

Domates fideliklerinde çökerten hastalığına neden olan *Pythium deliense*' ye karşı florasan pseudomonasların etkisinin belirlenmesi¹

Ayşe AŞKIN²

Y. Zekai KATIRCIOĞLU³

SUMMARY

The effect of fluorescent Pseudomonads on damping-off of tomato seedlings caused by *Pythium deliense*

Damping-off is a common disease causing seedling losses. Although fungicides have shown promising results in controlling the damping-off disease, phytotoxicity and fungicide residues are major problems leading to environmental pollution and human health hazards. In this research, biological control studies of damping-off of tomato caused by *Pythium deliense* were conducted by using fluorescent pseudomonads. Tomato seeds were coated with seventy isolates of fluorescent Pseudomonads isolated from tomato rhizosphere and were evaluated for their ability to control tomato damping-off caused by *P. deliense* in greenhouse conditions. Four isolates were found to be effective in reducing the damping-off incidence in tomato and showed above 50% efficacies in controlling damping-off. In addition, the most effectively isolate was found as 11fp (61,02%). Isomaltes named 44fp (%59,12), 10fp (%53,17) and 47fp (%51,45) followed 11fp isolate. The manner of mechanism of antagonistic effect was further tested *in vitro* conditions.

Key words: Fluorescens Pseudomonads, *Pythium deliense*, damping-off, biological control

ÖZET

Çökerten hastalığı fide kayıplarına yol açan yaygın bir hastalıktır. Fungisitler bu hastalığın mücadelesinde ümit verici olmalarına karşın, fitotoksite, çevre kirliliği ve insan sağlığına zararlı etkilerinden dolayı problem oluşturmaktadır. Bu araştırmada, domateste çökertene sebep olan *Pythium deliense*' ye karşı florasan Pseudomonas izolatları kullanılarak biyolojik mücadele

¹ Bu çalışma "Ankara İli Ayaş, Beypazarı Ve Nallıhan İlçelerindeki Domates Fideliklerinde Çökerten Hastalığına Neden Olan Bazı Fungal Patojenlere Karşı Patojen Olmayan Pseudomonasların Etkisinin Belirlenmesi" adlı doktora çalışmasının bir bölümüdür.

² Ziraî Mücadele Merkez Araştırma Enstitüsü, 06172 Yenimahalle, Ankara

³ Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü

Yazının Yayın Kuruluna Geliş Tarihi (Received): 15.02.2010

çalışmaları yürütülmüştür. Domates bitkisinin rizosferinden izole edilen 70 adet florasan pseudomonas izolatu tohumlara uygulanarak, *P. deliense*' ye karşı antagonist etkileri sera koşullarında araştırılmıştır. Dört izolat domateste çökerten şiddetini azaltarak etkili olmuş ve hastalığa karşı %50' nin üzerinde koruma sağlamıştır. En yüksek etkiyi 11fp izolatu (%61,02) göstermiştir. Bunu 44fp (%59,12), 10fp (%53,17) ve 47fp (%51,45) izolatları takip etmiştir. İzolatların etki mekanizmalarına yönelik çalışmalar in vitro koşullarda yürütülmüştür.

Anahtar kelimeler: Florasan Pseudomonas, *Pythium deliense*, çökerten, biyolojik mücadele

GİRİŞ

Domates, ülkemizin hemen her bölgesinde yetişen, son yıllarda da üretimi özellikle sera şartlarında kesintisiz yaz-kış devam eden bir sebzedir. Ülkemizde, 10.985.355 ton üretim miktarı ile kültürü en fazla yapılan sebze durumundadır (Anonim 2008). Yurtiçinde en çok tüketilen sebzelerin başında gelen domates, ihraç ettiğimiz taze sebzeler arasında da ilk kalemi oluşturmaktadır. Domateste çökerten hastalığı fidelerde önemli kayıplara yol açmaktadır. *Pythium* spp., *Phytophthora* spp., *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* spp., *Sclerotinia* spp. ve *Alternaria* spp. gibi fungal patojenler domatesi de içeren birçok sebze fidesinde zarar oluşturmaktadır. Fideler çıkış öncesi ve çıkış sonrası dönemde bu patojen saldırılarına karşı oldukça hassastırlar. Fide eğer çıkıştan önce etkilenirse zayıf bir çimlenme görülmekte çıkıştan sonra ise fideler devrilerek ölmekte ve bu durum çökerten olarak adlandırılmaktadır. Çökerten zararı sonucunda fidelikte ocaklar halinde boşluklar meydana gelmektedir. Fidelik koşulları uygun olduğunda hastalık, fidelerin tamamen tahrip olmasına neden olabilir. Domates fidelerinde çökertene neden olan en önemli fungal etmenler *Pythium* spp. ve *Rhizoctonia solani*' dir (Walker 1952, Karahan 1965).

Hastalıkla mücadelede fungusitler yaygın olarak kullanılmaktadır. Fakat fungusitler çökerten hastalıklarının kontrolünde ümit verici olmalarına karşın, fitotoksite, fungal kalıntılar, çevre kirliliği ve insan sağlığına zararlı etkileri nedeniyle problem oluşturmaktadırlar (Ramamoorthy et al. 2002). Hastalığa sebep olan etmenlerden *Pythium* spp. 'nin fungusitlere karşı dayanıklılık geliştirmesi hastalık kontrolünde fungusit kullanımını sınırlamaktadır (Whipps and Lumsden 1991). Bu hastalığa karşı kullanılan fungusitler hastalığı oluşturan etmenlerin hepsine karşı etkili olamayabilmektedirler. Toprak sterilizasyonu sıcak iklim koşulları altında başarılı olmasına karşın serin iklim koşulları için pratik olmamaktadır (Katan 1987). Hastalıkla mücadelede hızlı bir tohum çimlenmesi ve fide gelişiminin olması ve bitkide bağışıklığın kazandırılması ile ileri dönem hastalıklarına karşı da koruma sağlanması yönünden önemlidir.

Florasan Pseudomonaslar antagonist mikroorganizma potansiyeline sahiptirler ve toprak kökenli patojenlere karşı antagonist etki göstermektedirler.

Biyolojik savaş içinde 1980'lerden sonra bitki gelişimine olumlu etkileri, hızlı gelişmeleri ve güçlü antagonist etkileriyle ön plana çıkan etmen grubu olarak florasan Pseudomonaslar önemli bir yere sahiptir (Bora ve Özaktan 1998). Bu bakteriler bitkilere bağışıklık kazandırarak ileri dönem hastalıklardan bitkileri koruyabilirler.

Günümüzde, gerek biyolojik mücadele etmeni gerekse bitki gelişimini teşvik edici bakteriler olarak büyük ilgi gören florasan Pseudomonaslar ile birçok biyolojik mücadele çalışmaları yürütülmektedir. Bu çalışmalar sonucunda bu bakterilerin çeşitli hastalıklara karşı üretilmiş biopreparatları bulunmaktadır (Mcspadden Gardener and Fravel 2002, Maurhofer et al. 1992, Gulati et al. 1999, Landa et al. 2002, Buysens et al. 1996, Bora ve Özaktan 1998).

Bu çalışmada Ankara ili domates fideliklerinde çökerten hastalığına neden olan önemli fungal patojenlerden *Pythium deliense*'ye karşı florasan Pseudomonaslar kullanılarak biyolojik mücadele çalışmaları yapılmıştır.

MATERYAL VE METOT

Çalışma 2003 yılında Ankara Zirai Mücadele Merkez Araştırma Enstitüsü'ne ait iklim odalarında Joker (yer domatesi) çeşiti test bitkisi ve florasan Pseudomonas izolatları kullanılarak yürütülmüştür. Saksı denemelerinde kullanılan fide harcı 1:1:1 oranında bahçe toprağı, dere kumu, yanmış ahır gübresi karışımı şeklinde hazırlanarak toprak sterilizatöründe 121°C' de 75 dak. iki gün ard arda steril hale getirilmiştir.

Fungal inokulum hazırlamak amacıyla mısır unu kum ortamı kullanılmıştır. Bu amaçla %3 mısır unu %97 kum karışımına 20 kısım su ilave edilerek hazırlanan ortam cam şişelere doldurmuş ve fide harcında olduğu gibi steril edilmiştir.

Bu çalışmada kullanılan florasan Pseudomonas izolatlarını elde etmek üzere Ankara ili; Ayaş, Beypazarı ve Nallıhan ilçelerindeki fidelik ve tarla dönemindeki 75 adet sağlıklı domates bitkisi kökünden örnekler alınarak laboratuara getirilmiştir.

Sağlıklı bitki örneklerinin kökleri çeşme suyu ile yıkanarak bistürü ile yüzeysel parçalar alınmış ve 100 ml steril saf su içinde 2 g örnek olacak şekilde erlenlere konulmuştur. Erlenler 30 dakika süreyle 140 rpm' de çalkalanmıştır. Daha sonra bu süspansiyonlardan 10^{-1} den 10^{-4} e kadar seyreltme serileri hazırlanmıştır. Son iki seyreltme serisinden 0,1 ml alınarak King B (King et al. 1954) besi yerine bagetle ekim yapılmıştır. İnkübatörde 48 saat içinde 24°C' de gelişen koloniler yakın NUV (366 nm) ışık altında incelenmiştir. Florasan renk veren koloniler KB' de geliştirilerek +4°C' de KB, %15 gliserin eklenmiş Nutrient Agar (Nutrient Agar, NA) ortamında +4°C' ve -20°C' de, saf suda yoğun süspansiyon halinde +4 °C' de ve Nutrient broth yeast extract (NBY)' de %30 luk gliserin altında -85°C' saklanmıştır (Geels and Schippers 1983, Kloepper et al. 1988, Schaad et al. 2001).

Tütünde Aşırı Duyarlılık Testi

Etkinlik denemeleri öncesi antagonist adayı *Pseudomonas* izolatlarının patojen olup olmadıklarını ortaya koyabilmek amacıyla tütünde duyarlılık testi çalışmaları yapılmıştır.

Nutrient Agar (NA)' da geliştirilen 24-48 saatlik 70 adet bakteri izolatının steril saf su ile 10^8 hücre/ml' lik konsantrasyonunda süspansiyonları hazırlanmıştır. Daha sonra süspansiyonlar bir hipodermik iğne ile sağlıklı tütün yaprağının damarlarına enjekte edilmiş ve 24-26°C' de 48-96 saat süreyle inkübe edilmiştir (Klement et al. 1990).

Florasan *Pseudomonas* İzolatlarının Saksı Koşullarında Çökerten Etmeni Patojenlere Karşı Etkileri

Deneme öncesinde domates tohumlarının çimlenme oranları (%), ISTA kurallarına göre belirlenmiştir. İçine steril kurutma kağıtları yerleştirilip nemlendirilen 4 adet petri kabına 100'er adet Joker domates çeşidi tohumu yerleştirilmiştir. Petriler 20- 30°C' de muhafaza edilmiş ve 5. ve 14. günlerde sayımlar yapılmıştır.

Domates tohumları 3 dk %1 lik NaOCl ile yüzeysel dezenfeksiyon yapılmış ve üç kez steril destile su ile yıkanarak kurutulmuştur. Mc Farland skalasına göre (Barret 1975) yoğunluğu 1×10^8 cfu/ml' ye ayarlanan antagonist bakteri izolatları 1 g tohuma 10 ml gelecek şekilde hazırlanmış ve bu süspansiyonda tohumlar bir gece süreyle bekletilmiştir. Bakterilerin yapışmasını önlemek ve homojen dağılımını sağlamak için süspansiyona 1-2 damla Tween 80 ilave edilmiştir (Ramamoorthy et al 2002).

Saksı denemelerinde 6 numaralı saksılar kullanılmış ve daha önce patojenlerin inokule edildiği bu saksılara 7-10 günlük gelişme periyodundan sonra 25'er adet bakteri ile kaplanmış domates tohumu ekilmiştir. Bitkiler 24 ± 2 °C sıcaklık ve %75-80 nem, 14 saat aydınlık 10 saat karanlık periyot koşullarında yetiştirilmişlerdir. Deneme tesadüf parselleri deneme desenine göre 4 tekrarlı olarak düzenlenmiştir. Bitkiler düzenli olarak sulanmıştır. Otuz günün sonunda bitkiler sökülerek kök ve kök boğazları incelenmiş ve hastalık şiddeti 0-4 skalasına göre değerlendirilmiştir (Chandler and Santelman 1968) (Çizelge 1).

ÇİZELGE 1. Denemelerin değerlendirilmesinde kullanılan 0-4 hastalık şiddeti skalası

Skala değeri	Açıklama
0	Fidede herhangi bir zararlanma yok
1	Fidenin toprak yüzeyi ile birleştiği yerde renk açılması ve küçük lezyonlar
2	Daha büyük lezyonlar gövdeyi çevirmiş durumda
3	Gövdeyi çevreleyen büyük lezyonlar, sonuçta konkav bir görünüm
4	Organizma zararı sonucu ölü bitki

Bitki yetiştirme odasının kapasitesi doğrultusunda patojen olmayan bakterilerin *P. deliense*' ye karşı etkinlikleri, yürütülen üç ayrı deneme ile

belirlenmiş, üç deneme sonunda etkili olduğu belirlenen izolatlar ile dördüncü bir deneme daha yapılmıştır.

Deneme sonunda çimlenmeyen tohumlar, ya da hastalıklı fidelerin kök parçaları fungus cinsine göre seçici ortamlara konularak izole edilen fungusların inokulasyonda kullanılan funguslar olup olmadıkları kontrol edilmiştir.

Saksı denemelerinde elde edilen veriler varyans analizine tabi tutulmuş ve Duncan testi ile izolatların etkileri karşılaştırılmıştır. Analizden önce %hastalık şiddetine aç transformasyonu uygulanmıştır.

Antagonist Adayı Bakteri İzolatlarının Etki Mekanizmalarının Tespiti

Saksı denemeleri sonunda etkili olduğu belirlenen florasan *Pseudomonas* izolatlarının *in vitro* da test funguslarını engelleyiciliğinin antibiyozis ya da besin yarışması temeline dayalı olup olmadığını tespit etmek amacıyla King B ve demir ($FeCl_3$) eklenmiş King B ortamında denemeler yürütülmüştür.

Antibiyozis Testi

Antagonist etkisi denenecek bakteriler King B besiyeri içeren 9 cm çaplı petrilere yarıçaplarının tam ortasına gelmek üzere üç ayrı noktaya 5µl inokule edilmiştir. Aynı anda PDA besiyerinde geliştirilen 4 günlük test funguslarından 2mm çaplı diskler alınarak petrilere tam ortasına yerleştirilmiştir. Bu petrilere 48 saat ile 24°C de inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon süresinin sonunda petrilere Çizelge 2' deki 0-5 skalasına göre değerlendirilmiştir. Değerlendirme sonunda inhibisyon zonu oluşturan izolatlar siderofor testine tabi tutulmuştur (Geels and Schippers 1983).

ÇİZELGE 2. Patojen olmayan bakterilerin etki mekanizmasının *in vitro* da tespiti amacıyla kullanılan skala (Geels and Schippers 1983)

Skala Değeri	Açıklama
0	Engellenme yok,
1	$X^* \leq 2mm$, engelleme bölgesi 2 mm den küçük veya eşit
2	$2mm < x < y^*$, engelleme bölgesi 2 mm den ve patojenin gelişme bölgesinden büyük
3	$2mm < x > y$, patojenin gelişme bölgesi 2 mm' den küçük veya eşit
4	$y \leq 2mm$, patojende hiç gelişme yok
5	$y = 0$.

*X: Test organizmanın engellenme bölgesi genişliği, *Y: Patojenin gelişme bölgesidir

Siderofor Etkinin Saptanması

Elde edilen bakteri izolatlarının *P. deliense* kolonilerini engelleyici etkisinin siderofor kökenli olup olmadığını araştırmak için bu test uygulanmıştır. Bu amaç ile 80µl $FeCl_3$ içeren King-B besi ortamı hazırlanmıştır. 48 saat süre ile King B besi ortamında geliştirilmiş florasan *Pseudomonas* izolatları, daha önceki testlerde olduğu gibi 9cm çaplı King B içeren petri kaplarına, üç ayrı noktaya 5µl

inokule edilmiştir. Aynı anda PDA besiyerinde geliştirilen 4 günlük test funguslarından 2mm çaplı diskler alınarak petrilerin tam ortasına yerleştirilmiştir. Bu petriler 48 saat süre ile 24°C de inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon süresinin sonunda Petri kapları 0-5 skalasına göre değerlendirilmiştir. Değerlendirme sonunda inhibisyon zonu oluşturmayan izolatların etkisinin siderefor kökenli olduğu ve bu patojenlerle arasında demir rekabetine dayalı bir ilişki olup olmadığı tespit edilmiştir (Geels and Schippers 1983).

SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Florasan *Pseudomonas* izolatlarını elde etmek amacıyla bitki örneği alınırken hastalık çıkışı görülen fideliklerdeki sağlıklı fideler ve tarla dönemindeki tamamen sağlıklı, gelişimi iyi domates bitkileri tercih edilmiştir. Çünkü bu tip bitkilerin kök bölgelerinde antagonist etkiye sahip bakterilerin bulunma olasılığı fazla olmaktadır (Bora ve Özaktan 1998). Örneklemin aynı bitkinin yetiştirildiği farklı ekolojik koşullardaki bitkilerden yapılması önemlidir. Böylece antagonist popülasyonu hem çeşitlilik hem de yoğunluk kazanacaktır (Bora ve Özaktan, 1998). Bu amaçla sağlıklı bitki örnekleri Ayaş ve Beypazarı ilçeleri yanında daha farklı ekolojik koşullara sahip olması nedeniyle Nallıhan ilçesinden de alınmıştır. Toplanan bitki örneklerinden 70 adet florasan *Pseudomonas* izolatı King B besiyeri ortamında 366 nm dalga boyunda floresan ışığa vermelerine göre seçilmişlerdir (Geels and Schippers 1983).

Denemeler öncesi florasan *Pseudomonas* izolatlarının patojen olup olmadıklarını belirlemek amacıyla yürütülen tütünde aşırı duyarlılık testi sonucunda izolatların tümünün patojen olmadığı belirlenmiştir.

Denemelerde kullanılacak domates tohumlarının çimlenme yüzdelerini belirlemek üzere yapılan değerlendirmelerde 14. gün sonunda yapılan sayımlarda tohumların hepsinin çimlendiği tespit edilmiştir.

Florasan *Pseudomonas*ların *P. deliense'* ye karşı etkinliğini araştırmak amacıyla yürütülen ilk deneme sonuçları Çizelge 3' de verilmiştir. Yapılan varyans analizi sonucunda bakteri izolatlarının etkileri arasında fark olduğu saptanmıştır (F:4.80, P:0.000). Bu bakteri izolatlarından 6 tanesi kontroldeki hastalık şiddetiyle kıyaslandığında, etkili bulunmuştur. Diğer izolatlar ise etkisiz olmuştur. *P. deliense'* nin neden olduğu çökerteni engellemede en yüksek etkiyi %83,40 ile 59 nolu izolat göstermiştir. Bunu sırasıyla 61 (%70,85), 47 (%59,29), 49(%58,37), 10 (%43,45) ve 23 (%43,13) nolu izolatlar izlemiştir.

ÇİZELGE 3. Antagonist adayı floresan *Pseudomonas* izolatlarıyla tohum bakterizasyonu uygulamasının domates fidelerinde çökerten etmeni *Pythium deliense*' ye etkisi*

	İzolot no	Hastalık şiddeti**	% Etki		İzolot no	Hastalık şiddeti	% Etki
1	7	60.44±8.84 fghı	18.69	13	42	47.45±12.75 cdefg	36.12
2	9	80.87±5.29 hı	-	14	43	69.94±1.86 fghı	5.91
3	10	42.03±5.58 cdef	43.45	15	47	30.26±9.05 bcd	59.29
4	12	56.54±10.18 defgh	23.93	16	48	62.26±7.78 fghı	16.24
5	15	63.35±7.32 fghı	14.77	17	49	30.94±3.37 bcde	58.37
6	23	42.27±7.99 cdef	43.13	18	56	64.29±10.88 fghı	13.51
7	34	58.21±9.54 efghı	21.69	19	57	80.17±7.60 hı	-
8	35	61.62±8.93 fghı	17.10	20	59	12.34±4.33 b	83.40
9	36	59.93±13.36 fghı	19.37	21	60	68.57±6.88 fghı	7.75
10	38	68.23±14.70 fghı	8.21	22	61	21.67±4.94 bc	70.85
11	40	85.38±1.56 ı	-	23	62	47.71±10.53 cdefg	35.81
12	41	67.78±2.53 fghı	8.81	24	63	53.00±9.10 defgh	28.70
(-) Kontrol		0.00 a****	-	(-) Kontrol		0.00 a****	-
(+) Kont.**		74.33±6.04 ghı	-	(+) Kont.		74.33±6.04 ghı	-

* Domates tohumlarına antagonist bakteriler inokule edildi. ** Hastalık ölçümü, 0-4 skalasıyla yapıldı. *** Yalnızca *P. deliense* ile inokule edildi. **** DUNCAN testine göre aynı harfi taşıyan karakterler % 95 olasılıkla farksızdır

P. deliense' ye karşı 22 adet bakteri izolotu kullanılarak yürütülen ikinci deneme sonuçları Çizelge 4'de görülmektedir. Bu deneme sonunda yapılan varyans analizine göre bakteri izolatları arasında *P. deliense*' nin neden olduğu çökerten oluşumunu engellemede farklılık olduğu belirlenmiştir (F: 6.279, P: 0.000). Sekiz adet bakteri izolotu, kontroldeki hastalık şiddetiyle kıyaslandığında etkili bulunmuştur. Diğer izolatların oluşturduğu etki önemli olmamıştır. En yüksek etkiyi gösteren izolot %35,11 ile 44 nolu izolot olmuştur. Bu izolotu sırasıyla 30 (%30,15), 51 (%24,66), 17 (%25,53), 52 (%21,93), 55 (%19,07), 53 (%17,96) ve 4(%14,32) nolu izolatlar izlemiştir.

ÇİZELGE 4. Antagonist adayı floresan *Pseudomonas* izolatlarıyla tohum bakterizasyonu uygulamasının domates fidelerinde çökerten etmeni *Pythium deliense*' ye etkisi*

	İzolot no	Hastalık şiddeti**	% Etki		İzolot no	Hastalık şiddeti	% Etki
1	1	72.02±1.08 ghı	3.26	12	26	71.49±2.27 ghı	3.98
2	4	63.79±3.75 defgh	14.32	13	30	52.00±4.32 bc	30.15
3	8	76.11±2.08 ii	-	14	31	73.77±2.26 hii	0.91
4	14	72.62±3.07 hii	2.46	15	33	71.25±2.29 ghıi	4.30
5	16	72.98±4.31 hii	1.97	16	44	48.31±4.52 b	35.11
6	17	56.93±2.67 bcd	23.53	17	50	66.74±1.64 defghıi	10.36
7	18	65.67±3.94 defghı	11.79	18	51	56.09±2.64 bcd	24.66
8	19	76.89±2.16 i	-	19	52	58.12±5.27 bcde	21.93
9	20	70.87±2.95 ghıi	4.81	20	53	61.18±1.72 cdefg	17.96
10	21	68.15±2.85 efghıi	7.12	21	54	68.99±3.18 fghıi	7.33
11	25	71.48±2.34 ghıi	3.99	22	55	60.25±2.99 cdef	19.07
(-)Kontrol		0.00 a****	-	(-)Kontrol		0.00 a	-
(+)Kont.**		74.45±4.93ii	-	(+)Kont.		74.45±4.93ii	-

* Domates tohumlarına antagonist bakteriler inokule edildi. ** Hastalık ölçümü, 0-4 skalasıyla yapıldı. *** Yalnızca *P. deliense* ile inokule edildi. **** DUNCAN testine göre aynı harfi taşıyan karakterler %95 olasılıkla farksızdır

P. deliense' ye karşı geriye kalan 24 adet bakteri izolatu ile yürütülen üçüncü deneme sonuçları ise Çizelge 5' de özetlenmiştir. Yapılan varyans analizi sonucunda, *P. deliense*' nin neden olduğu çökerten engellemede bakteri izolatları arasında farklılık olduğu tespit edilmiştir (F: 2.127, P: 0.007). Bakteri izolatlarından 11 tanesi, kontroldeki hastalık şiddetiyle kıyaslandığında etkili bulunmuştur. Diğer izolatların oluşturduğu etki önemli olmamıştır. Hastalığı engellemede en yüksek etkiyi %40,56 ile 11 nolu izolat ve %40,20 ile 32 nolu izolat göstermiştir. Bunu sırasıyla 58 (%33,05), 5 (%32,23), 39 (%32,09), 2 (%30,29), 13 (%27,98), 70 (%27,60), 66 (%27,17), 3 (%25,49) ve 67 (%25,29) nolu izolatlar izlemiştir.

ÇİZELGE 5. Antagonist adayı floresan *Pseudomonas* izolatlarıyla tohum bakterizasyonu uygulamasının domates fidelerinde çökerten etmeni *Pythium deliense*' ye etkisi*

	İzolat no	Hastalık şiddeti **	% Etki		İzolat no	Hastalık şiddeti	% Etki
1	2	51.87±1.38 bc	30.29	13	37	66.04±2.54 cd	11.25
2	3	55.44±6.54 bc	25.49	14	39	50.53±4.86 bc	32.09
3	5	50.43±7.73 bc	32.23	15	45	66.86±5.32 cd	10.15
4	6	57.90±3.51 bcd	22.19	16	46	66.13±5.15 cd	11.13
5	11	44.23±3.51 b	40.56	17	58	49.82±3.06 bc	33.05
6	13	53.59±5.90 bc	27.98	18	64	59.04±2.73 bcd	20.66
7	22	62.51±5.05 bcd	15.99	19	65	68±5.00 cd	8.61
8	24	61.21±6.93 bcd	17.74	20	66	54.19±6.63 bc	27.17
9	27	65.53±6.47 cd	11.93	21	67	55.59±3.51 bc	25.29
10	28	57.34±4.30 bcd	22.94	22	68	67.36±7.62 cd	9.48
11	29	60.97±5.56 bcd	18.06	23	69	63.79±8.09 cd	14.27
12	32	44.50±4.98 b	40.20	24	70	53.87±4.92 bc	27.60
	(-)Kontrol	0.00 a****	-		(-)Kontrol	0.00a****	-
	(+)Kont.***	74.41±1.83 d	-		(+)Kont.	74.41±1.83d	-

* Domates tohumlarına antagonist bakteriler inokule edildi. ** Hastalık ölçümü, 0-4 skalasıyla yapıldı. *** Yalnızca *P. deliense* ile inokule edildi. **** DUNCAN testine göre aynı harfi taşıyan karakterler %95 olasılıkla farksızdır

P. deliense' ye karşı florasan *Pseudomonas* izolatlarının etkinliklerini belirlemek üzere yürütülen üç deneme sonunda etkili olduğu belirlenen 10 adet bakteri izolatu kullanılarak bir deneme daha yapılmıştır. Bu deneme sonuçları Çizelge 6' da verilmiştir. Yapılan varyans analizi sonucunda çökerten oluşumunu engellemede izolatlar arasında farklılığın olduğu belirlenmiştir (F: 9,605, P: 0.000). İzolatların hepsi kontroldeki hastalık oranına göre etkili bulunmuştur. En yüksek etkiyi 11 (%61.02) ve 44 (%59.12) nolu izolatlar göstermiştir. On (%53.17) ve 47 (%51.45) nolu izolatlar %50' nin üzerinde etki göstermişlerdir. Kırkdokuz, 59 ve 61 nolu bakteri izolatları ilk denemelerde *P. deliense*' ye karşı gösterdikleri korumayı bu denemede devam ettirememişlerdir.

ÇİZELGE 6 Antagonist adayı floresan *Pseudomonas* izolatlarıyla tohum bakterizasyonu uygulamasının domates fidelerinde çökerten etmeni *Pythium deliense*' ye etkisi*

İzolat No	Ortalama Hastalık Oranı (%)**	Antagonistlerin Etkinliği (%)	İlk Denemeler Sonundaki Etkinlik (%)
10	31.55 ±1.73 bcd	53.17	43.45
11	26.26±2.13 b	61.02	40.56
23	36.52±4.38 bcd	45.79	43.13
32	39.60±1.91 cd	41.22	40.20
44	27.54±6.05 bc	59.12	35.11
47	32.71±5.18 bcd	51.45	59.20
49	53.47±3.21 e	20.63	58.37
59	37.06±4.27 bcd	44.99	83.40
61	35.65±2.78 bcd	47.08	70.85
(-) Kontrol	0.00 a****	-	
(+) Kontrol***	67.37±0.63 f	-	

* Domates tohumlarına antagonist bakteriler inokule edildi. ** Hastalık ölçümü, 0-4 skalasıyla yapıldı. ***

Yalnızca *P. deliense* ile inokule edildi. **** DUNCAN testine göre aynı harfi taşıyan karakterler %95 olasılıkla farksızdır

Florasın *Pseudomonas* izolatlarının *Pythium* spp. nin neden olduğu çökerten hastalığına karşı etkili olduğu daha önce yapılan değişik çalışmalar ile tespit edilmiştir. *P. fluorescens* B2915 ırkı, *Rhizoctonia* ve *Pythium*' un neden olduğu çökertenin kontrolünde önemli bir biyolojik mücadele elemanı olduğu ve değişik bitkilerde tohuma uygulanmaları ile bu patojenlere karşı bitkileri koruduğu bildirilmiştir (Ligon et al. 1999). *P. fluorescens*' in CFBP 2392 (A6), domates fidelerini *R. solani*' nin neden olduğu çökertene karşı koruma sağladığı ve bazı deneme koşullarında doğrudan bitki gelişimini arttırdığı, A6 in- vitro da *R. solani*, *P. utimum*, *P. aphanidermatum*, *F. oxysporum* ve *Phytophthora parasitica*' ya karşı antagonist etki gösterdiği bildirilmiştir (Bajsa et al. 2000). Ramamoorthy ve ark. (2002), 20 adet patojen olmayan *Pseudomonas* izolatını domates ve acı biberde zarar yapan çökertenin kontrolü için denemişlerdir. İn- vitro'da yapılan ön elemelerde etkili olan bakteriler *P. fluorescens* ve *P. putida* olarak teşhis edilmiştir. Bu bakteri izolatlarından *P. fluorescens* pf1, *P. aphenidermatum*' un miselyal gelişimini en fazla engellemiş ve domateste ve acı biberde gelişimi teşvik etmiştir. İzolat pf1 sera ve tarla koşullarında tohum kaplaması şeklinde uygulandığında domates ve acı biberdeki çökertenin azaltılmasında etkili olmuştur. Gravel ve ark.(2005), 40 adet patojen olmayan *Pseudomonas* izolatının domateste çökerten etmeni *P. aphenidermatum* ve *P. ultimum*' e karşı antagonist etkilerini kaya yünü üzerinde testlemişlerdir. Araştırma sonunda *Pseudomonas corrugata*' nin 1 ve 3 nolu ırkları, *P. fluorescens* alt grup F ve G2 nin 1, 2, 3, 4 ve 5 nolu ırkları, *P. marginalis*, *P. putida* altgrup B' nin 1 nolu ırkı, *P. syringae*' nin 1 nolu ırkı ve *P. viridiflava*' nin *P. aphanidermatum* ve *P. ultimum*' un domateste çökerten hastalığını önemli düzeyde azalttığını ve bu antagonistler içinde *P. marginalis*' in her iki patojene karşı da en yüksek engellemeyi gösterdiğini tespit etmişlerdir.

P. deliense' ye karşı kurulan deneme sonuçlarına bakıldığında bakteri izolatlarının domates fidelerinde bu hastalığı değişik derecelerde engellediği görülmektedir. Bu patojene karşı yürütülen denemelerde patojen zararı sonucu olarak tohum çıkışının olmadığı ya da fide çıktıktan hemen sonra devrildiği ve gelişimi hızlı olan fidelerin hastalıktan kurtulduğu gözlenmiştir. Bu çalışmanın sonuçlarına paralel olarak Stephens (1993) yaptıkları araştırmada 8 *Pseudomonas* izolatının topraktaki şekerpancari tohumlarını çıkışını artırmada ve agar ortamında *P. ultimum*' u engellemeleri arasında doğrusal bir ilişki olduğunu tespit etmişlerdir. *Pseudomonas* izolatlarının bu etkilerindeki en büyük faktörün *P. ultimum*' u engelleyecek metabolitleri üretmek için tohumdan sızan bileşiklere metabolize olma kabiliyetleri olduğunu bildirmişlerdir.

Bu patojene karşı %50' nin üzerinde koruma sağlayan 3 izolat (11, 44 ve 47 nolu izolatlar) Ayaş- İlica bölgesine ait topraklardan, 10 nolu izolat ise Ayaş-Akkaya bölgesi toprağından izole edilmiştir. Florasan *Pseudomonas*ların hastalıklara baskın topraklarda rol alan önemli biyolojik etmenler olduğu bilinmektedir (Haas and Keel 2003). Her iki patojene karşı etkili olan bakteri izolatlarının aynı bölgeden elde edilmiş olması bu bölge topraklarının çökerten hastalığına baskın topraklar olabileceğini göstermektedir. Sneh ve ark.(1984), *Fusarium solgunluğuna* baskın olduğu daha önce tespit edilen California Salinas vadisinden elde ettikleri 700 bakteri ve *Actinomyces* izolatını hıyar solgunluğuna (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*) karşı denemişlerdir. Bir florasan *Pseudomonas* izolatı toprağına eklendiğinde klamidospore çimlenmesini güçlü bir şekilde engellemiş, çimlenebilen klamidopsorlar ise kısa çim tüpleri meydana getirmişlerdir. Bu çalışmada florasan *Pseudomonas*lar, *Fusarium solgunluğunu* diğer bakteriyel izolatlardan daha fazla baskı altına almışlardır. Clemente ve ark. (2000), Arjantin' de, Comahue ve Mar del Plata bölgelerine ait rizosfer toprağından izole ettikleri florasan *Pseudomonas*ların *R. solani*' ye karşı domates fidelerini koruma performanslarını incelemişlerdir. Comahue bölgesine ait izolatlar diğer bölgeye göre önemli düzeyde koruma sağlamışlardır. Bakteri izolatlarının coğrafik kökeni onların *R. solani*' ye karşı domates köklerini koruma performanslarını etkilemiştir.

P. deliense' ye karşı florasan *Pseudomonas*lar ile yürütülen etkinlik denemeleri sonucunda patojene karşı etkili olan izolatların etki mekanizmalarını tespit etmek amacıyla KB ortamında ve demir ilave (Fe^{+3}) edilmiş KB ortamında yürütülen deneme sonuçları Çizelge 7'de verilmiştir. Çizelgeye göre in vitroda 10 nolu bakteri izolatı 1,7 mm engelleme zonu oluşturarak 1 nolu skala değerini, 32, 47 ve 59 nolu izolatlar ise sırasıyla 8;83, 7;83, 8 mm hale zonu oluşturarak 3 nolu skala değerini almışlardır. 10 nolu izolat demir ilaveli King B ortamında 1,43 mm engelleme zonu oluşturmuştur. Bu izolatın oluşturduğu etkinin hem siderefor hem de antibiyosis etkiye dayandığı düşünülmektedir. 32, 47 ve 49 nolu izolatların demir ilaveli King B besiyerinde herhangi bir engelleme bölgesi oluşturmadığı görülmüştür. Bu da in vitro'da oluşan antagonistik etkinin siderefor etkiye dayandığını göstermektedir.

ÇİZELGE 7. King B besiyerinde testlenen florasan *Pseudomonas* izolatlarının *P. deliense*'ye karşı *in-vitro* da göstermiş oldukları etki

İzolat No	Ortalama engelleme, X değeri (mm)*	Skala değeri	Demir ilaveli KingB ortamında oluşan ortalama engelleme, X değeri (mm)
10	1.7	1	1.43
11	-	-	
23	-	-	
32	8.83	3	-
44	-	-	
47	7.83	3	-
49	-	-	
59	8	3	-
61	-	-	

* Petrinin üç farklı bölgesinde oluşan hale zonu ortalamaları alınmıştır.

Bu çalışma bulgularına paralel olarak Paulitz ve Loper (1991), yaptıkları araştırmada *Pseudomonas putida*'nın siderefor üreten bir ırkını hıyarda çökertene neden olan *Pythium ultimum*'a karşı *in-vivo* koşullarda etkili bulurken *in vitro* koşullarda KB agar üzerinde patojenin hifsel gelişimini engellemediğini tespit etmişlerdir. Sonuçta bu ırk tarafından pyoverdin sidereforunun üretiminin hıyarda çökertenin engellenmesinden sorumlu olmadığı görülmüştür. Bir başka çalışmada ise dört *Pseudomonas* ırkının hıyarda *Pythium aphanidermatum* zararına karşı koruma kabiliyetleri araştırılmıştır. Bu ırklardan BTP1 ve siderefordan noksan mutantı M3 kontrol bitkisiyle kıyaslandığında ürün miktarını arttırmıştır. Bu etkide siderefor üretiminin etkin rol oynamadığı görülmüştür. *In vitro*'da değişik ortamlarda BTP1 patojen gelişimini engellememiştir. Bu antibiyosis'in engelleme mekanizmasında rol almadığını göstermiştir. BTP1 veya M3 uygulanan kökler kontrol köklere göre daha fazla antifungal fenollerini içermiştir. Araştırma sonunda *P. aphanidermatum*'a karşı hıyar köklerine inokule edilen *Pseudomona* BTP1 ve M3 tarafından antifungal bileşiklerin uyarıldığı tespit edilmiştir (Ongena et al. 1999).

Bu veriler doğrultusunda domateste çökertene neden olan *P. deliense*'ye karşı koruma sağlamada etkili olan bakteri izolatlarının antibiosis ya da siderefor etki dışında farklı bir etki mekanizmasına sahip olabilecekleri düşünülmektedir. Bu sonuç çökertenin engellenmesinde etkili olan bakteri izolatlarının doğrudan bitki gelişimini teşvik edip, fide gelişimini hızlandırdıklarını düşündürmektedir. Nitekim, bitki gelişimini teşvik eden bakteriler (PGPR), bitkinin hassas olduğu dönemi kısa sürede tamamlamasına ve böylece bitkinin hastalıktan kurtulmasına neden olurlar. PGPR'ın fide çıkış oranını arttırdığı, böylece çıkış öncesi çökerten için hassas zamanın azaldığı bilinmektedir (Kloepper et al.1999).

Bu araştırmanın devamında, ümitvar olan florasan *Pseudomonas* izolatlarının teşhislerinin yapılarak, etkilerini artıracak yöntemlerle beraber doğa koşullarında tek tek ya da kombine halde denemelerinin biyolojik mücadelede başarı şanslarını daha da artıracığı düşünülmektedir.

LİTERATÜR

- Anonim, 2008. Tarımsal Yapı (üretim, fiyat, değer). T.C. Başbakanlık Devlet İst. Enst.(<http://www.tuik.gov.tr>).
- Bajsa, N., L. De La Fuente, L. Quagliotto, P. Lemanceau, and A. Arias, 2000. Antifungal factors produced by *Pseudomonas fluorescens* CFBP 2392 potentially involved in its biocontrol activity. Proceedings of the 5th International PGPR Workshop.
- Barret, T. 1975. Preparation of bacterial vaccine. In Proceeding of the first workshop of phyto bacteriology. R. N. Goodman (ed.). Columbia. University of Missouri, p. 1-6.
- Bora, T. ve H. Özaktan, 1998. Bitki Hastalıklarıyla Biyolojik Savaş. s. 205. Prizma matbaası, İzmir.
- Buysens, S., K., Hougens, J. Poppe, and M. Höfte, 1996. Involvement of pyochelin and pyoverdinin in suppression of *Pythium* induced damping-off of tomato by *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2. Appl. Environ. Microbiol, 62, 865-871.
- Chandler, J.M and P.W. Santelman, 1968. Interaction of four herbicides with *Rhizoctonia solani* on seedling cotton. Weed Science, (16); 453-454.
- Clemente, G., A., Quadrelli, A.Melegari, and A. Escande, 2000. Effect of geographical and rhizosphere or non-rhizosphere origins of fluorescent Pseudomonads on their suitability to protect tomato seedlings cv 'Earlymech' from *Rhizoctonia solani* AG-4 infection. Fifth International PGPR Workshop.
- Organizator, A.P.S., Argentina, F.P. Geels, and B. Schippers, 1983. Selection of Antagonistic Fluorescent *Pseudomonas* spp. and their root colonization and persistence following treatment of seed potatoes. Phytopathology, Z, 108, 193-206.
- Gravel,V., C., Martinez, H. Antoun, and R. J. Twedell, 2005. Antagonist microorganisms with the ability to control *Pythium* damping-off tomato seeds in Rockwool. Biocontrol, 50 (5); 771-786.
- Gulati, M.K., E., Koch, W. Zeller, and H.D. Sister, 1999. Isolation and identification of antifungal metabolites produced by fluorescent *Pseudomonas*, antagonist of redcore disease of strawberry. 12th International Reinhardsbrunn Symposium, Friedrichroda, Thuringia, Germany, pp. 437-444.
- Haas, D and C. Keel, 2003. Regulation of antibiotic production in root colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant diseases. Annual Review of Phytopathology. 41: 1117-1153.
- Karahan, O. 1965. Muhtelif Sebzelerde Zararlı Hastalık Amilleri ve Mücadele T.B.A.Z.M.E. Müdürlüğü Sayı:42.
- Katan, J. 1987. Soil solarization. In: Chet K (ed) Innovative Approaches to Plant Disease Control, pp. 77- 105, John Wiley, Chichester.

- King, E. O., M. K. Ward, and D. E. Raney, 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *Journal of Laboratory Clinical Medicine* 44, 301-307.
- Klement, Z., A., Mavridis, K., Rudolph, A., Vidaver, M.C.M. Perombelon, and L.W. Moore, 1990. Inoculation of Plant Tissues. (Methods in Phytobacteriology). Akademiai Kiado Budapest, pp. 95-124.
- Kloepper, J. W., D. J., Hume, F. M., Scher, C., Singleton, B., Tipping, M., Laliberte, K., Frauley, C., Kutchaw, C., Simonson, R., Liftshits, I. Zaleska, and L. Lee, 1988. Plant growth- promoting rhizobacteria on canola (Rapeseed). *Plant Disease*, 72, 42-46.
- Kloepper, J. W., R., Rodriguez-Ubana, G. W., Zehnder, J. F., Murphy, A. E. Sikora, and C. Fernández, 1999. Plant root-bacterial interactions in biological control of soilborne diseases and potential extension to systemic and foliar disease. *Australasian Plant Pathology*, 28, 21-26.
- Landa, B. B., O. V., Mavrodi, J. M., Raajmakers, B. B., McSpadden Gardener, L. S. Thomashow, and D. M. Weller, 2002. Differential ability of genotypes of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas fluorescens* strains to colonize the roots of peaplants. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 3226-3227.
- Ligon, J. M., D. S., Hill, P. E., Hammer, N. R., Tarkewitz, D., Hafmann, H. J., A Kempf, (ed), Liptey, C. S (ed) Vaurina, and G. E. Welbaum, 1999. Genetic modifications of *Pseudomonas* that enhance biological disease control. *Acta Horticulture*. 504 (18); 53-60.
- Maurhofer, M., C., Keel, U., Scneider, C., Voisard, D. Haas, and G. Defago, 1992. Influence of enhanced antibiotic production in *Pseudomonas fluorescens* strains CHAO on its disease suppressive capacity. *Phytopathology*, 82, 190-195.
- McSpadden Gardener, B. B. and D. R. Fravel, 2002. Biological control of plant pathogens; Research, commercialization and application in the USA. Online. *Plant Health Progress*, <http://www.apsnet.org/online/feature/biocontrol/top.html>. Erişim tarihi. 15.03.2008.
- Ongena, M., F., Daayf, P., Jacques, P., Thonart, N., Benhamou, P. Cornelis, and N. Koedam, 1999. Protection of Cucumber against *Pythium* root rot by fluorescent pseudomonads: predominant role of induced resistance over siderophores and antibiosis. *Plant Pathology*. Vol.48, (1), Page:66-76.
- Paulitz, T. C. and J. E. Loper, 1991. Lack of a role for fluorescent siderophore production in the biological control of *Pythium* damping off of cucumber by a strain of *Pseudomonas putida*. *Phytopathology*. 81(8); 930-935.
- Ramamoorthy, V., T. Raguchander, and R. Samiyappan, 2002. Enhancing resistance of tomato and hot pepper to *Pythium* diseases by seed treatment with fluorescent *Pseudomonas*. *European Journal of Plant Pathology*, 108, 429-441.
- Schaad, N. W., J. B. Jones, and W. Chun, 2001. *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. Microbank Sistem (Pro-Lab Diagnostics, Austin, TX). APS Press. Minnesota-USA.

- Sneh, B., M., Dupler, Y. Elad, and R. Baker, 1984. Chlamyospore germination of *Fusarium oxysporum* f.sp. *cucumerinum* as affected by fluorescent *Pseudomonas* and lytic bacteria from *Fusarium*- suppressive soil. *Phytopathology* 74: 1115-1124.
- Stephens, P. M., J. J. Crowley, and C. O'Connell, 1993. Selection of *Pseudomonads* strains inhibiting *Pythium ultimum* on sugarbeet seeds in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 25, 1283-1288.
- Walker, J. C. 1952. Diseases of vegetable crops. McGraw-Hill Book Company. Inc. New York, 529 pp.
- Whipps, J. M. and D. R. Lumsden, 1991. Biological control of *Pythium* species. *Biocontrol Science and Tecnology*, 1, 75-90.