ÇOMÜ Zir. Fak. Derg. (COMU J. Agric. Fac.)
2015: 3 (1): 63–71

Serada Hıyar Fusarium Solgunluğu (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*)'na Karşı Floresan Pseudomonasların Etkinliğinin Belirlenmesi

Nedim Altın[1*] Tayyar Bora[2]

[1]Düzce Üniversitesi, Ziraat ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Düzce.
[2]Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü Emekli Öğretim Üyesi, İzmir.
[*]Sorumlu Yazar: nedimaltin@duzce.edu.tr

Geliş Tarihi: 13.05.2015 Kabul Tarihi:10.06.2015

Öz

Toprak kaynaklı bir etmen olan *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* hıyar bitkisini tüm gelişme dönemlerinde hastalandırabilmektedir. Çalışmamızda *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*'un önlenmesinde özellikle besin elementi rekabeti ve uyarılmış dayanıklılığa dayanan biyolojik mücadelede hastalığa karşı en iyi entegrasyon yapılmaya çalışılmıştır. 161 adet floresan pseudomonas izolatı *Fusarium oxysporum* f.sp. *cucumerinum*'a karşı aynı anda *in vitro* ve *in vivo* koşullarda antagonistik yetenekleri açısından taranmıştır. Bu denemeler sonucunda seçilen 20 adet floresan pseudomonas izolatının siderefor etki yönünden testlemeleri yapılmıştır. Seçilen 20 adet floresan pseudomonas izolatının *in vitro* etkinlikleri genelde siderofor etkiye dayandığı belirlenmiştir. Bu izolatlar ile *in vivoda* yapılan değerlendirmede ise etkinin %7,69 ile %38,4 arasında değiştiği görülmüştür.
Anahtar Kelimeler: Hıyar, *Fusarium* solgunluğu, Floresan pseudomonas, Biyolojik mücadele.

Abstract

Determination of Fluorescent Pseudomonas Against FusariumWilt of Cucumber (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*) in Greenhouse

Fusarium oxysporum f.sp. *cucumerinum* is a soil–borne pathogen and can invade the host plant in all stages of developmental period. In our study, the biological control methods based on the nutritional competence and induced resistance which inhibits the *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* were studied in order to achieve best integration. Fluorescent pseudomonad isolates (161) were screened for their antagonistic activity at both *in vivo* and *in vitro* conditions simultaneously, against *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum*. At the end of these experiment, 20 of fluorescent pseudomonas isolates, which are chosen, was tested in the terms of siderophore effect. Chosen 20 of fluorescent pseudomonas isolates, it is detected that it's in vitro activity is generally resistant to siderophpre effect. İn the experiments which is done with this isolates, it is seen that in the assessment with in vivo, the effect changes between 7.69% and 38.4%.
Keywords: Cucumber, *Fusarium* wilt, Fluorescent pseudomonad, Biological control.

Giriş

Hıyar (*Cucumis sativus*) bitkisinin anavatanı Hindistan'dır. Batı Asya'da 3.000 yıldır tarımı yapılmaktadır. Hindistan'dan Yunanistan'a ve İtalya'ya yayılmıştır. Türkiye'nin her bölgesinde kabakgillerin ekonomik yetiştiriciliği yapılabilmektedir. Kabakgiller arasında hıyar yetiştiriciliği önemli bir yer tutmaktadır.

Hıyarın en önemli hastalık etmenlerinden biri olan *F. oxysporum* f.sp. *cucumerinum* birçok ülkede yaygın olarak bulunmaktadır. Bu ülkeler arasında Amerika Birleşik Devletleri, İngiltere, Yunanistan, İsrail, Japonya, Çin, Almanya, Avusturalya ve Hollanda sayılabilir (Martyn,1996; Vakalounakis ve Fragkiadakis, 1999). *F. oxysporum* f.sp. *cucumerinum* ilk kez 1925 yılında Florida'da görülmüştür. Ancak ilk olarak 1955 yılında Owen tarafından *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* olarak tanımlanmıştır (Owen, 1955; Martyn, 1996).

Hıyar solgunluğuna karşı etkin ve ekonomik bir kimyasal savaşım yöntemi bulunmamaktadır. Bu hastalığa karşı uygulanan kültürel önlemler ise tek başına yeterli değildir. Bu nedenle , son yıllarda dünyada bu hastalık ile ilgili biyolojik savaş çalışmalarına ağırlık verilmiş ve son derece başarılı sonuçlar elde edilmiştir (Sneh ve ark., 1984; Paulitz ve ark., 1987; Sungseok ve ark., 1996; Singh ve ark., 1999). *F. oxysporum* f. sp. *Cucumerinum'a* karşı yapılan biyolojik savaş çalışmalarında daha çok yarışma ve uyarılmış dayanıklılık mekanizmaları üzerinde durulmuştur.

Elad ve Baker (1985a), 1985 yılında yaptıkları bir çalışmada topraktaki çeşitli *F. oxysporum*'ların klamidospor çimlenmesinin engellenmesinde Floresan pseudomonasların siderofor

üretimiyle ilişkili olduğunu ortaya koymuşlardır. Sideroforlar *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum*'un klamidospor çimlenmesini %70,2 oranında engellemiştir (Elad ve Baker, 1985b). Simeoni ve arkadaşları, Fusarium solgunluğunun biyolojik savaşımında kritik demir seviyesini tespit etmek amacıyla bir çalışma yapmışlardır. Bu çalışmanın sonuçlarına göre *in vitro*'da $10^{-19\%}$–10^{-22} M arasında Fe^{3+} konsantrasyonu bulunan ortamda *Pseudomonas putida* A12'nin ürettiği sideroforlar *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum*'un klamidosporlarının çimlenmesini önlemiştir. Ancak optimum önleme 10^{-22}–10^{-27} M arasında olmuştur (Simeoni ve ark., 1987).

1930'lardan beri patojenlere karşı biyotik ve abiyotik ajanlar aracılığı ile bitkilerin uyarıldığı bilinmektedir. Uyarılmış dayanıklılık olayını ifade etmek amacıyla geçmişten günümüze kadar "systemic acquired resistance, translocated resistance ve plant immunization" gibi çeşitli terimler kullanılmıştır. Günümüzde bitkilerde oluşan uyarılmış dayanıklılık iki kategoride değerlendirilmektedir. Bitkilerde dayanıklılığın uyarılması nekroz oluşturucu patojenler veya patojen olmayan mikroorganizmalar ve fungal hücre duvarı elisitörleri yoluyla oluşturuluyorsa bu tür dayanıklılığa sistemik kazanılmış dayanıklılık (systemic acquired resistance, SAR) denir (Van Loon ve ark., 1998; Pieterse ve ark., 2001; Ramamoarthy ve ark., 2001). Eğer dayanıklılığın uyarılması kök bakterileriyle (rizobakter) olursa, buna sistemik uyarılmış dayanıklılık (Induced systemic resistance, ISR) denir (Ramamoarthy ve ark., 2001; Pieterse ve ark., 2002). Bitki gelişimini uyaran kök bakterileri bitki dayanıklılığını uyarma yeteneğine sahiptirler. Bu grup bakteriler içinde Floresan pseudomonaslar da yer almaktadır. Bitki gelişimini uyaran kök bakterileri bitki patojenlerini baskılamak için çeşitli mekanizmalara sahiptirler. Bu mekanizmalar besin elementi ve yer için yarışma, pirrolnitrin, piyosiyanin, 2,4–diasetil floroglusinol gibi antibiyotiklerin üretimi, demirin sınırlı bulunduğu ortamlarda sınırlı bulunan demiri alabilmek için pseudobaktin gibi siderofor üretimidir. Bunların dışında diğer önemli mekanizmaları ise fungal hücre duvarında bulunan kitin ve glukan'ı yıkan kitinaz ve β-1,3 glukanaz gibi litik enzimlerin üretimidir. Bitki gelişimini uyaran kök bakterileri bu mekanizmalara ilaveten bitkilerde sistemik uyarılmış dayanıklılığa da neden olmaktadırlar. Günümüzde yapılan çalışmalarla bu bakteriler tarafından oluşturulan sistemik uyarılmış dayanıklılık bir çok bitkide bakteriyel, viral ve fungal hastalıklara karşı ortaya konmuştur (Van Wees ve ark., 1997; Ramamoarthy, 2001).

Bu çalışma, serada hıyar üretiminde hastalıklar yönünden önde gelen sorunlardan biri olan *F. oxysporum* f. sp. *Cucumerinum*'un önlenmesinde besin rekabeti ve uyarılmış dayanıklılığa dayanan biyolojik savaş ele alınmıştır.

Materyal ve Yöntem

Test patojeni

Projede test patojeni olarak Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümünde Prof. Dr. Gülay TURHAN'dan temin edilen ve Torbalı bölgesinden alınan hıyar bitkisinden izole edilen *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* izolatı kullanılmıştır.

Floresan pseudomonasların izolasyonu

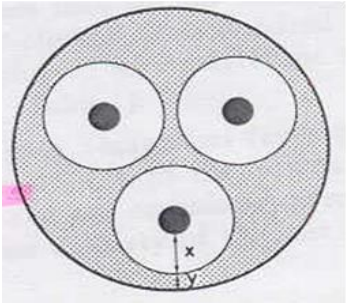
İzolasyonlar İzmir, Balıkesir, Manisa ve Çanakkale illerinden toplanan sağlıklı hıyar, kavun, karpuz ve kabak bitkilerinin köklerinden yapılmıştır. Buz kutusunda laboratuvara getirilen bitkilerin kökleri musluk suyunda yıkanarak topraktan arındırılmıştır. Bu bitkilerin kök yüzeyinden ince kesitler alınmıştır. Kesitler 1 g tartılarak içinde 100 ml 0,05 M fosfat tamponu bulunan erlenlere konmuş ve 30 dakika süreyle 140 rpm'de çalkalanmıştır. Bu süspansiyondan 0,1 ml alınarak içinde 100 ppm siklohekzimid, 50 ppm ampisilin ve 12,5 ppm kloramfenikol bulunan KingB besiyerine ekim yapılmıştır. Petriler 48 saat süre ile 24^{o}C'de bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda 366 nm'lik UV ışık altında floresan koloniler seçilmiştir. Bu floresan koloniler saflaştırıldıktan sonra NGA besiyerinde +4^{o}C'de saklanmıştır (Geels ve Schippers, 1983).

Antagonistik floresan pseudomonasların *in vitro*'da seçimi

İçinde King B besi yeri bulnan 9 cm çaplı petrilerin yarıçaplarının tam ortasında olmak üzere petrinin 3 ayrı yerine Floresan pseudomonaslar ekilmiştir. Bu petriler 24^{o}C'de 24 saat süre ile bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda petrilere 10^{6} spor/ml yoğunluğunda *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum*'un 4 günlük spor süspansiyonu püskürtülmüştür. Bu petriler 48 saat süre ile 24^{o}C'de

bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda petriler oluşan engelleme bölgesi dikkate alınarak Çizelge 1.'de verilen 0–5 skalasına göre değerlendirilmiştir (Geels ve Schippers, 1983).

Çizelge 1. Floresan pseudomonasların seçiminde kullanılan skala (Geels ve Schippers, 1983).

	0: engelleme yok.
	1: X≤2 mm, engelleme bölgesi 2 mm'den küçük veya eşit
	2: 2 mm<X<Y, engelleme bölgesi 2 mm'den büyük ancak patojenin gelişme bölgesinden küçük.
	3: 2 mm<X>Y, engelleme bölgesi 2 mm'den ve patojenin gelişme bölgesinden büyük.
	4: Y≤2 mm, patojenin gelişme bölgesi 2 mm'den küçük veya eşit.
	5: Y=0, patojende hiç gelişme yok.

***In vivo*'da uyarılmış dayanıklılık yönünden ön elemeler**

Patates dekstroz sıvı ortamında 4 gün süre ile geliştirilen *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* kültüründen 10^6 spor/ml yoğunluğunda mikrokonidi spor süspansiyonu hazırlanmıştır. Saksılarda kullanılan ve önceden sterilize edilen topraklar bu süspansiyon ile 10^6 spor/cm^3 toprak oranında karıştırılmıştır (Fuchs ve ark., 1997). Bu topraklar 2 gün süre ile bekletilmiştir. Kökleri temizlenen 2 haftalık Gordion çeşidi hıyar fideleri 10^{11} cfu/ml oranında hazırlanan Floresan pseudomonas süspansiyonunda 30 dakika süre ile bekletilmiştir (Liu ve ark., 1995). Bu sürenin sonunda fideler saksılara dikilmiştir. Dikimden 4 ve 6 hafta sonra olmak üzere iki kez değerlendirme yapılmıştır. Değerlendirmelerde 0–5 skalası kullanılmıştır (Liu ve ark., 1995). 0–5 skalası Çizelge 2.'de verilmiştir. Her izolat için 3 bitki bulunan bir saksı kullanılmıştır. Herbir bitki bir tekerrür olarak değerlendirilmiştir.

Çizelge 2. *In vivo* denemelerinde kullanılan 0–5 skalası (Liu ve ark., 1995)

Skala değeri	Açıklama
0	Belirti yok.
1	Bitkideki solgun yaprak sayısı toplam yaprakların % 25'ten az.
2	Bitkideki solgun yaprak sayısı toplam yaprakların % 26 ile 50'si arasında.
3	Bitkideki solgun yaprak sayısı toplam yaprakların % 51 ile 75'i arasında.
4	Bitkideki solgun yaprak sayısı toplam yaprakların %76 ile 100'ü arasında.
5	Bitki ölü.

Tütün testi

In vitro ve *in vivo* ön eleme deneme sonuçlarına göre *in vivo* denemelerde kullanılmak üzere seçilen 20 adet Floresan pseudomonaslar izolatı ile *in vivo* denemesine alınmadan önce patojen olup olmadıklarını ortaya koyabilmek amacıyla tütün testi yapılmıştır. Bu amaçla King B besiyerinde yetiştirilen 24 saatlik kültürlerden elde edilen Floresan pseudomonas süspansiyonları steril şırınga ile tütün yapraklarına verilmiştir. 48 saat sonra tütün yapraklarında oluşan reaksiyona göre değerlendirme yapılmıştır.

***In vitro* siderefor etki yönünden değerlendirme**

In vivo denemelerde kullanılmak üzere seçilen 20 adet Floresan pseudomonas izolatı *In vitro*'da oluşan engelleme bölgesinin siderofor etkiye dayanıp dayanmadığını ortaya koymak amacıyla yapılan bu denemede kullanılan *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* %2'lik patates dekstroz'da, Floresan pseudomonaslar ise KingB ortamında geliştirilmiştir. İçinde F^{3+}+KingB besiyeri bulunan 9 cm çaplı petrilerin yarı çaplarının tam ortasında olmak üzere petrinin 3 ayrı yerine bakterilerin nokta ekimi yapılmıştır. Bu işlem içinde sadece King B besiyeri bulunan petrilerde de yapılmıştır. Bu petriler 24^{o}C'de 24 saat süre ile bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda petrilere *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum*'un 4 günlük mikrokonidi spor süspansiyonu 10^6 spor/ml yoğunluğunda püskürtülmüştür. Bu petriler 48 saat süre ile 24^{o}C'de inkube edilmiştir. Bu sürenin sonunda petriler, oluşan engelleme bölgesi dikkate alınarak Çizelge 1.'de verilen 0–5 skalasına göre değerlendirilmiştir (Geels ve Schippers, 1983).

***In vivo* deneme**

Bu denemede *in vitro* ve *in vivo* ön eleme denemeleri sonucunda en başarılı 20 adet Floresan pseudomonas izolatı kullanılmıştır. Denemede kullanılmak üzere 1:1:1 oranında organik gübre: kum:toprak karışımı hazırlanmıştır. Bu karışım deneme öncesi formaldehit ile dezenfekte edilmiştir. Toprak *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum*'un mikrokonidi spor süspansiyonu ile 10^6 spor/cm^3 toprak oranında karıştırılmıştır. Hıyar tohumları ise 24 saatlik floresan pseudomonas kültüründen hazırlanan 10^{11} cfu/ml'lik süspansiyonda 30 dakika süre ile bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda tohumlar saksılara ekilmiştir. Ekimden sonra 6. ve 8. haftada olmak üzere iki kez değerlendirme yapılmıştır. Değerlendirmeler Çizelge 2.'de verilen 0–5 skalasına göre yapılmıştır (Liu ve ark., 1995). Denemelerde Gordion hıyar çeşidi kullanılmıştır. Deneme tesadüf parselleri deneme desenine göre 10 tekerrürlü olarak yürütülmüştür. Her tekerrür içerisinde 2 bitki bulunan saksıdan oluşmaktadır.

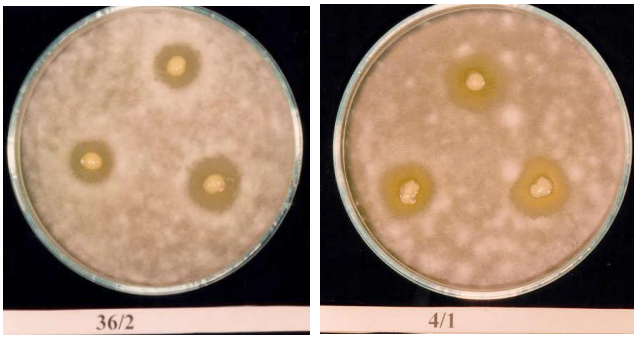
Bulgular

Floresan pseodomonasların izolasyonu

Floresan pseudomonasların izalosyonu amacıyla İzmir, Balıkesir, Manisa ve Çanakkale illerinden toplam 108 adet bitki örneği toplanmıştır. Bu örneklerden toplam 161 adet floresan pseudomonas izolatı elde edilmiştir. İzolasyon çalışmaları sırasında UV ışık altında vermiş oldukları renklere göre değerlendirilerek seçilen Floresan pseudomonaslar genelde yeşil, mavi, mavimsi yeşil ve sarımsı yeşil renkler vermiştir.

Antagonistik floresan pseudomonasların *ın vitro*'da seçimi

In vitro'da yapılan çalışmalara başlamadan önce aynı bitkiden izole edilen ve UV ışık altında vermiş oldukları renkler birbirine benzeyen izolatlar elenmiştir. Bu elemenin sonucunda *in vitro* ve *in vivo* denemelerine alınacak 110 adet Floresan pseudomonas izolatı kalmıştır. Bu 110 adet Floresan pseudomonas ile *in vitro*'da *F.oxysporum* f.sp. *cucumerinum*'a karşı antagonistik etki denemeleri yapılmıştır (Şekil l.).



Şekil 1. Floresan pseudomonas izolatlarının oluşturduğu engelleme bölgeleri.

Denemede 0–5 skalasına göre yapılan değerlendirme sonucuna göre 8 adet izolat skalanın 1. kategorisinde, 102 adet izolat ise skalanın 2. kategorisinde yer almıştır. Skalanın 2. kategorisinde yer alan izolatlar genelde 3–7 mm arasında engelleme bölgesi oluşturmuştur. 2 nolu skala kategorisinde yer alan izolatların ölçüm değerlerinin dağılımı Çizelge 3.'te verilmiştir. Çizelge 3.'te de görüldüğü gibi, 38 adet izolat 5 ile 6 mm ararsında engelleme bölgesi oluşturmuştur. 6 adet izolat (6/1, 90/2, 94/1, 94/2, 96/2, 104/3) ise 6–7 mm arasında engelleme bölgesi oluşturarak 2 nolu skalada yer alan 102 adet izolat arasında en iyi engellemeyi yapmıştır.

Çizelge 3. 2 nolu skala değerinde yer alan izolatların gösterdiği engelleme bölgesi değerleri

İzolat (adet)	Engelleme bölgesinin genişliği (mm)
12	2,1–3,0
22	3,1–4,0
24	4,1–5,0
38	5,1–6,0
6	6,1–7,0

***In vivo*'da uyarılmış dayanıklılık yönünden ön elemeler**

In vivo denemelerine 110 adet Floresan pseudomonas izolatı ile yapılan denemede 15 günlük hıyar fidelerin dikiminden itibaren 4. ve 6. haftada olmak üzere iki defa değerlendirme yapılmıştır. Zaman ilerledikçe aynı bitkide hastalığın giderek düşmesi, bitkide dayanıklılığın uyarılması olarak algılanmıştır. Çünkü 2 gözlem arasındaki zaman diliminde, bitkide yeni çıkan yaprakların solgunluk göstermemesi bunlarda dayanıklılığın uyarıldığı anlamına gelmektedir.

In vitro ve *in vivo* ön eleme denemelerinin sonuçları birlikte değerlendirilmiş ve 20 adet Floresan pseudomonas izolatı bir sonraki denemede kullanılmak üzere seçilmiştir. Seçilen bu Floresan pseudomonaslar Çizelge 4.'te verilmiştir.

Çizelge 4. *In vitro* ve *in vivo* deneme sonuçlarına göre seçilen floresan pseudomonas izolatları

İzolat no	***In vitro*'da ortalama engelleme (mm)**	***In vivo* ön eleme**	
		I. Değerlendirme (4. hafta) ortalama belirtili yaprak oranı (%)	**II. Değerlendirme (6. hafta) ortalama belirtili yaprak oranı (%)**
4/1	3,6	31	23
5/1	5,4	35	29
6/1	6,1	29	28
24/2	5,6	43	27
26/1	3,6	43	30
26/2	3,7	41	26
31/2	5,1	39	31
36/2	5,3	25	22
39/3	6,0	34	26
45/3	5,7	30	30
46/2	1,3	29	24
51/2	5,2	26	32
53/1	5,1	31	29
61/1	5,4	25	26
83/1a	5,1	32	25
87/2	5,3	31	23
88/3	5,0	41	33
94/1	6,3	20	31
96/1	3,1	23	25
108/2	2,4	19	27

Çizelge 4. İncelendiğinde, genelde her iki denemede de en iyi sonucu alan izolatlar bir sonraki test için seçildiği görülmektedir. Ancak bazı izolatlar (26/2, 26/1, 4/1, 46/2, 96/1, 108/2) *in vitro*'da gösterdiği etki yüksek olmamasına rağmen *in vivo* 'daki etkileri yüksek olduğu için seçilmişlerdir. Bu tür izolatlar da uyarılmış dayanıklılık mekanizması olabileceği düşünülmektedir.

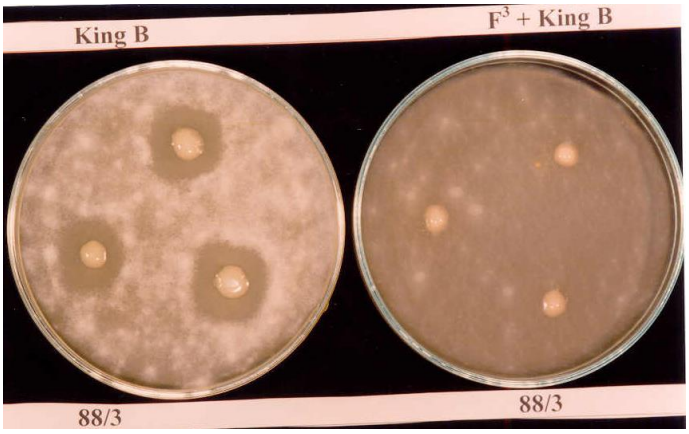
Bazı izolatlarda (31/2, 88/3) *in vivo* 'da 4. haftada yapılan değerlendirmeye göre, 6. haftada yapılan değerlendirmedeki belirtili yaprak oranı en çok azaldığı için seçilmişledir.

Tütün testi

Seçilen 20 adet Floresan pseudomonas izolatı ile *in vivo* testlerine alınmadan önce patojen olup olmadıklarını ortaya koyabilmek amacıyla tütün testi yapılmıştır. Yapılan değerlendirmelere göre bir sonraki deneme için seçilen 20 adet Floresan pseudomonas izolatının tümünün patojen olmadığı tespit edilmiştir.

***In vitro* Siderefor etki yönünden değerlendirme**

Seçilen 20 adet Floresan pseudomonas izolatının *In vitro*'da oluşturmuş olduğu engelleme bölgesinin siderofor etkiye dayanıp dayanmadığını ortaya koymak amacıyla yapılan denemelerde petrilerde oluşan engelleme bölgeleri Şekil 2.'de görülmektedir.



Şekil 4.6. 88/3 nolu floresan pseudomonas izolatının siderofor testi.

Deneme sonuçlarına göre 20 adet Floresan pseudomonas izolatından 18 tanesinde demir ilaveli King B besiyerinde herhangi bir engelleme bölgesi oluşmamıştır. Bu da *in vitro*'da oluşan antagonistik etkinin siderofor etkiye dayandığını göstermektedir. 46/2 ve 96/1 nolu izolatlarda demir ilaveli King B besiyerinde 1 mm'lik gibi küçük bir engelleme bölgesi oluştuğu saptanmıştır. Bu izolatlarda etkinin hem siderofor hem de antibiyotik etkiye dayandığı düşünülmektedir.

***In vivo* denemeler**

Bu denemelerde *in vitro* ve *in vivo* ön eleme testleri sonucunda seçilen en başarılı 20 Floresan pseudomonas izolatı kullanılmıştır. Yapılan tütün testi ve siderofor etki testi sonucunda bu izolatların patojen olmadığı ve *in vitro* etkisinin genelde siderofor etkiye dayandığı tespit edilmiştir. *In vivo'*da 6. ve 8. haftada yapılan değerlendirmelere ait ortalama hastalık şiddeti ve izolatların yüzde etki değerleri Çizelge 5.'te verilmiştir.

Çizelge 5. *In vivo* denemelerinde elde edilen sonuçlara göre hastalık şiddeti ve yüzde etki

İzolat no	Tawsend–Heuberger'e göre hastalık şiddeti %		Abbott'a göre % etki	
	I. Değerlendirme (6. hafta)	II. Değerlendirme (8. hafta)	I. Değerlendirme (6. hafta)	II. Değerlendirme (8. hafta)
4/1	29	33	30,9	36,50
5/1	27	32	35,7	38,40
6/1	25	40	40,4	23,07
24/2	30	34	28,5	34,60
26/1	31	42	26,2	19,23
26/2	29	40	30,9	23,07
31/2	35	48	16,6	7,69
36/2	22	39	47,6	25,00
39/3	22	37	47,6	28,80
45/3	38	44	9,5	15,38
46/2	35	38	16,6	26,90
51/2	33	37	21,4	28,80
53/1	36	45	14,2	13,46
61/1	33	40	21,4	23,07
83/1a	33	43	21,4	17,30
87/2	27	43	35,7	17,30
88/3	32	40	23,8	23,07
94/1	36	38	14,2	26,90
96/1	37	36	11,9	30,80
108/2	22	39	47,6	25,00
Foc	42	52		

Çizelge 5. İncelendiğinde, 8. haftada yapılan değerlendirmede kontrole göre en iyi etkiyi %38,4'lük bir etki ile 5/1 nolu izolatın elde ettiği görülmektedir. En düşük etki ise %7,69'luk bir değer ile 31/2 nolu izolatta görülmüştür.

Bu denemede Abbott'a göre yüzde etki değerlerine bakıldığında bazı izolatlarda 6. haftaya göre 8. haftada etki değerlerinin düştüğü görülmektedir. Bazı izolatlarda ise bu durumun tam tersi görülmüştür. Yani 6. haftadaki etki değerlerine göre 8. haftadaki etki değerlerinin arttığı görülmektedir.

Tartışma

Hıyar birçok ülkede ekonomik öneme sahip bir üründür. *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum*'un neden olduğu solgunluk, Dünyada hıyarda yaygın olan en önemli vasküler solgunluk hastalıklarından biridir (Martyn, 1996; Vakalounakis ve Fragkiadakis, 1999). Bu hastalık Ege Bölgesi'nde de hıyar yetiştiriciliği yapılan seralarda en önemli hastalıklardan biridir.

Bu proje kapsamında biyolojik savaş etmeni olarak Floresan pseudomonas izole edebilmek amacıyla İzmir, Balıkesir, Manisa ve Çanakkale illerinden başta hıyar olmak üzere kavun, karpuz ve kabak bitkilerinden toplam 108 adet bitki örneği toplanmıştır. Literatür bilgilerine bakıldığında örneklemenin aynı bitkinin yetiştirildiği, olabildiğince ayrı ekolojik koşullardaki sağlıklı bitkilerden alınmasının antagonist populasyonuna hem çeşitlilik hem de yoğunluk kazandırdığı belirtilmektedir (Bora ve Özaktan, 1998).

Aynı bitkiden izole edilen ve UV ışık altında vermiş oldukları renkler birbirine benzeyen izolatlar elenmiştir. Bu elemenin sonucunda *in vitro* ve *in vivo* denemelerine alınacak 110 adet Floresan pseudomonas izolatı kalmıştır. In vitro'da yapılan testler sonucunda 110 adet izolattan 102 adedinin ıskalanın 2. kategorisinde yer aldığı görülmektedir. Ancak bu ıskalanın 2. kategorisinde engelleme bölgesi değeri 2mm ile 7 mm arasında değişmektedir. Aynı ıskala kategorisinde yer alsa da 2mm'lik bir engelleme gösteren izolat ile 7 mm'lik engelleme gösteren izolat *in vivo*'da farklı düzeyde etki gösterebilmektedir. Amerikada yapılan bir çalışmada *in vitro*'da Floresan pseudomonaslar çeşitli fungal ve bakteriyel patojenlere karşı King B besiyerinde denenmiştir. Değerlendirmelerin sonucunda 120 adet Floresan pseudomonas izolatının %4'ü skalanın 3., 4. ve 5. kategorilerinde %14'ü 2. kategoride, %39'u 1. kategoride ve %43'ü 0. kategoride yer almıştır. Skalanın 2., 3., 4. ve 5. kategorilerinde yer alan ve toplam Floresan pseudomonasların %18'ini oluşturan Floresan pseudomonas izolatları *in vitro*'da en etkili antagonistler olarak seçilmiştir (Geels ve Schippers, 1983).

Biyolojik savaş mekanizmalarından biri olan uyarılmış dayanıklılık mekanizmasına sahip olabilecek Floresan pseudomonas izolatlarını belirlemek amacıyla *in vitro* çalışmalara paralel olarak yapılan *in vivo* ön eleme denemelerinde 15 günlük fidelerin ekiminden sonra 6. haftada yapılan değerlendirmede en düşük hastalık şiddeti %21 en yüksek hastalık şiddeti %53 olmuştur. Ancak *in vitro* ve *in vivo* sonuçları her zaman birbirine paralel olmayabilir. In vitro'da 5,8 mm engelleme bölgesi oluşturan 18/1 nolu izolat *in vivo*'da %53'lük bir hastalık şiddeti oluşturmuştur. Bu izolat *in vitro*'da etkili olmasına karşın *in vivo*'da etki göstermemiştir. 88/2 nolu Floresan pseudomonas izolatı *in vitro*'da 5,3 mm engelleme bölgesi oluştururken aynı zamanda *in vivo*'da da %21'lik hastalık şiddeti ile en etkili izolat olmuştur. Bazı izolatlarda ise örneğin 46/2 nolu Floresan pseudomonas izolatında *in vitro*'da 1,3 mm gibi düşük engelleme bölgesi oluşturmasına karşın *in vivo*'da %24'lük hastalık şiddeti ile en etkili izolatlardan birisi olmuştur.

In vitro ve *in vivo* ön eleme denemeleri sonuçlarının birlikte değerlendirilmesinin amacı farklı etki mekanızmalarına sahip olabilecek Floresan pseudomonas izolatlarını belirlemektir. Siderefor veya antibiyotik üreten Floresan pseudomonaslar *in vitro'*da saptanabilmektedir. Ancak uyarılmış dayanıklılık mekanizmasına sahip olan izolatlar genelde *in vivo'*da belirlenebilmektedirler. Çünkü patojenlere karşı dayanıklılık bitkide oluşmaktadır. Floresan pseudomonas izolatlarının seçimi yapılırken birinci değerlendirmeye göre ikinci değerlendirmede hastalık şiddetinde düşüş olanlar ve çok az artış olanlar seçildi. İzolatların bu özelliklerininin yanısıra *in vitro*'da elde etmiş oldukları etki değerleri de göz önünde bulunduruldu. 4/1, 26/1, 26/2, 46/2, 96/1 ve 108/2 nolu izolatların *in vitro*'da göstermiş oldukları etkiler yüksek değildir. Ancak bu izolatlar *in vivo* ön eleme denemesinde sırasıyla %23, %27, %30, %24, %25 ve % 27 gibi düşük hastalık şiddeti göstermiştir.

Floresan pseudomonaslar demirin kısıtlı olduğu koşullarda demir iyonlarına yüksek afinitesi olan, düşük molekül ağırlıklı, salgılanabilir, suda çözünebilir moleküller olan "siderefor"ları üretirler (Neilands ve Nakamura, 1985; Bora va Özaktan, 1998). Demirin kıt bulunduğu ortamlarda Floresan pseudomonaslar tarafından üretilen sideroforlar sadece besin yarışması yönüyle biyolojik savaşa katkıda bulunmazlar. Besin yarışmasının yanı sıra uyarılmış dayanıklılık ve bitki gelişimini artırıcı etkileri de vardır (Van Loon ve ark., 1998; Ramamoarthy, 2001). *In vivo* denemeler için seçilen 20

adet Floresan pseudomonas izolatı denemelere geçmeden önce *in vitro*'da siderofor etki yönünden değerlendirildi. Yapılan değerlendirmelere göre izolatların hepsinin *in vitro*'da göstermiş oldukları etkilerin siderofor etkiden kaynakladığı görülmüştür. Demir ilaveli King B besiyerinde herhangi bir engelleme bölgesi oluşmamıştır.

Yapılan tütün testi sonuçlarına göre de izolatların hiç birinin patojen olmadığı anlaşılmıştır. *İn vivo* denemelerin sonuçlarına bakıldığında ikinci değerlendirmede etkinin %7,69 ile %38,4 arasında değiştiği görülmektedir. Bazı izolatlarda (36/2 ve 39/3) birinci değerlendirmede %47,6 gibi yüksek bir etki görülmüşken 15 gün sonra yapılan ikinci değerlendirmede etki düşerek %25,0 ve %28,8 olmuştur. Bu bize izolatların oluşturmuş olduğu antagonistik etkinin uzun süreli olmadığını göstermektedir. Ancak bazı izolatlarda ise etki giderek artmıştır. Örneğin 24/2, 94/1, 96/1 gibi izolatlarda birinci değerlendirmedeki etki sırasıyla %28,5, %14,2 ve %11,9 iken bu etki giderek artış göstermiş ve 15 gün sonra yapılan değerlendirmede sırasıyla %34,6, %26,9 ve %30,8 düzeyine ulaşmıştır. Bu sonuçlar bize 24/2, 94/1 ve 96/1 nolu izolatların göstermiş oldukları antagonistik etkinin uzun süreli ve giderek artan bir etki olduğunu göstermektedir.

Sonuç ve Öneriler

Fusarium oxysporum f.sp. *cucumerinum*'un neden olduğu solgunluk hıyarın önemli hastalıklarından birisidir. Bölgemizdeki zararı her geçen gün artmaktadır. İzmir, Balıkesir, Manisa ve Çanakkale illerinden başta hıyar bitkisi olmak üzere kavun, karpuz ve kabak bitkilerinden örnekler toplanmıştır. Toplanan 108 adet bitki örneğinden elde edilen 110 adet Floresan pseudomonas izolatının *in vitro*'da antagonistik etkileri belirlenmiştir. 0–5 skalasına göre yapılan değerlendirmede 8 adet izolat skalanın 1. kategorisinde, 102 adet izolat ise 2. kategorisinde yer almıştır. *In vitro* çalışmalarına paralel olarak *in vivo*'da da aynı izolatlar ile ön eleme çalışmaları yürütülmüştür. *In vitro* ve *in vivo* ön eleme denemelerinden elde edilen sonuçlar birlikte değerlendirilmiştir. Sonraki *in vivo* denemelerinde denenmek üzere 4/1, 5/1, 6/1, 24/2, 26/1, 26/2, 31/2, 36/2, 39/3, 45/3, 46/2, 51/2, 53/1, 61/1, 83/1a, 87/2, 88/3, 94/1, 96/1 ve 108/2 nolu Floresan pseudomonas izolatları seçilmiştir. *In vivo* denemesine geçmeden önce seçilen bu 20 adet Floresan pseudomonas izolatının *in vitro*'daki antagonistik etkisinin siderofor etkiden kaynaklandığı tespit edilmiştir. Yine bu izolatlar ile *in vivo* deneme öncesi patojen olup olmadıklarını tespit etmek amacıyla tütün testi yapılmıştır. Değerlendirmenin sonucunda izolatların tümünün patojen olmadığı görülmüştür. *In vivo* denemeler her saksıda 2 bitki olacak şekilde 10 tekerrürlü olarak kurulmuştur. Değerlendirmeler sonucunda en yüksek etki %38,4'lük bir değerle 5/1 nolu izolatta görülmüştür. Yapılan çalışmalar sonucunda hıyar Fusariun solgunluğuna karşı Floresan pseudomonas izolatlarıyla biyolojik savaş umutvar görülmektedir.

Kaynaklar

Bora,T., Özaktan, H., 1998. Bitki hastalıklarıyla biyolojik savaş. Prizma Matbaacılık. 205 s.

Elad, Y., Baker, R., 1985a. The role competition for iron and carbon in suppression of chlamydospore germination of *Fusarium* spp. by *Pseudomonas* spp. Phytopathology. 75: 1053–1059.

Elad, Y., Baker, R., 1985b. Influence of trace amounts of cations and siderophore–producing pseudomonads on chlamydospore germination of *Fusarium oxysporu*. Phytopathology. 75: 1047–1052.

Fuchs, J.G., Moenne loccoz, Y., Defago, G., 1997, Nonpathogenic *Fusarium oxysporum* strain Fo47 induces resistance to fusarium wilt in tomato, Plant Diseases. 81 (5): 492–496.

Geels, F.P., Schippers, B., 1983. Selection of antagonistic Floresan pseudomonas spp. and their root colonization and persistence following treatment of seed potatoes. Journal of Phytopathology. 108: 193–206.

Liu, L., Kloepper, J.W., Tuzun, S., 1995. Induction of systemic resistance in cucumber against Fusarium wilt by plant growth–promoting rhizobacteria. Phytopathology. 85: 695–698.

Martyn, R.D., 1996. Fusarium wilt of cucumber, 15–16 Compendium of cucurbit diseases. Zitter,T.A., Hopkins, D.L., and Thomas, C. E. (Eds.), APS press. Minnesota. 87 s.

Neilands, J.B., Nakamura, K., 1985. Regulation of iron assimilation in microorganisms. Nutrition Reviews. 43: 193–197.

Owen, J.H., 1955. Fusarium wilt of cucumber. Phytopathology. 45: 435–439.

Paulitz, T.C., Park, C.S., Baker, R., 1987. Biological control of fusarium wilt of cucumber with nonpathogenic isolates of *Fusarium oxysporum*. Canadian Journal of Microbiology. 33: 349–353.

Pieterse, C.M.J., Van Pelt, J.A., Van Wees, S.C.M., Ton, J., Leon–Kloosterziel, K.M., Keurentjes, J.J.B., Verhagen, B.W.M., Knoester, M., Vander Sluis, L., Bakker, P.A.H.M., Van Loon, L.C., 2001.

Rhizobacteria–mediated induced systemic resistance: triggering, signalling and expression. European Journal of Plant Pathology. 107: 51–61.

Pieterse, C.M.J., Van Wees, S.C.M., Ton, J., Van Pelt, J.A., Van Loon, L.C., 2002. Signalling in rhizobacteria–induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana.* Plant Biology. 4: 535–544.

Ramamoarthy, V., Viswanathan, R., Raguchande, T.R., Prakasan, V., Samiyappan, R., 2001. Induction of systemic resistance by plat growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. Crop Protection. 20: 1–11.

Simeoni, L.A., Lindsay, W.L., Beker, R., 1987. Critical iron level associated with biological control of Fusarium wilt, Phytopathology. 77: 1057–1061.

Singh, P.P., Shin, Y.C., Park, C.S., Chung, Y.R., 1999. Biological control of fusarium wilt of cucumber by chitinolytic bacteria. Phytopathology. 89: 92–99.

Sneh, B., Dupler, M., Elad, Y., Baker, R., 1984. Chlamydospore germination of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* as affected by fluorescent and lytic bacteria from Fusarium–suppressive soil. Phytopathology. 74: 1115–1124.

Sungseok, Y.,K., Choong Hoe, S.S., Yong Kim, CH., 1996. Studies on cross protection of Fusarium wilt of cucumber IV. Protective effect by a non pathogenic isolate of Fusarium oxysporum in a greenhouse and fields. Korean Journal of Plant Pathology. 12: 137–141.

Vakalounakis, D.J., Fragkiadakis, G.A., 1999. Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* isolates from cucumber: differentiation by pathogenicity, vegetative compatibility, and RAPD Fingerprinting. Ecology and Pouplation Biology. 89 (2): 161–168.

Van Loon, L.C., Bakker, P.A.H.M., Pieterse, C.M.J., 1998. Systemic resistance ınduced by rhizosphere bacteria. Annu. Rev. Phytopathology. 36: 453–483.

Van Wees, S.C.M., Pieterse, C.M.J., Trijssenaar, A., An't Westende, Y.A.M., Van Loon, L.C., 1997. Differential induction of systemic resistance in Arabidopsis by biocontrol bacteria. Moleculer Plant Microbe Interactions. 10: 716–724.

.