılaştırıldığında ise, istatistiki açıdan tohum bakterizasyonu + kök uygulamalarının *Cmm*'e karşı daha başarılı olduğu dikkati çekmiştir (Şekil 7).

Çizelge 3. *In vivo* tohum bakterizasyonu uygulamalarının *Clavibacter michiganensis*'in gelişimine etkisi

Table 3. The effect of seed bacterization treatment on *Clavibacter michiganensis* growth *in vivo*

Tohum	Birinci saksı denemesi		İkinci saksı denemesi	
	Ortalama has	% etki**	Ortalama has	% etki**
Kontrol (-)	0.0 ^{a*}		0.0 ^a	
51	8.3 ^{abc}	86.4	40.5 ^{abcd*}	36.8
S5/4	10.4 ^{abc}	79.6	46.9 ^{cd}	26.4
19A	12.5 ^{bcd}	77.8	45.6 ^{cd}	28.2
S6/2 EP	21.9 ^{cde}	54.1	41.7 ^{abcd}	34.6
30	28.1 ^{def}	69.4	70.8 ^d	----
<i>Serratia</i> sp	31.2 ^{defg}	48.7	32.3 ^{abc}	49.3
11/1	43.7 ^{efg}	28.7	39.6 ^{abcd}	39.6
S6/3 EP	43.7 ^{efg}	28.7	45.8 ^{bcd}	28.7
PF.BO.	44.8 ^{efg}	30.7	24.0 ^{abc}	60.8
Sergomil	39.6 ^{efg}	38.8	41.7 ^{abcd}	34.6
35 EN	55.2 ^{fg}	14.4	60.4 ^{cd}	5.2
2/9(+)	52.1 ^{fg}	15.1	55.6 ^{cd}	12.8
Kontrol(+)	60.4 ^{fg}	----	63.7 ^d	-----

*Tekerrürlerde saptanan ortalama hastalık şiddeti (%) değerlerine uygulanan Duncan testi sonucunda aynı harfi taşıyan uygulamalar, P<0.05 olasılıkla birbirinden farklıdır.

**Değerler, uygulamalardan elde edilen ortalama hastalık şiddeti (%) değerlerinin pozitif kontrol uygulamasından farklılığını (%) göstermektedir.

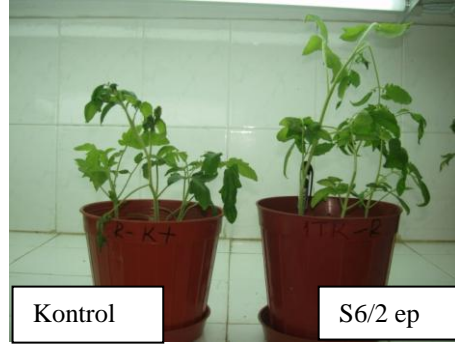
Çizelge 4. *In vivo* tohum bakterizasyonu+kök uygulamalarının *Clavibacter michiganensis*'in gelişimine etkisi

Table 4. The effect of seed bacterization and root bacterization on *Clavibacter michiganensis* growth *in vivo*

Tohum + kök uygulamaları	Birinci saksı denemesi		İkinci saksı denemesi	
	Ortalama has şiddeti (%)*	% etki**	Ortalama has şiddeti (%)*	% etki**
Kontrol (-)	0.0 ^a		0.0 ^a	
S6/2 EP	2.1 ^{ab}	96.6	19.8 ^{ab}	68.0
30	2.1 ^{ab}	96.6	16.7 ^a	73.9
S6/3 EP	4.1 ^{abc}	93.6	35.4 ^{abcd}	44.4
51	12.5 ^{abc}	79.6	41.7 ^{abcd}	34.5
19A	12.5 ^{bcd}	79.6	19.8 ^{ab}	68.0
11/1	41.7 ^{efg}	44.5	45.8 ^{bcd}	28.1
2/9(+)	39.6 ^{efg}	42.0	38.5 ^{abcd}	39.5
35 EN	56.2 ^{fg}	9.6	45.8 ^{bcd}	28.1
PF.BO.	56.2 ^{fg}	18.5	26.0 ^{abc}	59.1
S5/4	66.7 ^g	0.0	49.0 ^{cd}	21.6
Labicuper	60.4 ^{fg}	4.9	59.4 ^{cd}	6.8
Kontrol(+)	60.4 ^{fg}	----	63.7	

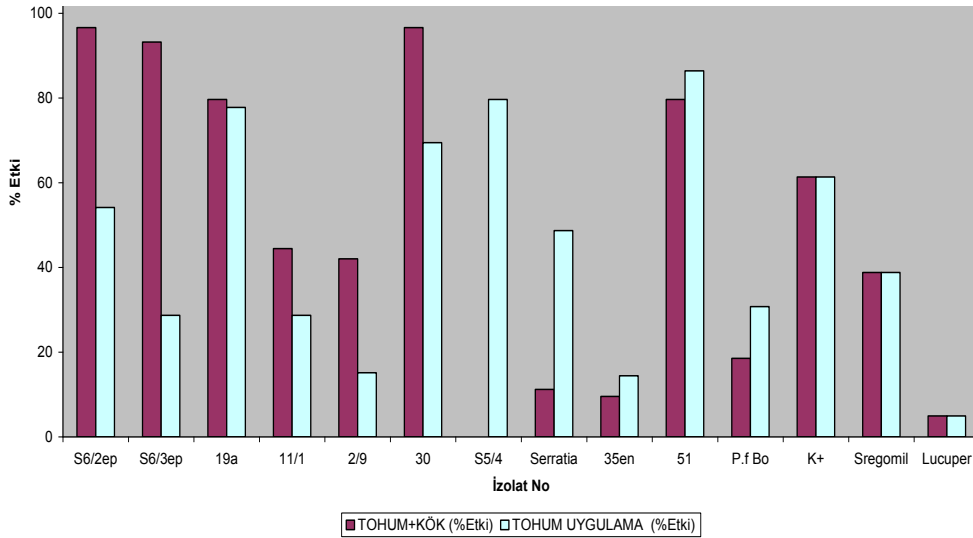
*Tekerrürlerde saptanan ortalama hastalık şiddeti (%) değerlerine uygulanan Duncan testi sonucunda aynı harfi taşıyan uygulamalar, P<0.05 olasılıkla birbirinden farklıdır.

**Değerler, uygulamalardan elde edilen ortalama hastalık şiddeti (%) değerlerinin pozitif kontrol uygulamasından farklılığını (%) göstermektedir.



Şekil 6. S6/2 EP kodlu izolatın *Clavibacter michiganensis*'e karşı etkisi.

Figure 6. The efficacy of the bacteria strain S6/2 EP against *Clavibacter michiganensis in vivo*.



Şekil 7. Tohum ve tohum + kök uygulamalarının karşılaştırılması.

Figure 7. The comparison of seed bacterization with seed and root bacterization.

Yapılan çalışmalar sonucu elde edilen verilere göre; birinci saksı testlerinden alınan sonuçlar değerlendirildiğinde; PF. Bo, *Serratia* ve S5/4 kodlu izolatlar hariç, genel anlamda tohum bakterizasyonu + kök içirme şeklinde yapılan uygulamanın başarılı olduğunu söylemek mümkündür. Tohum bakterizasyonu biçiminde yapılan uygulamada ortalama etki % 49 iken, tohum bakterizasyonu + kök uygulaması şeklinde yapılan uygulamada bu etkinin % 52 olduğu saptanmıştır. Tohum bakterizasyonu şeklinde yapılan uygulama sonucunda bazı antagonistler hariç (30 kodlu izolat), her iki denemede de çok büyük bir farklılık olmadığı saptanmıştır. 51, S5/4, 19A, S6/2EP, 11, S6/3EP, PF.BO ve *Serratia* kodlu antagonistler *Cmm*'e karşı her iki denemede de etkili bulunmuşlardır (Çizelge 3). Tohum bakterizasyonu +kök uygulamalarından alınan sonuçlara göre; tohum bakterizasyonu uygulamasında olduğu gibi iki farklı dönemde gerçekleştirilen denemeler arasında

farklılık gözlenmemiştir. Her iki denemede de PF.BO, S6/2ep, 30, 19A, 51, S6/3EP, 2/9, ve 11/1 kodlu izolatlarda saptanan hastalık şiddetleri aynı düzeylerde olmuştur. (Çizelge 4).

Son yıllarda *Cmm*'e karşı biyolojik mücadelenin alternatif bir mücadele yöntemi olabileceği ifade edilmektedir. Bu amaçla bakteriyel antagonistlerle biyolojik mücadeleye yönelik pek çok çalışma yapılmıştır. Ülkemizde yapılan çalışmalara örnek olarak; domates meyve etinin fermantasyon sıvısından, fermantasyon sırasında izole edilen antagonistik bakterilerin *Cmm*'e olan etkisinin araştırıldığı (Özaktan & Bora 1991), polen ve propolis ekstraktı kullanımının patojen bakteriye etkisinin araştırıldığı (Basım et al. 2005) çalışmalar verilebilir.

Dünyada *Cmm*'in biyolojik mücadelesi konusunda yapılan çalışmalara bakıldığında *in vitro* testlerde *Streptomyces pulcher* ve *S. citrefluorescens*'in etkisinin araştırıldığı (El-Abyad et al. 1992), bakteriyel antagonistlerle *Cmm*'i engellemeye yönelik *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar (Boudyach et al. 2001; Slusarski 2004; Umeha 2001), mercanköşk, kekik, yer fesleğeni, lavanta, adaçayı, yabani fesleğen, kuşburnu ve geyik otu gibi çeşitli bitkilerden elde edilen eterik yağların *in vitro* koşullarda *Cmm*'e karşı olan etkilerinin değerlendirildiği çalışmalar (Dimitra 2002) sayılabilir.

Bu çalışmada izole edilen bakterilerin % 70'inin fluorescent pseudomonas, % 26'sının *Bacillus* spp, % 4'ünün ise *Serratia* spp. olduğu saptanmıştır. Boudyach et al. (2001), domates rizosfer ve rizoplane' inden izole edilen antagonistlerin *Cmm* infeksiyonunu başarıyla engellediğini ve bu antagonist bakterilerinin genelde floresan Pseudomonaslar olduğunu bildirmiştir. Araştırmacıların elde ettikleri *in vivo* test sonuçlarında oranla; Gram (-) bakterilerin, Gram (+) bakterilere göre domates bitkisinin köklerindeki kolonizasyon yeteneklerinin daha iyi olduğunu, Pseudomonas türlerinin ise oldukça hızlı üreme yeteneğine sahip olduğunu belirtmişlerdir. Bunun ise kökteki eksudatlarla ilişki olduğu sonucuna varmışlardır. Bakterilerin besin ihtiyaçlarının kök tarafından salgılanan bazı metabolitler sayesinde karşılandığını saptamışlardır. Ayrıca bu bakteriler tarafından üretilen bazı antibiyotik bileşikleri ve sideroforların özellikle kök hastalıklarında yaygın biçimde biyolojik mücadele elemanı olarak kullanılabilceği belirtilmektedir (Boudyach et al. 2001). Umeha (2001), antagonistik *Pseudomonas fluorescens* (*P. flourescens*) ile tohum bakterizasyonu uygulamasının laboratuvar koşullarında *Cmm* gelişimini başarıyla engellediğini saptamıştır. Yapılan başka bir çalışmada ise, *Bacillus subtilis*'in (*B. subtilis*) in de içinde bulunduğu bir gurup antagonistin *Cmm*'e olan etkisi belirlenmiştir. Sera koşullarında, *B. subtilis* (Quadra 136), *B. subtilis* (Quadra 137) domates bitkilerine püskürtülerek uygulandığında, *Cmm*'den kaynaklanan bakteriyel solgunluk ve kanser hastalığını başarıyla engellediği saptanmıştır (Utkhede & Koch 2004).

Yürütülen bu çalışmada, iklim odası koşullarında gerçekleştirilen ve iki kez yinelenen saksı testlerinden elde edilen sonuçlara göre, antagonistlerin etkililiği açısından tekrarlar arasında, bazı uygulamalar hariç elde edilen sonuçların birbirini destekleyici nitelikte olduğu söylenebilir. El-Abyad (1992) tohum bakterizasyonu,

tohum daldırma ve toprak inokulasyonu yöntemlerini kullanmış ve *Cmm*'e karşı en iyi yöntemin tohum bakterizasyonu uygulaması olduğunu bildirmiştir. Bizim çalışmamızda, *in vivo* testlerde tohum bakterizasyonu + kök içirme uygulamasının tohum bakterizasyonu uygulamasına oranla hastalığı önlemede daha başarılı olduğu saptanmıştır. Yapılan bir başka çalışmada yine tohum bakterizasyonu+kök uygulamasının, tohum uygulamasına oranla daha başarılı olduğu tespit edilmiştir. Araştırmacılar bunun sebebini domates bitkisinin ikincil dokularının farklılaşması sırasında oluşan ve giderek artan bir dayanıklılık mekanizmasına bağlamışlardır. Şaşırtma sırasında patojene karşı korunma gereksinimi duyan kök uçlarının antagonistlere daldırıldıktan sonra dikim yapılmasının daha etkili bir uygulama olduğunu bildirilmişlerdir (Boudyach et al. 2001).

Yürütülen bu çalışmada *in vivo* saksı denemelerinde, floresan *Pseudomonas*ların oldukça başarılı olduğu saptanmıştır. Umeha (2001), *P. fluorescens*'in farklı formülasyonlarının (saf kültür süspansiyonu ve talk pudra), 3 farklı domates çeşidinde de *Cmm*'i önemli ölçüde engellediğini saptamıştır. Slusarski (2004), tohum bakterizasyonu + kök içirme yöntemine benzer bir yöntemi kullanarak, dezenfektan, antagonist bakteri ve greyfurt ekstraktını damla sulama sistemi ile bitkilere vermiştir. En iyi sonucu greyfurt ekstraktından elde etmiş, bunu antagonist bakteriler ve dezenfektanlar izlemiştir.

Çalışmada *in vitro* test sonuçları ile *in vivo* test sonuçlarının her zaman birbirini destekleyici olmadığı saptanmıştır. Bu durum biyolojik mücadelenin oldukça sık rastlanan bir sonucudur. Antagonist bakteri agar+besi yerinde patojenin gelişimini engelleyici antibiyotik veya bazı metabolitleri üretebilir, ancak saksı testlerinde bunu yapmakta güçlük çekebilir. Antagonist bakteri ve patojen petri kabında birbirinden belli uzaklıkta ekildiği için karşılaşma olasılığı yüksek olabilir ancak saksıda bu şansı bulamayabilirler. Saksı testlerinde her ne kadar sıcaklık, nem gibi parametreler ayarlanırsa da toprakta / kök yüzeyinde antagonistin kolonize olması veya toprağın mikro florası üzerine yapılacak çok şey olmadığı için bu tip uyumsuzluklarla karşılaşılabilir (Cook & Baker 1983; Bora & Özaktan 1998).

Bu çalışmada etkisi araştırılan referans kimyasallar, *Cmm*'i engellemede bazı bakterilerden daha başarısız bulunmuştur. Labicuper her iki *in vivo* denemede de en başarısız uygulamalar arasında yer almış, diğer bir kimyasal preparat olan Sergomil'e oranla düşük bir etkililik göstermiştir.

Sonuç olarak; hastalıkla mücadele konusunda çevre ve insan sağlığı açısından zarar teşkil etmeyen bazı kimyasallar ve biyolojik uygulamaların da yer aldığı entegre mücadeleye ve bitki iletim sistemlerine yapılacak uygulamalara (damla sulama sistemine antagonistlerin ya da kimyasalların verilmesi vb. gibi) ağırlık verilmelidir.

Kaynaklar

- Agrios G.N. 2005. Plant Pathology, Elseviere Academic Pres. (5 th ed.), 638 -639.
- Basım E., H. Basım & M. Özcan 2005. Antibacterial activities of Turkish pollen and propolis extracts against plant bacterial pathogens. *Journal of Food Engineering*, 77: 992-996.

- Bora T. & H. Özaktan 1998. Bitki Hastalıklarıyla Biyolojik Mücadele. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Fitopatoloji Anabilim Dalı Yayınları, 132 -136.
- Boudyach E.H., M. Fatmi, O. Akhayat, E. Benizri & A. Ben-Aoumar 2001. Selection of antagonistic bacteria of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* and evaluation of their efficiency against Bacterial canker of tomato, *Biocontrol Science and Technology*, 11: 141-149.
- Bremer H., G. Karel, K. Bıyıkoglu, N. Göksel & F. Petrak 1952. Türkite'nin parazit mantarları üzerinde incelemeler (Schizomycetes, Oomycetes, Ascomycetes 2). *İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi Mecmuası*, 17: 145 -160.
- Callan N.W., D.E. Mathre, J.B. Miller & C.S. Vavrina 1997. Biological seed treatments: Factors involved in efficacy. *Horticulture Science*, 32: 179 -183.
- Çınar Ö. 1980. Bakteriyel Domates Solğunluğu Hastalığı (*Corynebacterium michiganense* E.F.S Jens.)'nin Tanımı, Mücadele Yöntemleri ve Etmene Karşı Dayanıklı Çeşitler Üzerine Araştırmalar. Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Yayınları, No: 31, 36 s.
- Cook R. J. & K.F. Baker 1983. The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens. APS, St Paul, Minn., 539 pp.
- Cuppels D.A. & J. Elmhirst 1999. Disease development and changes in the natural *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* populations on field tomato plants, *Plant Disease*, 83: 759-764.
- Dimitra J.D., N. Basin & M.G. Polissiou 2002. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium sp.* and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*., *Crop Protection*, 39-44.
- El-Abyad M.S., M.A. El-Sayed, A.R. El-Shanshoury & Sabha M. El-Sabbagh 1992. Towards the biological control of fungal and bacterial diseases of tomato using antagonistic *Streptomyces* spp. *Plant and Soil*, 149: 185-195.
- Fatmi M. & N.W. Schaad 1988. Semiselective agar medium for isolation of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* from tomato seeds. *Phytopathology*, 78: 121-126.
- Geels F.P. & B. Schippers 1983. Reduction of yield depressions in high frequency potato cropping soil after seed tuber treatments with antagonistic fluorescent *Pseudomonas* spp. *Phytopathology*, 108-207.
- Hayward A.C. & J.M. Waterson 1964. CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria, No: 19.
- Jetiyanon K. & J.W. Kloepper 2002. Mixtures of plant growth - promoting rhizobacteria for induction of systemic resistance against multiple diseases, *Biological Control*, 24: 258-291.
- Kahveci E. & A. Gürcan 1993. Antalya ilindeki domates bakteriyel hastalık etmenlerinin tespiti. *Bitki Koruma Bülteni*, 33 (3 -4): 147-151.
- Karaca İ. & H. Saygılı 1977. Domateslerde Bakteriyel Hastalıklar. İzmir Bölge Zirai Mücadele ve Karantina Başkanlığı, Yayın No: 1, İzmir, 22 s.
- Karahan O. 1965. Muhtelif Sebzelerde Zararlı Hastalık Amilleri ve Mücadeleleri. T.C. Tarım Bakanlığı, Ankara Zirai Mücadele Enstitüsü Müdürlüğü Sayı: 42, Ankara, 52 s.
- King E.O., M.K. Ward & D.E. Raney 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 44: 301-307.
- Öktem Y.E . 1985. Domates bakteriyel solgunluğu (*Corynebacterium michiganense*)' nun Ankara İlindeki yayılışı, etmeninin toprak ve bitkiden izolasyonu ile bitki artıklarında yaşama süresi üzerine çalışmalar. Türkiye' de Sertifikalı ve Kontrollü Tohumluk Üretim ve Dağıtım Sorunları Simpozyumu, 8 -10 Şubat 1985, İzmir, 682 s.

- Özakın H. & T. Bora 1991. Domates bakteriyel solgunluğu (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis et al.) ile m¼cadele olanakları ¼zerinde Araştırmalar (Doktora Tezi). 99 s.
- Shoemaker P.B. & F. Echandi 1976. Seed and plant bed treatment for bacterial canker of tomato. *Plant Disease*, 60: 163 -166.
- Slusarski C. 2004. Evaluation of chemical and biological control methods for their potential to reduce bacterial cancer of tomato in a greenhouse stonewool cultivation system. International Society for Horticulture Science.
- Thyr B.D., E. Webb, C.A. Jaworski & T.J. Rateliffe 1973, Tomato bacterial canker: control by seed treatment. *Plant Disease*, 57: 974-977.
- ¼lukuř İ. 1982. Elazığ, Diyarbakır ve Mardin İllerinde domates ve biberlerde bakteriyel hastalıkların surveyi, belirtileri, etmenlerin tanısı ve en ¼nemlisine karşı korunma ¼areleri ¼zerine araştırmalar (Doktora tezi).
- Umesha S. 2001. Occurence of bacterial canker in tomato fields of Karnataka and effect of biological seed treatment on disease incidence. *Crop Protection*, 375-381.
- Utkhede R. & C. Koch 2004. Biological treatments to control bacterial canker of greenhouse tomatoes. *Biocontrol*, 49: 305-313.