ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

Hatice SELÇUK

Acidovorax citrulli 'NİN KARPUZUN TOHUM, FİDE, MEYVESİNDEN İZOLASYONU VE FARKLI TOHUM UYGULAMALARININ BAKTERİYEL FİDE YANIKLIĞI HASTALIĞININ ÇIKIŞI ÜZERİNE ETKİSİ

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

ADANA, 2014

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Acidovorax citrulli 'NİN KARPUZUN TOHUM, FİDE, MEYVESİNDEN İZOLASYONU VE FARKLI TOHUM UYGULAMALARININ BAKTERİYEL FİDE YANIKLIĞI HASTALIĞININ ÇIKIŞI ÜZERİNE ETKİSİ

Hatice SELÇUK

DOKTORA TEZİ

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

Bu Tez 01/07/2014 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oybirliği/~~Oyçokluğu~~ ile Kabul Edilmiştir.

……	…….	..……
Prof. Dr. Yeşim AYSAN	Prof. Dr. Soner SOYLU	Doç. Dr. Mustafa MİRİK
DANIŞMAN	ÜYE	ÜYE

……	.....
Yard. Doç. Dr. Muharrem A. KAMBEROĞLU	Yard. Doç. Dr. Mustafa KÜSEK
ÜYE	ÜYE

Bu Tez Enstitümüz Bitki Koruma Anabilim Dalında hazırlanmıştır.
Kod No:

Prof. Dr. Mustafa GÖK
Enstitü Müdürü

Bu Çalışma Ç. Ü. Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: ZF2009D23

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

Canım annem Rahime ÖRNEK’ e

ÖZ

DOKTORA TEZİ

Acidovorax citrulli'NİN KARPUZUN TOHUM, FİDE, MEYVESİNDEN İZOLASYONU VE FARKLI TOHUM UYGULAMALARININ BAKTERİYEL FİDE YANIKLIĞI HASTALIĞININ ÇIKIŞI ÜZERİNE ETKİSİ

Hatice SELÇUK

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

Danışman : Prof. Dr. Yeşim AYSAN
Yıl : 2014, Sayfa: 126
Jüri : Prof. Dr. Yeşim AYSAN
: Prof. Dr. SonerSOYLU
: Doç. Dr. Mustafa MİRİK
: Yard. Doç. Dr. Muharrem A. KAMBEROĞLU
: Yard. Doç. Dr. MustafaKÜSEK

Acidovorax citrulli adlı bakteriyel etmen kabakgillerde bakteriyel fide yanıklığı ve meyve lekesi hastalığına neden olur. Adana, Osmaniye ve Antalya illerindeki karpuz tarlaları ve ticari fideliklerden toplanan hasta bitkilerden 84 adet patojen bakteri izole edilmiştir. İzolatların tanısı gram reaksiyonu, farklı besi yerindeki koloni morfolojisi, LOPAT(L: levan tipte koloni üretimi; O: oksidaz testi, P: patateste pektolitik aktivite, A: arginin dehidrolaz aktivitesi, T: tütünde aşırı duyarlılık reaksiyonu) testleri, patojenite, DAS-ELISA ve PCR testleriyle yapılmıştır. Ülkemize 2009-2012 yılları arasında 16 farklı ülkeden ithal edilen 48 çeşide ait 217 adet karpuz ve karpuz anacı tohum lotları, *Acidovorax citrulli* bulaşıklığı yönünden incelenmiş ve tohum lotlarının hiç birinde bu patojene rastlanmamıştır. Tohumdaki inokulumu yok etmek veya azaltmak için 21 farklı fiziksel ve kimyasal tohum uygulamalarının hastalık çıkışına, tohum çimlenmesine ve fide gelişimine etkisi araştırılmıştır. Hiçbir tohum uygulaması tohumdaki inokulumu tamamen yok etmemiştir. Bu üç özellik dikkate alındığında, tohum uygulaması olarak önerilecek ilk 4 uygulama sırasıyla; %2'lik laktik asit 15 ve 20 dakika daldırma, 55°C'deki sıcak suya 20 dakika daldırma ve 60 ^{o}C'deki suya 20 dakika daldırma şeklinde yapılan tohum uygulamaları başarılı bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Karpuz, *Acidovorax*, PCR, ELISA, fiziksel ve kimyasal tohum uygulamaları

ABSTRACT

PhD THESIS

ISOLATION OF *Acidovorax citrulli* FROMSEEDS, SEEDLINGS, FRUITS OF WATERMELON AND EFFICACY OF DIFFERENT SEED TREATMENTS ON SEEDLING BLIGHT DISEASE OCCURENCE

Hatice SELÇUK

ÇUKUROVAUNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF PLANT PROTECTION

Supervisor :Prof.Dr. Yeşim AYSAN
Year: 2014, Pages: 126
Jury :Prof.Dr. Yeşim AYSAN
: Prof.Dr. Soner SOYLU
: Assoc. Prof. Dr. Mustafa MİRİK
: Asst. Prof. Dr. Muharrem A. KAMBEROĞLU
: Asst. Prof. Dr. Mustafa KÜSEK

Bacterial pathogen *Acidovorax citrulli,* causes seedling blight and fruit blotch on cucurbit crops. From surveys conducted in watermelon fields and commercial nurseries located in Adana, Osmaniye and Antalya provinces, 84 phytopathogenic bacteria were isolated from symptomatic plant materials. Identification of isolates were revealed using gram reaction, colony morphology on several media, LOPAT (L: levan production, O: oxidasetests, P: pectolyticactivity on potatoslices, A: argininedehydrolasetests, T: hypersensitivity on tobacco) tests, pathogenicity, DAS-ELISA and PCR. Between 2009-2012, 217 watermelon and rootstock seed lots belonging to 48 distinctive varieties imported from 16 different countries were tested and *Acidovorax citrulli* was not detected in those seed lots. In order to reduce or eliminate the bacterial inoculum on seed, effects of twenty-one different physical and chemical seed treatments to disease incidence, seed germination and seedling growth was investigated. Neither of treatments were inhibited the pathogen inoculum on seeds. According to results, the most successful four seed treatments were dipping in to 2% lactic acid for 15 and 20 minutes, 55 ^{o}C for 20 minutes and. 60 ^{o}C for 20 minutes.

KeyWords: Watermelon, *Acidovorax*, PCR, ELISA, physical and chemical seed treatments

TEŞEKKÜR

Çalışmamın her aşamasında yardımlarını esirgemeyen ve bana "*Acidovoraxcitrulli* (Schaad et al.)'nin karpuz tohumlarında aranması ve farklı tohum uygulamalarının bakteriyel fide yanıklığının çıkışı üzerine etkisi**"** konulu doktora tezini veren yapıcı ve yönlendirici fikirleri ile bana daima yol gösteren danışman hocam Sayın Prof. Dr. Yeşim AYSAN'a sonsuz teşekkür ederim.

Doktora tezi jüri üyelerinden Sayın Prof.Dr. Soner SOYLU'ya, Doç. Dr. Mustafa MİRİK'e , SayınYard. Doç. Dr. MuharremA. KAMBEROĞLU'na, ve Yard. Doç. Dr. Mustafa KÜSEK'eyapıcı ve yönlendirici fikirleriyle katkıda bulundukları için teşekkürlerimi sunarım.

Doktora çalışmam içerisinde yer alan tohum uygulamaları denemelerim için BATEM (Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü) iklim odalarını kullanıma açan Enstitü Müdürü Sayın Dr.AbdullahÜNLÜ'yeteşekkür ederim.

Doktora çalışmalarım esnasında tüm bölüm olanaklarından yararlanmamı sağlayan Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölüm Başkanlığı'na, maddi destek veren Ç.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne (Proje No: ZF2009D23) içten teşekkürlerimi sunarım.

PCR çalışmalarımı yapmamda yardımcı olan ve Viroloji laboratuarı olanaklarından yararlanmamı sağlayan Prof. Dr. Saadettin BALOĞLU ve Dr. Behçet Kemal ÇAĞLAR'a teşekkür ederim.

Antalya Zirai Karantina Müdürlüğü Bakteriyoloji Laboratuvarında beraber çalıştığım ve doktora çalışmam boyunca destek ve yardımlarını gördüğüm Zir. Yük. Müh. Ş.BilgeGÖLÜKÇÜ'ye teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında emeği geçen değerli arkadaşlarım Dr. Raziye ÇETİNKAYA YILDIZ, Arş. Gör. Sümer HORUZ, Zir. Yük. Müh. Ali KARATAŞ, Dr. Eda GEYLANİ YÜZBAŞIOĞLU'naçok teşekkür ederim.

Doktora çalışmam esnasında tüm zorluklara rağmen bana manevi desteklerini ve sevgilerini hiç esirgemeyen babam, kızkardeşlerim ve özellikle geçen yıl kaybettiğim annem Rahime ÖRNEK'e, sevgili eşim Özgür SELÇUK ve biricik oğlum Eren SELÇUK'a sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER **SAYFA**

ÖZ I
ABSTRACT II
TEŞEKKÜR III
İÇİNDEKİLER IV
ÇİZELGELER DİZİNİ VI
ŞEKİLLER DİZİNİ VIII
SİMGELER VE KISALTMALAR X
1. GİRİŞ 1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 17
2.1. *Acidovorax citrulli*'nin Üretim Materyalinden Aranmasıyla İlgili Çalışmalar 17
2.2. Tohum Uygulamalarıyla İlgili Çalışmalar 26
3. MATERYAL VE METOD 35
3.1. Materyal 35
3.2. Metod 37
3.2.1. Hasta Karpuz Bitkilerinin Toplanması 37
3.2.2. Hasta Karpuz Bitkilerinden Etmenin İzolasyonu 38
3.2.3. Patojenite Testi 39
3.2.4. Hasta Bitkilerden Elde Edilen İzolatların Klasik Testlerle Tanısı 40
3.2.5. Hasta Bitlilerden Elde Edilen izolatların Serolojik Tanısı 42
3.2.6. Hasta Bitkilerden Elde Edilen İzolatların Moleküler Tanısı 43
3.2.7. Ülkemize İthal Gelen Tohum Lotlarının ve İç Karantina Amaçlı Gelen Karpuz Fidelerinin Patojen Varlığı Yönünden İncelenmesi 45
3.2.8. Bakteriyel Fide Yanıklığı Hastalığının Mücadelesinde Tohum Uygulamaları 48
3.2.8.1. Tohumların Patojenle Bulaştırılması 49
3.2.8.2. Fiziksel Tohum Uygulamaları 49
3.2.8.3. Kimyasal Tohum Uygulamaları 50

3.2.8.4. Fiziksel ve Kimyasal Tohum Uygulamalarının Bakteriyel Fide Yanıklığı Hastalığına Etkisi 51
3.2.8.5. Fiziksel ve Kimyasal Tohum Uygulamalarının Tohum Çimlenmesine Etkisi 52
3.2.8.6. Fiziksel ve Kimyasal Tohum Uygulamalarının Bitki Gelişimine Etkisi 52
4. BULGULAR VE TARTIŞMA 55
4.1. Hasta Karpuz Bitkilerinin Toplanması 55
4.2. Hasta Karpuz Bitkilerinden Etmenin İzolasyonu 58
4.3. Patojenite Testi 59
4.4. Hasta Bitkilerden Elde Edilen İzolatlarının Klasik Testlerle Tanısı ..... …61
4.5. Hasta Bitkilerden Elde Edilen İzolatlarının Serolojik Tanısı 62
4.6. Hasta Bitkilerden Elde Edilen İzolatlarının Moleküler Tanısı 63
4.7. Ülkemize İthal Gelen Tohum Lotlarının ve İç Karantina Amaçlı Karpuz Fidelerinin Patojenin Varlığı Yönünden İncelenmesi 64
4.8. Bakteriyel Fide Yanıklığı Hastalığının Mücadelesinde Tohum Uygulamaları 68
4.8.1. Fiziksel ve Kimyasal Tohum Uygulamalarının Bakteriyel Fide Yanıklığı Hastalığına Etkisi 69
4.8.2. Fiziksel ve Kimyasal Tohum Uygulamalarının Tohum Çimlenmesine Etkisi 82
4.8.3. Fiziksel ve Kimyasal Tohum Uygulamalarının Bitki Gelişimine Etkisi 89
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 97
KAYNAKLAR 99
ÖZGEÇMİŞ 113
EKLER 114

ÇİZELGELER DİZİNİ **SAYFA**

Çizelge 1.1. FAO 2011 verilerine göre Dünya üretim miktarı 2
Çizelge 1.2. TUIK, 2013 verilerine göre ülkemizdeki karpuz üretim miktarı 3
Çizelge 1.3. Ülkemizde 2012 yılında üretilen karpuz fidesi miktarı 5
Çizelge 4.1. Hasta karpuz bitkilerinin toplandığı alanlar hakkında bilgiler 58
Çizelge 4.2. Tanı çalışmaları için seçilen izolatları 59
Çizelge 4.3. İzolatlarla yapılan patojenite test sonuçları 60
Çizelge 4.4. Bakteri izolatlarının test sonuçları 62
Çizelge 4.5. İzolatların ELISA okuma değerleri 63
Çizelge 4.6. Fiziksel ve kimyasal tohum uygulamalarının bakteriyel fide yanıklığı hastalığına etkisi (Ön deneme) 70
Çizelge 4.7. Fiziksel ve kimyasal tohum uygulamalarının bakteriyel fide yanıklığı hastalığına etkisi (birinci deneme) 72
Çizelge 4.8. Fiziksel ve kimyasal tohum uygulamalarının bakteriyel fide yanıklığı hastalığına etkisi (ikinci deneme) 76
Çizelge 4.9. Fiziksel ve kimyasal tohum uygulamalarının bakteriyel fide yanıklığı hastalığına etkisi (iki denemenin ortalaması) 79
Çizelge 4.10. Fiziksel ve kimyasal tohum uygulamalarının tohum çimlenmesine etkisi (ön deneme) 83
Çizelge 4.11. Fiziksel ve kimyasal tohum uygulamalarının tohum çimlenmesine etkisi (birinci deneme) 85
Çizelge 4.12. Fiziksel ve kimyasal tohum uygulamalarının tohum çimlenmesine etkisi (ikinci deneme) 87
Çizelge 4.13. Fiziksel ve kimyasal tohum uygulamalarının bitki gelişimine etkisi (ön deneme) 89
Çizelge 4.14. Fiziksel ve kimyasal tohum uygulamalarının bitki gelişimine etkisi (birinci deneme) 91
Çizelge 4.15. Fiziksel ve kimyasal tohum uygulamalarının bitki gelişimine etkisi (ikinci deneme) 93

Çizelge 4.16. Tohum uygulamalarının hastalık çıkışına, çimlenmeye ve bitki gelişimine etkisi..... 95

ŞEKİLLER DİZİNİ **SAYFA**

Şekil 1.1. *Acidovorax citrulli*'nin kotiledon yapraklarındaki belirtileri 10
Şekil 1.2. *Acidovorax citrulli*'nin karpuz yaprağındaki belirtileri..... 10
Şekil 1.3. *Acidovorax citrulli*'nin yeni gelişen karpuz meyvesindeki belirtileri 11
Şekil 1.4. *Acidovorax citrulli*'nin karpuz meyvesindeki belirtileri 11
Şekil 1.5 *Acidovorax citrulli*'nin karpuz meyvesinde oluşturduğu köpükler 12
Şekil 1.6. *Acidovorax citrulli*'nin karpuz meyve etinde oluşturduğu kahverengi leke..... 12
Şekil 3.1. Meyvelerin beyaz eti kısmında görülen lekeler..... 39
Şekil 3.2. Meyve kabuk altında gözlenen eksudatlar..... 39
Şekil 3.3. Bitki büyümesi çok iyi, iyi, orta, zayıf ve çok zayıf olarak katagorize edilmiş karpuz fideleri 53
Şekil 4.1. Karpuz yapraklarındaki yağ emmiş alanlar (solda), sararma ve düzensiz kahverengi lekeler (sağda)..... 56
Şekil 4.2. . Karpuz meyve kabuğundaki mumsu tabaka (solda), güneş yanığı benzeri sarı veya açık kahverengi lekeler (sağda) 56
Şekil 4.3. Karpuz meyve kabuğundaki çatlakların arasından dışarıya çıkan koyu kahverengi küçük damlalar (solda) ve beyaz köpük (sağda) 57
Şekil 4.4. Karpuz kotiledon yapraklarında tespit edilen su emmiş leke (solda) ve yanıklık (sağda)..... 57
Şekil 4.5. Patojenite testinde şırınga inokulasyonu sonucu karpuz yapraklarında oluşan yağ emmiş alanlar (solda) ve kürdan inokulasyonu sonucu su kabağı yapraklarında sararma (sağda) 61
Şekil 4.6. PCR ürünlerinin agaroz jel üzerinde oluşturduğu bantlar 64
Şekil 4.7. Steril su uygulaması görmüş karpuz tohumlarından gelişen bitkilerin çiçek dönemindeki durumu..... 90

SİMGELER VE KISALTMALAR

bp	**:** Baz çifti
°C	**:** Santigrat derece
dak.	**:** Dakika
DNA	**:** Deoksiribo Nükleik Asit
ELISA	**:** Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
g	**:** Gram
HCl	: Hidroklorik Asit
IF	**:** Immuno Floresan boyama
kb	**:** Kilo baz
King B	**:** King's B Besi yeri
KOH	**:** Potasyum Hidroksit
NaOCl	**:** Sodyum Hipoklorit
NA	**:** Nutrient Agar
P	**:** Fosfor
PBS	**:** Fosfat Buffer Saline
PCR	**:** Polimeraz Zincir Reaksiyonu
pv.	**:** Pathovar
P-278	**:** *Acidovorax citrulli* için yarı seçici besi yeri
sp.	**:** Tür
TAE	**:** Tris-Acetate-EDTA
YDCA	**:** Yeast Ekstrakt Kalsium Karbonat Agar

1. GİRİŞ

Cucurbitaceae (kabakgil) familyasına dahil sebze türleri, yenilebilir meyveleri ve çiçekleri için yetiştirilirler. Ticari olarak yetiştirilen önemli kabakgiller içerisinde, hıyar (*Cucumis sativus* L.), karpuz (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. ve Nakai), kavun türleri (*Cucumis melo L.*, *Cucumis melo* var. *cantaloupensis*), Çin kış kavunu (*Benincasa hispida*), acı kavun (*Momordica cochinchinensis*), yazlık ve kışlık kabaklar (*Cucurbita mixta*), su kabağı (*Lagenaria siceraria (*Molina) standl), sakız kabağı (*Cucurbita pepo (*Linneus)), sebze olarak yenilen sakız kabağı (*Cucurbita pepo* var. *medullosa*), bal kabağı (*Cucurbita maxima* (Duchesne*)*) yer almaktadır (Anonymous, 2007).

Cucurbitaceae familyasından bir tür olan karpuz (*C. lanatus)* dünyada ve ülkemizde, ekonomik önemi ve üretim miktarı bakımından oldukça önemli bir sebze türüdür. Dünya'da tropik ve subtropik bölgelerde yetiştirilen ve tek yıllık bir kültür bitkisi olan karpuzun anavatanı Afrika'dır. Afrika dışında Çin ve Hindistan'ın da karpuzun diğer gen merkezleri olduğu bilinmektedir (Solmaz, 2010).

Afrika ve Güney Afrika'da çok fazla çeşidi bulunan karpuz, Mısır, Orta Doğu, Çin ve Rusya'da uzun yıllar boyunca yetiştirilmiş olmasına rağmen Amerika kıtasına 16.yy'da İspanyollar tarafından getirilmiştir (Robinson ve Decker-Walters, 1997).

Karpuzun %95'i sudur ve beslenmemiz açısından tam bir sağlık kaynağıdır. Bol miktarda B ve C vitamini, sodyum, kalsiyum, potasyum, çinko, demir mineralleri ve antioksidan içerir. Ayrıca çeşitli kanser türlerine karşı etkili olan beta-karoten ve kansere karşı koruma özelliği olan likopen maddesi bakımından da oldukça zengin bir meyvedir. Böbrekleri çalıştırır, idrar söktürür, bağışıklık sistemini güçlendirir, vücuda zindelik, serinlik ve ferahlık verir, kemik gelişimini destekler, kalp fonksiyonlarının ve kan basıncının düzenlenmesine yardımcı olur (Erfen, 2011).

Solmaz (2010)'ın bildirdiğine göre, tüm dünyada ticari olarak yetiştiriciliği yapılan karpuzlar, *Citrullus lanatus* var. *lanatus* alt türüne ait olup çekirdekli ve çekirdeksiz tiplere sahiptir. Karpuzun mini, küçük, orta, büyük ve çok büyük boyutlu meyveleri yetiştirilmektedir. Meyve şekli yuvarlak, oval, eliptik ve silindirik iken

meyve kabuk rengi yeşilin farklı tonlarında düz veya çizgili olabilmektedir. Meyve et rengi beyaz, sarı, turuncu ve kırmızı olan çeşitler tüm dünyada yetiştirilmektedir. Son yıllarda ülkemizde oval meyve şekline sahip, orta büyüklükte, meyve kabuk rengi çizgili ve eti kırmızı olan çeşitler yaygın olarak yetiştirilmektedir. Ülkemizde genellikle yaz aylarının sembolü olan karpuz, taze meyve olarak tüketilmektedir. Ayrıca meyve salatalarında, meyve suyunda, reçel, sakız ve şekerleme yapımında da kullanılmaktadır. İri tohumları çerez, kabukları da hayvan yemi olarak da tüketilmektedir.

Çizelge 1.1'de görüldüğü gibi FAO'nun 2011 verilerine göre, Dünya'da 3.6 milyon hektarlık alanda 104.4 milyon ton üretim hacmiyle domatesten sonra en çok üretilen ikinci sebze türü karpuzdur. Dünyada önemli karpuz üreticisi ülkeler arasında Çin Halk Cumhuriyeti 69.6 milyon ton üretimle birinci sıradayken, 4.5 milyon ton üretimle İran ikinci, Türkiye 3.8 milyon ton üretimle üçüncü sıradadır. Çin Halk Cumhuriyeti dünya üretiminin %67'sini tek başına gerçekleştirmekte olup, ülkemiz ve İran arasındaki üretim miktarı yıllara göre değişmektedir. Karpuz üretiminde önemli rol oynayan diğer ülkeler ise, 1.95 milyon ton üretimle Brezilya ve 1.79 milyon ton üretimle ABD'dir (Anonymous, 2011).

Çizelge 1.1. FAO, 2011 verilerine göre Dünya karpuz üretim miktarı

Sıra	**Ülkeler**	**Üretim (milyon ton)**
1	Çin Halk Cumhuriyeti	69.6
2	İran	4.5
3	Türkiye	3.8
4	Brezilya	1.9
5	ABD	1.8
Dünyadaki Toplam Üretim		104.4

Çizelge 1.2.'de görüldüğü gibi, ülkemizdeki yaklaşık 3.9 milyon tonluk meyve üretimi Diyarbakır, Şanlıurfa, Mardin, Adıyaman, Adana, Hatay ve Çanakkale dolaylarında yapılsa da üretimin büyük çoğunluğu Adana ve çevresinde gerçekleşmektedir (Anonim, 2013). Ülkemizin en erkenci karpuzu örtü altında

Mersin ilinin Tarsus ilçesinin Kulak köyünde yetiştirilmektedir. Ardından Adana ilinin Karataş ilçesinin Tuzla beldesinde kumlu toprakta yetiştirilen karpuz hasat edilmektedir. Temmuz ayının başlarında ise Adana ilinin Ceyhan ilçesi ve Osmaniye ilinin Kadirli ilçesindeki üretim piyasaya girmektedir. Geç dönemde hasat edilen karpuzlar ise Adana ilinin Karaisalı ilçesinde üretilmektedir.

Ürettiğimiz karpuz iç piyasada tüketildiği gibi, toplam 16.539 tonu yurt dışına ihraç edilmektedir. En büyük ihracatı 10.362 ton ile Irak'a, 2.032 ton ile Polonya'ya, 1.954 ton ile Çek Cumhuriyeti'ne, 1.170 ton ile Romanya'ya ve 1.021 ton ile Almanya'ya yapmaktayız (Anonim, 2014).

Çizelge 1. 2. TUİK, 2013 verilerine göre ülkemizdeki karpuz üretim miktarı

Sıra	**Şehir**	**Üretim (ton)**
1	Adana	775.219
2	Antalya	365.841
3	Diyarbakır	196.190
4	Şanlıurfa	134.208
5	Mersin	122.310
6	Mardin	113.624
7	Adıyaman	86.202
8	Osmaniye	30.792
9	Çanakkale	29.816
10	Hatay	8.953
TOPLAM		3.887.324

Ülkemiz karpuzun anavatanı olmamasına rağmen, Anadolu'da yabani pek çok türün varlığı Fakültemiz Bahçe Bitkileri Bölümünde yapılan pek çok çalışmayla ortaya konmuştur (Solmaz ve Sarı, 2009). Tat Karpuzu, Sürme Hırsızı, Beyaz Kışlık Karpuz, Siyah Kışlık Karpuz, Mardin Karpuzu, Gelin Karpuzu, Komando Karpuzu ve Halep Karası gibi yerli çeşitlerimizin yerini son yıllarda yabancı kökenli F1 çeşitler almaya başlamıştır (Solmaz, 2010). Son yıllarda erkenci çeşit olarak Crisby

F1, Starbust F1 ve orta geççi çeşit olarak Crimson Tide F1 ithal çeşitleri ile Üstün F1 Erkenci yerli çeşidi yaygın olarak kullanılmaktadır.

Günümüzde başarılı bir sebze yetiştiriciliğinde, uygun çeşit seçimi kadar kaliteli fide kullanımı da büyük bir önem taşımaktadır. Ülkemizde sebze tarımında son yirmi yılda çeşit, tohumluk ve fidecilik konularında önemli derecede ilerlemeler sağlanmıştır. Ülkemizde fide endüstrisinin gelişmesiyle birlikte, üreticiler yaklaşık 20 yıldır sebze üretiminde hazır ticari fide kullanmaktadır. Özellikle örtü altında yetiştirilen fidelerin tamamına yakını modern üretim tesislerinde üretilmektedir. Türkiye'de ilk modern fide üretim tesisleri 1994 yılında Antalya'da kurulmuştur. 1990'lı yılların sonunda başlayan hazır fide sektörü özellikle son 7–8 yıl içerisinde hızlı bir büyüme göstermiştir (Demir ve ark., 2010). 1990'lı yılların ortasından sonra tohumculuk ve fidecilik sektöründe yer alan çok sayıda firma bir araya gelerek "**Türkiye Tohumcular Birliği**"ni kurmuştur. Bu birlik (1) Bitki Islahçıları, (2) Fide Üreticileri, (3) Fidan Üreticileri, (4) Süs Bitkileri Üreticileri, (5) Tohum Dağıtıcıları, (6) Tohum Sanayicileri ve Üreticileri, (7) Tohum Yetiştiricileri olmak üzere yedi alt birlikten oluşmaktadır. Bu birliğin alt biriminden biri olan "Fide Üreticileri" alt birliği yani **Fidebirlik**, 2008 Yılında 41 fide üreticisi tarafından "5553 sayılı Tohumculuk Kanunu" çerçevesinde örgütlenerek kuruluşunu tamamlamıştır. Birer meslek kuruluşu olan bu birliklerin amacı sektörünün geliştirilmesine katkı sağlamak, sektörde faaliyet gösteren gerçek veya tüzel kişiler arasında meslekî dayanışma sağlamak, meslekî faaliyetleri kolaylaştırmak, bulunanların ekonomik ve sosyal haklarının korunmasını sağlamaktır (Anonim, 2012). Fidebirlik'in 2012 verilerine göre, ülkemizdeki faaliyet gösteren ticari fide firma sayısı resmi olmayan rakamlara göre yaklaşık 100 adet civarında iken Fidebirliğe kayıtlı ticari fide firması ise 87 adettir. Çizelge 1.3.'de görüldüğü gibi, bu firmalar yılda toplam 3.2 milyar adet fide üretimi gerçekleştirmektedir. Üretilen sebze fidelerinin %50'den fazlasını Akdeniz Bölgesindeki işletmeler gerçekleştirmektedir. Akdeniz Bölgesindeki bu 60 adet işletmeden sadece Antalya ilinde 45 adet fide firması bulunmaktadır. Antalya ilini Adana ve Mersin illeri takip etmektedir. Fide üretimimiz sadece iç piyasaya yönelik değil yurt dışına fide ihraç ederek yeni bir sektör oluşmuştur. 2011 yılında üretilen toplam Cucurbitacea türlerine (karpuz, kavun, hıyar ve kabak) ait

228.810.735 adet fidenin 79.683.979 adedini karpuz fidesi oluşturmaktadır (Anonim, 2011). Fidebirlik'in 2012 sonundaki verilerine göre ülkemizde bölgelere göre karpuz fidesi üretim miktarları incelendiğinde, Akdeniz Bölgesi 77 milyon adet üretim miktarıyla ilk sırada yer alırken, Marmara Bölgesi ise 2.6 milyon adetle ikinci sırada, Ege Bölgesi ise 2 milyon adet karpuz fidesi üretim miktarıyla üçüncü sırada yer almaktadır (Anonim, 2012).

Çizelge 1. 3. Ülkemizde 2012 yılında üretilen karpuz fidesi miktarı

Sıra	**Bölge**	**Fide Sayısı (adet)**
1	Akdeniz	77 milyon
2	Marmara	2.6 milyon
3	Ege	2 milyon
Toplam		81.6 milyon

Geleneksel karpuz üretiminde en önemli sorunlardan biri toprak kökenli fungal bir etmen olan *Fusarium oxysporum* f.sp. *niveum*'un neden olduğu Fusarium solgunluğu hastalığıdır. Bu hastalıkla mücadelede en etkili yol aynı tarlada en az dört-beş yıl kabakgil tarımı yapmamaktır. Son yıllarda bu hastalığa dayanıklı olan yabani kabak türleri tespit edilmiştir. Bu dayanıklı çeşitler üzerine istenilen karpuz çeşitleri aşılanarak toprak kökenli Fusarium solgunluğu hastalığına yakalanmadan aynı tarlada üst üste karpuz tarımı yapılabilmektedir. Son yıllarda kullanılan yeni teknolojiler sayesinde, fidecilik sektöründe aşılı fide üretimi olanaklı hale gelmiştir. İlk defa 1920'li yılların sonuna doğru Japonya, Kore, diğer Asya ve Avrupa ülkelerinde aşılı domates üretiminde kullanılmaya başlayan bu teknoloji, ülkemizde 2000'li yıllardan beri aşılı karpuz üretiminde de kullanılmaktadır (Özmen, 2009). Kabak anacı üzerine aşılanan karpuz fidesi kullanımı Fusarium solgunluğuna karşı bitkiyi koruduğu gibi bitkinin tuza, düşük ve yüksek sıcaklara karşı dayanımını artırmakta, topraktan besin alınımını artırmakta, sonuçta verim artışı gerçekleşmektedir. Anaç olarak ülkemizde yaygın olarak (1) Argentario hibrit su kabağı ile *Cucurbita maxima* x *Cucurbita moschata* melezi olan Maximus, (2) *Cucurbita maxima* x *Cucurbita moschata* melezi olan RZ 841 F1, (3) *Cucurbita*

maxima x *Cucurbita moschata* melezi olan Nun 9075 F1, (4) *Cucurbita pepo* TZ-148 anaçları ithal edilerek kullanılmaktadır (Tokgöz ve ark., 2012). Fidebirliğin verilerine göre, 2012 yılında ülkemizde 110 milyon adet aşılı fide ve 55 milyon adet aşılı karpuz fidesi üretimi yapılmaktadır (Anonim, 2012).

Fusarium solgunluğu dışında ülkemiz karpuz üreticisini meşgul eden pek çok fungal, viral ve bakteriyel hastalık mevcuttur. En önemli karpuz hastalıkları: Alternaria yaprak lekesi, (*Alternaria* spp.), antraknoz (*Colletotrichum orbiculara*), zamklı gövde (*Didymella bryoniae)*, cucumber mosaic virus (CMV), watermelon mosaic virus (WMV), zucchini yellow mosaic virus (ZYMV), bakteriyel solgunluk (*Erwinia tracheiphila*), bakteriyel leke ve yanıklık hastalığı (*Pseudomonas viridiflava*), bakteriyel yanıklık (*Pseudomonas aptata*), köşeli yaprak lekesi (*Pseudomonas syringae* pv *lachrymans*), kabak bakteriyel yaprak lekesi (*Xanthomonas cucurbitae*) ve bakteriyel fide yanıklığı ve meyve leke hastalığı (*Acidovorax citrulli)*'dır (Zitter ve ark., 1996).

Bu hastalıklar içerisinde karpuzun en önemli bakteriyel hastalığı ise *Acidovorax citrulli*'nin neden olduğu **bakteriyel fide yanıklığı** ve **bakteriyel meyve lekes**i hastalığıdır. Bu hastalık ilk olarak, ABD'nin Georgia eyaletinde, Türkiye'den ithal edilen iki farklı karpuz tohum partisinin fidelerinde Webb ve Goth (1965) tarafından saptanmıştır. Araştırıcılar hastalığın tohum kökenli olabileceğini bildirmiş ancak hastalığa neden olan bakterinin tür düzeyinde tanısını yapamamıştır. Benzer hastalık belirtilerinin karpuz meyvelerinde 1967 ve 1968 yıllarında Florida'da ortaya çıktığı bildirilmiştir (Crall ve Schenck, 1969). Bakteriyel etmenin tür düzeyinde tanısı ve isimlendirmesi ilk olarak Schaad ve ark., (1978) tarafından *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli* olarak yapılmıştır. Hastalık belirtilerinin ABD'de pek çok fidelikte ortaya çıkışı sonucu, hastalık etmeninin tohumla taşındığı ilk olarak Sowell ve Schaad (1979) tarafından kanıtlanmıştır. Tohum kökenli bu inokulumla, ilk mücadele çalışmaları olan tohum uygulamaları, Wall (1989) tarafından araştırılmıştır. Pasifik Okyanusunda Japonya ile Filipinler arasında yer alan, bir adalar ülkesi olan Mariana Adalarında meydana gelen ilk hastalık epidemisiyle, etmen tüm dikkatleri üzerine çekmiştir (Wall ve Santos, 1988). ABD'nin Florida eyaletinde 1989 yılının yazında yetiştirilen karpuzlarda %90 oranında meydana gelen

ürün kayıpları, hastalığın dünyadaki ikinci büyük epidemisi olarak değerlendirilmiştir (Somadi ve ark., 1991). Hastalık sadece tarlada değil aynı zamanda fidelikte de büyük ekonomik kayıplara neden olmuştur. Benzer şekilde Meksika'da bazı ticari fideliklerde %100 ürün kayıpları tespit edilmiştir (Elizalde Jimenez ve ark., 2011).

EPPO'nun verilerine göre, ABD'nin 17 eyaletinde (Alabama, Arkansas, California, Delaware, Florida, Georgia, Iowa, Illinois, Indiana, Maryland, Mississippi, Missouri, North Carolina, Oklahoma, Oregon, South Carolina, Texas) bu hastalığın varlığı bilinmektedir (Latin ve Rane., 1990; Latin ve Hopkins, 1995; Hamm ve ark., 1997; Langston ve ark., 1999). ABD dışında Brezilya (Assis ve ark., 1999), Japonya (Takashi ve ark., 2000), Avustralya (Martin ve Horlock, 2002), Kostarika (Munoz ve Monterroso, 2002), Nikaragua (Munoz ve Manterroso, 2002), Tayland (Walcott ve ark., 2004), İsrail (Burdman ve ark., 2004), Çin Halk Cumhuriyeti (Ren ve ark., 2006), Tayvan (Tzeng ve Hsu, 2007), İran (Harighi, 2007), Macaristan (Palkovics ve ark., 2008), İtalya (Anonymous, 2014), Kore (Seo ve ark., 2006) ve Yunanistan (Holeva ve ark., 2009)'da varlığı rapor edilmiştir. İsrail ve İtalya bu hastalığın sınırlı yerde var olduğunu ve bunların artık karantinaya alınarak temizlenmeye çalışıldığını bildirmiştir (Anonymous, 2014).

Ülkemizde ise ilk defa 1996'da Edirne'nin Enez ilçesinde ortaya çıkmış ve üretim alanı yakılarak temizlenmiştir (Demir, 1996). Mirik ve ark. (2006) tarafından Çukurova'da karpuz üretim alanlarında 2004 yılında ilk kez tespit edilen *Acidovorax citrulli* etmeninin ülkemizdeki en şiddetli epidemisi 2009 yılının Haziran ayında gerçekleşmiştir (Aysan ve ark., 2011). Adana İl Gıda Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü tarafından Doğu Akdeniz Bölgesindeki Adana, Mersin ve Osmaniye'nin bazı ilçelerinde yapılan survey çalışmalarında ve üreticiler tarafından Adana Biyolojik Mücadele Araştırma İstasyonu'na getirilen karpuz örneklerinin incelenmesi sonucunda *Acidovorax citrulli* ile bulaşık üretim alanları tespit edilmiştir. Hastalıklı ilk bitki örnekleri Yüreğir, Karataş, Kozan ve Kadirli ilçelerinden gelmiştir. Yapılan tespit çalışmaları sonrasında Adana ve Osmaniye illerinde 4763 dekarlık karpuz üretim alanının *Acidovorax citrulli* ile bulaşık olduğu belirlenmiştir. Bu alanlar İl Gıda Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü tarafından

karantinaya alınarak bulaşık tarlalar derin sürüm yapılmış ve 4 sene boyunca herhangi bir kabakgil ürünü ekimi yasaklanmıştır (Aysan ve ark., 2011). Bakanlık personeli tarafından şiddetli epidemi sonrasında karpuz üretim alanları bu hastalık yönünden her yıl survey çalışmaları yapılarak hastalık seyri takip edilmektedir. Karataş ve ark., (2012) *Acidovorax citrulli*'yi 2009-2010 yıllarında Crimson Tide, Zeugma, Crisby ve Blade çeşidi karpuzlardan izole ettiklerini bildirmişlerdir. 2009 yılında meydana gelen epidemi sonucu pek çok karpuz fidesi imha edilmiştir (Aysan ve ark., 2011). Çukurova Bölgesinde yaşanan bu epidemi hem ticari fide üreticilerini hem de karpuz çiftçisini ekonomik olarak büyük zarara uğratmıştır.

Horuz ve ark., (2011), Çukurova Bölgesi'nde *Acidovorax citrullii*'nin yeni bir konukçusu olarak kavun (*Cucumis melo* cv. Sürmeli) bitkisinden etmeni izole etmişlerdir. Çukurova Bölgesinde 2010 yaz döneminde kavun üretim alanlarında yapraklarda açık kahverengiden kırmızımsı kahverengiye kadar değişen renklerde düzensiz lekeler, meyve yüzeyinde çatlamalar, kabuğun alt yüzeyinde biten ve meyve etinin içine çok işlemeyen kahverengi lekelenmeler saptamışlardır. Horuz ve ark., (2014) Çukurova Bölgesindeki kavunlarda *Acidovorax citrulli*'nin neden olduğu bakteriyel meyve lekesi hastalığının varlığını ilk kez ortaya koymuştur.

Karpuzda bakteriyel meyve leke hastalığı ilk olarak *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli* iken daha sonra *Pseudomonas avenae* subsp. *citrulli* olarak adlandırılmıştır (Willems ve ark., 1992). Sonraki taksonomide hastalığın ismi *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* olarak değişmiş ve son taksonomik ismi ise *Acidovorax citrulli* olarak isimlendirilmiştir (Schaad et al., 2008). Hastalık etmeni düz veya çubuk şeklinde, 0.2-0.8 ile 1.0-5.0 μm arası boyutlarda, gram negatif, aerobik, çoğunlukla tek, nadiren iki veya üç kamçıya sahiptir. Etmen tütün yapraklarında aşırı duyarlılık reaksiyonu oluşturur ve oksidaz pozitif özelliktedir (Lelliott ve Stead, 1987; Schaad ve ark., 2001). *Acidovorax citrulli* 41°C sıcaklığa kadar gelişme yeteneğinde iken +4 ^{o}C'de gelişimi tamamen durmaktadır (Schaad ve ark., 2001).

Tohum kökenli olan ve tohumlarda 30 yıl yaşamını devam ettirebilen (Block ve Shepherd, 2008) bu etmen, farklı kıtalara, ülkelere ve bölgelere yayılmasında bulaşık tohumlar büyük rol oynarlar (Hopkins ve Thompson, 2002a). Patojenle

bulaşık tohumlar ekildiğinde inokulum rahatlıkla yeni gelişen fidelere geçer (Johnson ve Walcott, 2013). Son yirmi yıldır tüm karpuz ve kavun yetiştirilen ülkelerde kullanılan tohumlar Çin'de üretilmektedir (Feng ve ark., 2013). Kabakgil tohumlarında sıfır toleransı olan bu patojenin, Çin'de tarlalarda (Ren ve ark., 2006) ve kabakgil tohumlarında (Ren ve ark., 2004; Ren ve ark., 2006; Zhao ve ark., 2006; Xu ve ark., 2008) varlığının saptanması tüm dünya için tehlike olarak değerlendirilmektedir (Feng ve ark., 2013). Bir diğer tehlike de sağlıklı görülen meyvelerden elde edilen bulaşık tohumlardır. Karpuzun çiçeklenme evresinde bulaşan patojen, tohumun embriyosuna ve tohum kabuğuna yerleşirken (Dutta ve ark., 2012a; Dutta ve ark., 2012b; Dutta ve ark., 2012c), meyvelerde herhangi bir belirti gözlenmeyebilir (Walcott ve ark., 2003). Karpuzun çiçeklenme döneminde, çiçeğe kolonize olan *Acidovorax citrulli* popülasyonuyla, tohuma yerleşen bakteri popülasyonu arasındaki pozitif ilişki Lessl ve ark., (2007) tarafından açıklanmıştır. Bulaşık tohumlar yetiştirildiğinde gelişen fidelerin kotiledon yapraklarında su emmiş lekeler oluşur (Şekil 1.1). Bu lekeler ileri dönemde kahverengileşerek fidelerin kurumasına veya ölümüne neden olur. Bu şekilde hasta fideler pazarlanamazlar. En önemli problem ise sağlıklı görünen ancak bu patojenle epifitik olarak bulaşmış olan kabakgil fideleridir. Bunlar yetiştirildiğinde uygun iklim şartlarında tarlada hastalık ortaya çıkar. Hastalığın yaprak lekeleri çok tipik değildir. Bazı tarlalarda yaprak damarı boyunca uzanan düzensiz nekrozlar şeklindeyken farklı tarlalarda küçük kloroz ve nekrozlar (Şekil 1.2) şeklindedir. Bazı tarlalarda ise hiçbir yaprak belirtisi gözlenmeksizin hasada yakın dönemde meyve belirtileri ortaya çıkar. Meyve lekeleri önce küçük su emmiş lekeler şeklinde başlar (Şekil 1.3) ve bazen hiç fark edilmezler. Nemli koşullar devam ettiği sürece meyve lekeleri hızlıca ilerleyerek kabuğu kaplayabilir ve lekelerin rengi kahverengiye döner (Şekil 1.4), bazen güneş yanığı şeklinde belirtiler de oluşabilir. İlerleyen zamanlarda lekeli yerlerin ortası çatlar ve dışarıya köpükler çıkar (Şekil 1.5). Meyve etinde de kahverengi lekeler gözlenir (Şekil 1.6) ve bu lekelerden bakteri son derece temiz olarak izole edilebilir. Hastalık karpuzun iletim demetlerini hastalandırmadığını söyleyen pek çok makale bulunsa da (Latin, 1996) da Bahar ve ark., (2009) *Acidovorax citrulli*'nin kavunda belirti oluşturmadan iletim demetlerinden ksilemde bulunabildiğini göstermiştir. Bunun

yanında Alves ve ark. (2010) kavun bitkisinin çiçek, yaprak ve gövdede bu etmenin kolonize olduğunu kanıtlamış ve hastalık epidemiyolojisinde bunların önemli role sahip olduğunu belirtmiştir.



Şekil 1.1. *Acidovorax citrulli*'nin neden olduğu kotiledon yapraklardaki su emmiş (solda) ve nekrotik (sağda) lekeler



Şekil 1.2. *Acidovorax citrulli*'nin neden olduğu gerçek yapraklardaki sararma (solda) ve sarı haleli düzensiz lekeler (sağda)



Şekil 1. 3. *Acidovorax citrulli*'nin yeni gelişen karpuz meyvesinde oluşturduğu nekrotik lekeler



Şekil 1.4. *Acidovorax citrulli*'nin karpuz meyvesindeki köpük (solda) ve kahverengi lekeler (sağda)



Şekil 1.5. *Acidovorax citrulli*'nin karpuz meyvesinde oluşturduğu köpükler



Şekil 1.6. *Acidovorax citrulli*'nin karpuz kabuğunda (flavelo) ve meyve etinde (albedo) oluşturduğu kahverengi leke

Bakteriyel meyve leke hastalığı etmeni başta karpuz, kavun, hıyar, balkabağı, kabak ve anaç olarak kullanılan kabaklar olmak üzere tüm *Cucurbita* spp. türlerinde hastalık yapabilmektedir (Isakeit ve ark., 1997; Isakeit ve ark., 1998; Martin ve ark., 1999; Walcott ve ark., 2000; Silva ve ark., 2006; Tian ve ark., 2013a). Nascimento ve ark., (2004) tarafından yapılan bir çalışmada *Acidovorax citrulli* patojeni çeşitli türdeki (Cucurbits, Solanaceous, Gramineous, Leguminous ve Cariceous spp.) bitkilerin yeşil aksamlarına püskürtme yoluyla inokulasyon yapılması sonucu etmenin patlıcan ve domateste zayıf belirti oluştururken, *Cucurbita* spp. türlerinin %90'nından fazlasında şiddetli belirti oluşturduğu görülmüştür. Tüm kabakgil çeşitlerinde bu etmen hastalık oluştursa da, bazı koyu renkli karpuz çeşitlerinin hastalığa daha az duyarlı olduğu ve Afrika kökenli (Zimbabve ve Zambiya'dan toplanan) yerel çeşitlerin hastalığa dayanıklılık genleri içerdiği tespit edilmiştir (Hopkins ve Thompson, 2002b). Ancak ticari olarak bu hastalığa dayanıklı bir çeşit henüz üreticinin kullanımına sunulmamıştır (Bahar ve Burdman, 2010; Burdman ve Walcott, 2012). Benzer durum kavun çeşitleri için de geçerlidir (Bahar ve ark., 2009). Ayrıca *Acidovorax citrullii*'nin yeni bir konukçusunun karaçalı bitkisi (*Paliurus spina-christi*) olduğu ilk defa İran'da Harighi (2007) tarafından rapor edilmiştir. Yaprakları tıbbi amaçla ağızda çiğnenen bir sarmaşık türü olan tembul bitkisinde (*Piper betle*) *Acidovorax citrullii*'nin yaprak yanıklığına neden olduğu Deng ve ark., (2010) tarafından bildirilmiştir.

Hastalıkla mücadelede hastalık epidemiyolojisinin iyi bilinmesi son derece önemlidir. Dünyada karpuz için çok yeni olan bu hastalığın yayılma yolları ve uygun olmayan mevsimlerde yaşamını devam ettirdiği yerler hakkında sınırlı sayıda araştırma bulunmaktadır. Sadece meyve üretimi yapılan tarlalardaki yayılma yolları değil aynı zamanda ticari fidelikteki yayılma yolları ve mücadele stratejileri hakkında daha detaylı bilgilere ihtiyaç vardır. Bahar ve Burdman (2010) ile Burdman ve Walcott (2012) tohumluk karpuz üretim alanlarının sofralık üretim alanlarından ayrı bir yerde yapılması gerektiğini, ayrıca üretimin her aşamasında hijyene dikkat edilmesi gerektiğini bildirmişlerdir. Latin ve ark., (1995) karpuz fidesi üretilen ticari fideliklerde viyollerin yerleştirildiği tepsilerde *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*'nin 63 gün yaşamını sürdürdüğünü saptamış ve mücadelesinde %10'luk sodyum

hipoklorite 5 dakika daldırıldığında patojenin tepsilerden yok olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca yağmurlama sulamanın hastalık gelişimini artırırken alttan sulamanın hastalık gelişimini azalttığını belirlemişlerdir. Ayrıca bakır hidroksitle yapılan yeşil aksam ilaçlamaları hastalık baskılanmasında gayet etkili olduğunu saptamışlardır. Fide üretim alanlarında genel temizlik önlemlerine dikkat etmenin bakteri yayılımını engellemede çok önemli olduğuna ve bakterinin fidelikte yayılmasının önlenmesinde nemin azaltılması ve su sıçratmalarının önüne geçilmesi gerektiğine değinmişlerdir. Hopkins ve Thompson (2006) tüm kabakgil türlerinin, potansiyel inokulum kaynağı olması nedeniyle fideliklerde bunların ayrı yerlerde yetiştirilmesi gerektiğini belirtmişlerdir. Hopkins ve ark., (2009) fideliklerde bu hastalığın yayılmasını önlemek için bakırlı preparatların yeşil aksama uygulanması ve sulama suyuna eklenen çeşitli kimyasalların hastalık mücadelesinde başarı getireceğini belirtmişlerdir. Bu tip uygulamalar hastalığı tamamen yok etmese de hastalık yayılmasını azaltır. Benzer şekilde Horuz ve ark., (2011) fideliklerde sulama suyuna klor eklenmesini önermişlerdir.

Ülkemizde, bu hastalığın epidemi yaptığı yerlerde yapılan çalışmalar sonucunda hastalığın sadece yerli çeşitlerle sınırlı kalmayıp ithal F1 tohumları ile üretim yapılan alanlarda da hastalığın bulunduğu belirlenmiştir. Aysan ve ark., (2011) yaşanan bu epideminin nedeni olarak sadece ülkede kullanılan karpuz tohumlarının sorumlu olamayacağını, bunların yanısıra aşılı karpuz üretiminde kullanılan anaçlara ait tohumların da bu etmen yönünden testlenmesi gerektiğini belirtmiştir. Yaşanan bu epidemiden sonra tüm dikkatler ülkede kullanılan tohumlara ve bunların ülkeye ithalatında hastalık varlığı açısından testleme yapan karantina kuruluşlarına yönelmiştir. Özellikle fide firmalarının yoğunlukta bulunduğu Antalya Bölgesinde ithal karpuz tohumu analizi önem taşımaktadır. Özel tohum firmaları, tohum ithalatı için Zirai Karantina Müdürlüğüne başvurarak Zirai Karantina Yönetmeliği'ne göre EK/II-B (Türkiye'de varlığı sınırlı olarak bulunan zararlı organizmalar) listesinde olan bakteriyel meyve leke hastalığı yönünden karpuz tohumlarını analiz ettirmek zorundadırlar.

Dünyada ve ülkemizde karpuz yetiştirilen pek çok yerde görülen ve epidemilere neden olan bakteriyel meyve leke hastalığına karşı tarlada meyve üretim

döneminde yeşil aksama yapılan kimyasal uygulamalar yetersiz kalmaktadır. Hastalıkla mücadelede ilk inokulum kaynağı olan tohumların hastalıksız olması son derece önemlidir. Özellikle primer inokulum kaynağı olan tohumun hastalıktan temiz olması için sertifikalı, tohum sağlık testinden geçmiş ve bakır içerikli ilaçlarla muamele edilmiş olmasının hastalığın çıkışına azaltıcı etkisi olmaktadır (Walcott, 2008). Bu hastalığın primer inokulum kaynağı olarak görev alan bulaşık tohumların dezenfeksiyonu yani etkili tohum uygulamalarının kullanım olanakları birçok araştırıcı tarafından araştırılmaktadır (Hopkins ve ark., 1996; Nomura ve Shirakawa, 2001; Zhao ve ark., 2003; Hopkins ve ark., 2003; Hopkins ve Thompson, 2006; Feng ve ark., 2007). Fakat halen bu tohum kökenli hastalığa karşı tamamen etkili bir yöntem bulunamamıştır.

Bu doktora tezi kapsamında, 2009-2010 yıllarında Adana, Osmaniye ve Antalya illerinde karpuz yetiştirilen alanlarda bakteriyel meyve lekesi hastalığı görülen tarla ve fidelikler ziyaret edilmiş ve karpuz üreticileriyle görüşülmüştür. Buralardan toplanan hasta karpuz bitkilerinden yapılan izolasyonlarda 84 adet bakteri izolatı elde edilmiştir. Bu bakteri izolatlarının tanısı geleneksel yöntemler, patojenite testi ve bu türe spesifik primerler kullanılarak PCR ile yapılmıştır.

Bu doktora tezi kapsamında 2009-2012 yılları arasında çeşitli Avrupa ve Uzak Doğu ülkelerinden (Hollanda, ABD, Fransa, İsrail, İspanya, Hindistan, Tayvan, Yunanistan, İtalya, Çin ve Ürdün) ithal edilen karpuz ve karpuz anacı tohum lotlarının *Acidovorax citrulli*'nin varlığı açısından testlemeleri yapılmıştır. Bunun için Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı tarafından Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü'nün 06.05.2010 tarihli yazısıyla bakteriyel meyve leke hastalık (*Acidovorax citrulli*) etmeninin karantina analizlerinde kullanılması için uygun görülen 6968 sayılı Zirai Karantina Numune Alma ve Analiz Yönetmeliği'ne göre, 48 çeşide ait 217 adet karpuz ve karpuz anacı tohum lotu Antalya Zirai Karantina Müdürlüğü'nde *Acidovorax citrulli* ile bulaşıklığı yönünden incelenmiştir. Zirai Karantina Müdürlüklerinde bakteriyel meyve leke hastalık (*Acidovorax citrulli*) etmeninin tohumlarda aranmasında kullanılan yöntemde, 2009 yılında bu hastalık epidemi yapmadan önce; tohum miktarı 50 gram olarak kullanılmış ve sadece karpuz tohumlarında patojenin varlığı aranmaktaydı. Karpuz tohumları parçalanmadan tüm

tohumlarda bu patojenin araması yapılıyordu. Bakteriyel meyve leke hastalığının 2009 yılındaki epidemisi sonrasında yapılan öneriler üzerine Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı tarafından eskiye göre daha geniş kapsamlı ve detaylı yeni bir protokol geliştirilmiştir. Yeni protokole göre; hastalık etmeni sadece karpuz tohumlarında değil tüm kabakgil tohumlarında aranmasına karar verilmiştir. Ayrıca testlemede kullanılan tohum miktarı 50 gr'dan 450-500 gr'a (10.000-30.000 adet) arttırılmıştır.

Ayrıca, tohum üretici firma veya fide üreticilerinin kullanabileceği, tohum kökenli bu hastalığın primer inokulum kaynaklarının yok edilmesi veya azaltılmasında farklı fiziksel ve kimyasal tohum uygulamalarının etkinliği araştırılmıştır. Ayrıca bu yöntemlerin tohum çimlenmesine ve fide gelişimine olan etkileri de ortaya konmuştur.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Karpuzda bakteriyel meyve lekesi ve fide yanıklığı hastalığı dünya için yeni bir hastalık olması nedeniyle patojenin biyolojisi ve hastalık epidemiyolojisi hakkında yeterli sayıda araştırma makalesi bulunmamaktadır. Bu nedenle dünyanın pek çok yerinde pek çok araştırıcı bu patojen üzerine son yıllarda farklı araştırmalar yürütmeye başlamıştır. Yayınlanan makaleler incelendiğinde 1990-2000'li yıllar arasında hastalığın farklı ülkelerde varlığını bildiren çalışmalar varken, 2000'li yıllardan sonra etmenin moleküler tanısı, epidemiyolojisi, tohumlarda aranması ve mücadelesi üzerine yapılan makalelerin arttığını görmekteyiz. En önemli araştırma konusu, hastalık yönetimi üzerine olmalıdır. Özellikle dayanıklı çeşit geliştirme ve hastalıksız tohum eldesi önemli adımlardır (Bahar ve Burdman, 2010).

Halen üzerinde çalışılacak pek çok konu bulunan bu hastalık ve etmen mikroorganizmayla ilgili olarak ülkemizde sınırlı sayıda yapılan çalışmalar genellikle Akdeniz Bölgesindeki araştırıcılar tarafından yürütülmektedir. Erfen (2011) tarafından hazırlanan yüksek lisans çalışmasında, sağlıklı görülen karpuz fidelerinde patojenin aranmasında kullanılan genel ve yarı seçici besi yerlerinin etkinliği karşılaştırılmıştır. Mengüllüoğlu (2012) tarafından tamamlanan yüksek lisans tezinde, bitki ekstraktlarından elde edilen uçucu yağların bu patojene antimikrobiyal etkisi *in vitro* koşullarda araştırılmıştır. Farimaz (2013) tarafından hazırlanan yüksek lisans tezi kapsamında, farklı bitki aktivatörleri ve ticari gübrelerin tohum uygulaması olarak hastalık gelişimine etkisi araştırılmıştır.

Son yıllarda yapılan çalışmalardaki artış göze alındığında bu doktora tezinde ana çalışma konusunu oluşturan patojenin tohumlardan aranması ve tohum uygulamaları hakkında yapılan önceki çalışmalara yer verilmiştir.

2.1. *Acidovorax citrulli*'nin Üretim Materyalinden Aranmasıyla İlgili Çalışmalar

Assouline ve ark., (1997) ABD'den 1992-1994 yılları arasında İsrail'e ithal edilen karpuz tohumlarında *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*'nin varlığını saptamıştır. Ayrıca 1997 yılında Hindistan'dan ithal edilen karpuz, hıyar, domates ve

patlıcan tohumlarında *A. avenae* subsp. *citrulli*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Erwinia* sp. ve Tobacco Mosaic Tobamo Virus'ün varlığı tespit edilmiştir. Bu çalışma domates tohumlarıyla *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*'nin taşındığını gösteren ilk çalışma niteliğindedir.

Walcott ve Gitaitis (2000) karpuz tohumlarından *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*'nin varlığının saptanmasında immuno-magnetic-separation ve polimeraz zincir reaksiyonuna (IMS-PCR) dayalı yeni bir yöntem geliştirmişlerdir. IMS-PCR yöntemi, besi yerine bakteri ekiminden 10 kat daha duyarlı bulunmuştur. *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*'nin 16S rRNA bölgesini kodlayan genlerden üretilen PCR primerleri kullanılarak yapılan IMS-PCR'ın, duyarlılığı klasik PCR'a göre 100 kat daha duyarlı bulunmuştur. Tohumlardaki bitki parçaları IMS'in etkinliğini azaltırken IMS-PCR'ın tohumdaki engelleyici maddelerden etkilenmemesi bir avantaj olarak değerlendirilmiştir. Bu yöntemle bir ml'deki 10 adet patojen bakteri saptanabilirken 1000 adet tohumun sadece 1 tanesi patojenle bulaşık olduğunda o tohum partisinde bakterinin varlığı IMS-PCR yöntemiyle belirlenebilmiştir.

Muñoz ve Monterroso (2002) Nikaragua'da 1997 yılında karpuz meyvelerinde bir hastalık tespit etmişler ve etmeni *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* olarak tanılamışlardır. Bu etmen ülkede ilk defa saptamış ve ülkeye girişinin Kostarika'dan bir tohum firmasından ithal edilen bulaşık tohumlar vasıtasıyla olduğunu bildirmişlerdir. Tarım Bakanlığı Bitki Koruma servisi bulaşık bu tohumları kullanmamaları konusunda üretici ve tohum satıcılarını uyarmıştır.

Walcott ve ark., (2003) karpuzun çiçeklenme evresinde *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*'nin çiçeğe bulaştığında, o bitkiden elde edilen tohumlardaki patojenin, bulaşıklılık oranını belirlemeyi amaçladıkları çalışmalarında, tohumda bakteriyi saptarken immuno-magnetic-separation ve PCR'ı (IMS-PCR) birlikte kullanmışlardır. IMS-PCR ile, bulaşık tohum partilerinin %44'ünde patojen saptanırken, fidede belirti izleme yönteminde sadece %27'sinde patojenin varlığı saptanmıştır. Moleküler yöntemlerin kombine edilerek kullanıldığı durumda testlemeler daha duyarlı olmaktadır.

Sundstrom ve ark., (2003) ticari tarlalarda çeşitli hastalıkların azaltılması veya yok edilmesinde hastalıksız tohum kullanımının en önemli adım olduğunu

bildirmiş ve Kaliforniya'da hastalıksız tohum eldesinde gereken programı, Kaliforniya Ürün Geliştirme Birliği adına bu makalede tartışmışlardır. Kaliforniya Ürün Geliştirme Birliği, yeni çeşitlerin geliştirilmesi, tohum üretimi ve dağıtımında rol oynayan tohum endüstrisine katkı sağlamak için oluşturulmuş bir birliktir. Kabakgil tohumlarındaki *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* bulaşıklılığını yok etmek veya azaltmak için hibrit tohum eldesinde izlenmesi gereken program dahilinde, tohum üretimi yapılan tarlalarda inspektörler tarafından tarla incelemelerinin dikkatlice yapılması gerektiğini belirtmişlerdir. Ayrıca her bir hibrit tohum partisinden en azından 30.000 adet fidenin hastalık yönünden testlenmesi gerektiğini vurgulamışlardır.

Ren ve ark., (2004) kavun tohumlarını su ve PBST içerisinde çalkaladıktan sonra elde edilen pellettden DNA'yı izole edip *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*'ye spesifik primerle PCR çalışmaları yapmışlardır. Bu yöntemle Çin Halk Cumhuriyeti'nde marketlerden satın alınan 11 kavun çeşidinden 8'inde patojen bakterinin varlığını tespit etmişlerdir.

Ren ve ark., (2006) Çin Halk Cumhuriyeti'nin Xinjiang bölgesinde 2003-2005 yılları arasında karpuz yetiştirilen alanlarda bakteriyel meyve lekesi hastalığının büyük ekonomik kayıplar oluşturduğunu ve hastalığın sadece meyvede değil aynı zamanda fide döneminde de problem olduğunu bildirmişlerdir. Bu yörede yetiştirilen çerezlik karpuz tohumlarını toplamışlar ve bu tohumlardan etmeni izole etmişlerdir. Bu çalışma, çerezlik karpuz tohumlarında *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*'nin izole edildiğini gösteren ilk araştırma niteliğindedir.

Zhao ve ark., (2006) kabakgil tohumlarından *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*'nin saptanmasında fluoridion seçiciliği olan elektrot yöntemiyle klasik PCR'ın kombinasyonunu içeren yeni bir yöntem olarak immuno-capture PCR (IC-PCR)'ı geliştirmişlerdir. Bu yeni yöntemi klasik PCR'la karşılaştırdıklarında IC-PCR ml'de 50-100 adet bakteri hücresini saptarken klasik PCR ml'de 10.000 adet bakteri hücresi saptamıştır. IC-PCR yöntemi 100 kat daha duyarlı olarak belirlenmiştir. Bu yeni yöntemle, Çin Halk Cumhuriyeti'nde yedi tohum partisinden beşini (bir kantalop kavun, iki bal kavun, iki karpuz tohum partisi) *Acidovorax avenae* subsp.

citrulli ile bulaşık olarak saptamışlardır. Bu sonuçlara göre IC-PCR'ın doğru, duyarlı, hızlı ve düşük maliyetli olduğu belirlenmiştir.

Walcott ve ark., (2006) *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*'nin tohumlardan saptanması için serolojik bir test olan immuno-magnetic-separation (IMS) ile moleküler bir test olan PCR'ın kobinasyonuyla daha duyarlı bir yöntem olarak IMS-PCR'ı geliştirmişlerdir. IMS-PCR yöntemiyle fidede belirti izleme yöntemi karşılaştırıldığında IMS-PCR çok daha duyarlı olarak saptanmıştır. 10.000 adet patojenle bulaşık tohumla yapılan çalışmada IMS-PCR ile patojenin varlığını belirleme oranı %87.5 iken fidede belirti izleme testinde bu oran %37.5 olarak belirlenmiştir. Yeni geliştirilen bu yöntem, karpuz tohum lotlarının incelenmesi aşamasında fidede belirti izleme yöntemine göre önemli bir alternatif olarak değerlendirilmiştir.

Bahar ve ark., (2008) *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*'nin kavun ve karpuz tohumlardan saptanmasında PCR'a dayalı bir yöntem araştırmışlardır. Dizayn ettikleri primerle 5000 adet kavun veya karpuz tohumundan sadece 1'i bu patojenle bulaştırıldığında (%0.02 oranında) kullanılan yöntemle patojenin varlığı tohumlarda saptanmıştır. Immuno-magnetic-separation ile moleküler bir test olan PCR'ın kobinasyonuyla oluşturulan bu yeni yöntemin (IMS-PCR), patojenin tohum çalkalama sıvısından son derece uygun, hızlı, duyarlı ve spesifik olarak saptandığı belirtilmiştir.

Xu ve ark., (2008) Çin Halk Cumhuriyeti'nde Zhejiang marketlerinden 18 farklı ticari kavun örneğinden 23 tohum partisi toplamış ve topladıkları bu tohumları 5 farklı solüsyonda çalkaladıktan sonra immuno-capture-polymerase chain reaction (IC-PCR) ile *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*'nin varlığı yönünden incelemişlerdir. En başarılı çalkalama solüsyonu olarak, Morpholinol-Ethanesulfonicasit (MOPS) solüsyonunu belirlemişlerdir. Toplanan kavun tohumları içerisinde Zhemi-4, Zaojia 84-24 ve Shoushanwang çeşitlerinde *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*'nin varlığını saptamışlardır. Tohum kabuğunda yaşayan bu patojenin karantina işlemleri olarak dikkat edilecek en önemli noktanın, sağlıklı tohumlara ve hastalıksız alanlara bu bulaşık tohumlardan olabilecek bulaşmaların önlenmesi olduğunu belirtmişlerdir.

Ha ve ark., (2009) kabakgil tohumlarından bakteriyel patojen *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* ve fungal patojen *Didymella bryoniae*'nin saptanmasında kullanılabilecek magnetic-capture-hybridization (MCH) ve real-time PCR'a dayalı "MCH multiplex real-time PCR" olarak adlandırılan yeni bir yöntem geliştirmişlerdir. Bu yöntemde aynı tohum partisinde iki patojeni ararken ayrı ayrı işlem yapmak yerine, tek bir işlemde her iki patojenin de varlığının belirlenmesi amaçlanmıştır. MCH multiplex real-time PCR yöntemi, ml'de sadece 10 adet ($1x10^1$) *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* bakteri hücresini ve *Didymella bryoniae*'nin 10^5 adet konidiosporunun varlığını belirleyecek duyarlılıktadır. Bu yöntem real-time PCR'a göre 10 kat daha duyarlı bir yöntemdir. MCH multiplex real-time PCR ile 10.000 adet kavun veya karpuz tohumunda sadece 2 tanesi *A. avenae* subsp. *citrulli* ile bulaşık olması durumunda patojeni saptayabilecek duyarlılıktadır.

Zhao ve ark., (2009) kavun ve karpuz tohumlarından *Acidovorax citrulli*'nin varlığının saptanmasında yarı seçici besi yerine (EBB ve EBBA) ekim ve real-time PCR'a dayalı bir "real-time BIO-PCR" yöntemi geliştirmişlerdir. Tohumlar parçalandıktan sonra Vancomycin içeren bir tohum ekstraksiyon sıvısında çalkalanmış ve seyreltme serileri, yarı seçici besi yeri olan EBB ve EBBA besi yerlerine ekilmiştir. Besi yerinde gelişen bakteri kolonileri toplanarak real-time PCR işlemleri uygulanmıştır. Sadece canlı bakteri hücrelerinin reaksiyon oluşturduğu PCR işlemi olan real-time BIO-PCR ile ml'deki tek bir *Acidovorax citrulli* hücresi pozitif olarak saptanmıştır. Real-time PCR'ın klasik PCR'a göre daha duyarlı oluşu, tohum ekstraksiyon sıvısına saprofit bakterileri uzaklaştıran antibiyotiğin eklenmesi, seyreltme serilerinin yarı seçici besi yerine ekimi ve sadece canlı bakterilerin real-time PCR'da pozitif sonuç vermesi, bu yöntemin öne çıkan avantajları olarak sıralanabilir.

Himananto ve ark., (2011) *Acidovorax citrulli*'ye spesifik olan monoklonal bir antiserum üretmişlerdir. Bu monoklonal antiserum, daha genel olan ve farklı türlere karşı reaksiyona girme olasılığı olan poliklonal antiseruma göre 10 kat daha duyarlı olarak belirlenmiştir. Bu monoklonal antiserumun kullanıldığı ELISA testinde, patojeni saptama limitinin 5×10^4 hücre/ml olduğu bildirilmiştir. *Acidovorax citrulli* ile bulaşık olduğu şüphelenilen kabakgil yaprak, meyve ve tohum

örneklerinde bu monoklonal antiserumun kullanılarak yapılan ELISA testinde olumlu sonuçlar alınmış ve tarla incelemelerinde kullanımı önerilmiştir.

Zhao ve ark., (2011) *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*'nin hızlı ve güvenilir olarak karışık popülasyonlardan saptanmasında, nanopartikül altın ile işaretlenmiş oligonükleotid bir prop geliştirmişlerdir. Nanopartikül altın ile işaretlenmiş DNA sensörlerinin kullanımıyla *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*'nin genomik DNA'sı başka hiç bir işlem yapmaksızın saptanmıştır. Araştırıcılar geliştirilen bu DNA sensörü patojenin saptanmasında gelecekte pek çok laboratuvarda kullanılabileceğini savunmuşlardır.

Kubota ve ark., (2011) kabakgil tohumlarında *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*'nin bulaşıklılık %'sini belirlemek için bir yöntem geliştirmişlerdir. Tohumlar test tüplerinde iki hafta gelişmeye bırakılır, bakteri tohum ve fide üzerinde çoğalır, bitkiler su içinde çalkalandıktan sonra süspanse edilen bakteriler yarı seçici besi yerine ekilir. Bu yöntem yaygın olan fidede belirti izleme yöntemine göre daha duyarlıdır. Bu yöntemle tohumdaki bulaşık tohum sayısını saptamada uygunken, ticari tohum partilerinde patojenin varlığının belirlenmesinde uygun bir yöntem değildir.

Wang ve ark., (2011) karpuz tohumlarından *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*'nin varlığını saptarken, tohumda düşük popülasyonda bulunan bakteriyi öncelikle farklı sıvıda zenginleştirmiş ve ardından PCR yaparak etmenin varlığını saptamışlardır. Dört farklı zenginleştirilmiş sıvının (Biological-Preparation, Membrane-Filtration, Immune-Magnetic-Separation ve Immune-Capture-Preparation) etkisi karşılaştırarak, en düşük bakteriyi saptayan yöntemi belirlemişlerdir. En iyi sonuç, 10^2 hücre/ml popülasyonu belirleyebilen immune-capture PCR'da elde edilmiştir. Immune-magnetic-separation PCR'a göre immune-capture PCR'ın 10 kat daha duyarlı olduğu belirlenmiştir. Bu çalışma sonucunda, karpuz tohumlarında bu patojenin varlığının belirlenmesinde immune-capture PCR'ın diğer yöntemlere göre duyarlı, spesifik, hızlı ve ekonomik bir yöntem olduğu belirlenmiştir.

Zhang ve ark., (2012) karpuz tohumlarından *Acidovorax citrulli*'nin saptanmasında rutin kullanılan serolojik ve moleküler testlere alternatif olarak cross-

priming amplification (CPA) yönteminin duyarlılığını araştırmışlardır. Patojenin bu yöntemle saptanma limitini $3.7x10^3$ hücre/ml olarak bildirmişlerdir.

Dutta ve ark., (2012a) *Acidovorax citrulli*'nin tohumun iç kısmına yerleşebilmesi için, karpuzun çiçeklenme evresinde stigmadan pistil aracılığıyla bulaşırken izlediği yollar ve patojenin tohum embiryosuna yerleşmesine etki eden faktörler incelenmiştir. Karpuz tohumları bakteri süspansiyonuna batırıldığında kabuğun kaygan oluşunun, bir bariyer olarak görev yaptığını belirlemişlerdir. Ayrıca, suni inokulasyonlarda, bakteri bulaşmasına karşın tohum perisperm (tohumun dış besi dokusu) ve endospermi (tohumun embriyo hariç içini dolduran nişastalı kısmı) de aynı görevi görmektedir. Ancak patojen doğal olarak karpuzun çiçeklenme evresinde stigmadan pistil aracılığıyla bulaştığında tohum embriyosuna rahatlıkla yerleşebilmiştir. Çiçeğin perikarp kısmından patojen bulaştığında ise tohum kabuğuna yerleşebildiği belirlenmiştir. Bu çalışmada elde edilen sonuçlara göre tohum sağlık testlerinde tohum örneğinin hazırlanması ve suni inokulasyonlarda patojenin bulaştırılma yolları değerlendirilerek seçilecek yöntemler belirlenmelidir.

Dutta ve ark., (2012b) *Acidovorax citrulli*'nin tohumda bulunduğu yerin, tohum sağlık testlerinde patojenin saptanmasına etkisinin olup olmadığını araştırmışlardır. Patojen, karpuza stigmadan pistil inokulasyonu veya ovaryumdan perikarp inokulasyonu yapılarak bulaştırılmıştır. Bu meyvelerden elde edilen tohumlar, parçalanmadan tüm halde ve parçalandıktan sonra ekstraksiyon sıvısında çalkalanarak, tohumdaki etmenin varlığı seçici besi yerine ekim ve quantitative real-time PCR ile araştırılmıştır. Patojen, karpuza stigmadan pistil inokulasyonu sonucu bulaşmışsa tohum embriyosuna yerleşmiştir. Patojen, karpuza ovaryumdan perikarp inokulasyonu sonucu bulaşmışsa tohum kabuğuna yerleşmiştir. Pistil inokulasyonu sonucu embriyoya yerleşen bakteriyi ararken, tohum tüm olarak kullanıldığında patojenin varlığı belirlenememişken, tohum parçalanarak kullanıldığında tohumdaki patojen bakterinin varlığı saptanmıştır. Perikarp inokulasyonu sonucu tohum kabuğuna bulaşmış bakteri, her iki yolla (tohum tüm olarak veya parçalanarak) ekstrakte edildiğinde tohumda patojenin varlığı belirlenebilmiştir. Bu çalışma, tohum sağlık testlerinde tohumun tüm veya parçalanarak kullanılması, tohumda bakterinin yaşamını sürdürdüğü yere göre farklı sonuç vermektedir. Bu nedenle, karantina

laboratuvarlarında gelen tohum örneklerinin inceleme aşamasında tohumun parçalanması patojenin varlığını belirlemede avantaj olacaktır.

Dutta ve ark., (2012c) *Acidovorax citrulli*'nin farklı popülasyonlarıyla karpuz tohumlarını bulaştırmış ve immuno-magnetic-separation ile real time polimeraz zincir reaksiyonuyla (IMS-real time PCR) patojeni aradığında, tohum lotunda etmenin saptanma oranını ortaya koymuştur. Sonuçlarını karşılaştırmak için aynı oranda bulaşık tohumları ekerek fidede belirti izleme testiyle hasta bitki oranını belirlemiştir. 10.000 karpuz tohumu içine sadece 1 tane patojenin farklı popülasyonuyla (10^1, 10^3, 10^5 ve 10^7 hücre/ml), bulaşık tohum karıştırmıştır. Çalışma 128 karpuz tohum lotuyla yapılmıştır. Fidede belirti izleme testine göre, 10^7 hücre/ml popülasyonuyla bulaşık tohumun bulunduğu 128 tohum lotunun tümünde etmen saptanırken, 10^5 hücre/ml popülasyonunda bu oran %96.6 olarak saptanmıştır. Bakteri popülasyonu 10^3 ve 10^1 hücre/ml'e düştüğünde patojen, 128 tohum lotunun %46.6 ve %16.7'sinde saptanmıştır. Patojenin farklı popülasyonuyla bulaşık tohum lotlarından IMS-real time PCR ile yapılan incelemelerde, 10^7 ve 10^5 hücre/ml popülasyonuyla bulaşık tohumun bulunduğu 128 tohum lotunun tümünde etmen saptanmıştır. Bakteri popülasyonu 10^3 ve 10^1 hücre/ml'e düştüğünde patojen, 128 tohum lotunun %75 ve %16.7'sinde saptanmıştır. Sonuç olarak tohumdaki bulaşıklılığı saptamada fidede belirti izleme yöntemine göre IMS-real time PCR yönteminin daha duyarlı ve hızlı olduğu bildirilmiştir.

Dutta ve ark., (2013) yaptıkları çalışmada, börülce, biber, domates, karpuz ve mısır tohumlarında doğal olarak bulaşık olan beş farklı tohumla taşınan patojenin (*Xanthomonas axonopodis* pv. *vignicola*, *Xanthomonas euvesicatoria, Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis, Acidovorax citrulli* ve *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii)* hastalık oluşturması için gerekli popülasyonun matematiksel formülünü geliştirmeyi amaçlamışlardır. 30 adet patojenle bulaşık tohumda bakteri popülasyonunun 10 ile 4.1×10^8 hücre arasında değiştiğini, yarı seçici besi yerine ekim ve ELISA testiyle saptamıştır. Sonuçta çok farklı popülasyon miktarının oluşu nedeniyle, tohum sağlık testlerinde örneklemede kullanılacak tohum miktarı ve istatistiki analiz yöntemleri de her tohum türüne göre farklı olmak durumunda olduğunu bildirmişlerdir.

Thaitrong ve ark., (2013) karpuz bitkilerinde bakteriyel etmen *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*'nin ve iki adet viral etmenin (watermelon silver mottle virüs, melon yellow spot virüs) birlikte saptanmasında microfluidic sandwich ELISA yöntemini kullanmışlar ve bu yöntemin klasik ELISA'ya göre zaman olarak yarı yarıya daha kısa, maliyet olarak %65 daha ucuz ve duyarlılık olarak *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* için 12.5 kat daha duyarlı olduğunu bildirmişlerdir.

Charlermroj ve ark., (2013) karpuz bitkilerinde bakteriyel etmen *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*'nin ve üç adet viral etmenin (chilli vein-banding mottle virüs, watermelon silver mottle virüs, melon yellow spot virüs) birlikte saptanmasında, microsphere immunoassay teknolojisini kullanarak multiplex ELISA testini kullanmışlardır. ELISA testinde tanı süresi 4 saat iken, R-phycoerythrin ile işaretli antibadi kullandığında bu süre bir saate düşmüştür. Bu yöntem şimdilik doğal bulaşık karpuz bitkilerinde kullanılmış olsa da gelecekte tohumdan patojenlerin saptanmasında kullanılabileceği bildirilmiştir.

Tian ve ark., (2013a) Çin Halk Cumhuriyeti'nin Anhui bölgesinde 2012 yılının temmuz ayında kabak anacı üzerine aşılı karpuz bitkilerinde *Acidovorax citrulli*'nin neden olduğu hastalık belirtilerine benzer fide yanıklıkları tespit etmişler. Karpuz tohumlarını üreten firma, kalem olarak kullanılan karpuz tohumlarının sağlık sertifikasına sahip olduğunu, moleküler testlere dayalı yapılan tohum analizinde sağlıklı tespit edildiğini belgelemiştir. Ancak anaç olarak kullanılan kabak tohumlarında böyle bir analizin yapılmadığı belirlenmiştir. Anaç ve kalemin tohumları temin edilerek yeniden yapılan tohum analizinde, anaç olarak kullanılan kabak tohumlarında *Acidovorax citrulli*'nin varlığı tespit edilmiş ve TWZ yarı seçici besi yerine patojen izole edilmiştir. Ayrıca bu tohumlar ekilerek yapılan fidede belirti izleme testinde gelişen fidelerin kotiledon yapraklarında tipik hastalık belirtileri tespit edilmiştir. Bu çalışma, anaç tohumlarının patojenle bulaşık olması halinde, aşı esnasında etmenin aşılı karpuz fidelerine taşındığını göstermiştir. Aşılı karpuz fidelerinde her iki tohumun da patojen yönünden incelenmesi gerektiği bu araştırmayla kanıtlanmıştır.

Tian ve ark., (2013b) kabakgil tohumlarından *Acidovorax citrulli*'nin saptanmasında 16S-23S internal transcribed spacer ribosomal DNA dizilimine

dayanan bir pad lock probe (PLP) geliştirmişlerdir. PLP ve dot-blot hibridizasyona dayanan bu yöntem, 1000 adet tohumdan sadece biri patojenle bulaşık olduğunda saptayacak duyarlılıktadır. Çin Halk Cumhuriyeti'nin Xinjiang ve Ningxia bölgelerinden topladıkları 8 kavun lotundan biri, 47 karpuz lotundan 5'i *Acidovorax citrulli* ile bulaşık bulunmuştur. PLP ve dot-blot hibridizasyona dayanan bu teknik, tohum sağlık testlerinde PCR'a göre daha duyarlı olarak belirlenmiştir.

Feng ve ark., (2013) kabakgil tohumlarından *Acidovorax citrulli*'nin saptanmasında bugüne kadar kullanılan yöntemlerin karşılaştırmasını yaptığı derlemede, genel ve yarı seçici besi yerinin, fidede belirti izleme, serolojik teknikler (immuno-izolasyon, immuno-strip, MFIS, immuno-sensor) ve moleküler tekniklerin (klasik PCR, BIO-PCR, IMC-PCR, IMS-PCR, MCH-PCR, EMA-PCR, Real time PCR) etki durumunu değerlendirmişlerdir. BIO-PCR, IMC-PCR, IMS-PCR, MCH-PCR, Real time PCR'ı en etkili yöntemler olarak bildirmişlerdir.

Erfen ve ark., (2014) simptomsuz karpuz fidelerinden patojenin epifitik bulaşmalarının saptanmasında kullanılabilecek genel ve yarı seçici besi yerlerini araştırmışlardır. Denemede beş adet genel besi yeri (Nutrient Agar, King B, Yeast Extract Calcium Carbonate Agar, Tryticase Soy Agar ve Nutrient Broth Yeast Sucrose Agar) ve yedi adet yarı seçici besi yeri (WFB 08, WFB 44, WFB 68, EBBA, mEBB, PYDAC VE P-278) kullanılmıştır. Sonuç olarak araştırıcılar temiz bir popülasyondan *Acidovorax citrullii* izolasyonu yapılacaksa genel besi yerinden King B ve Tryticase Soy Agar besi yerini, karışık popülasyonlardan izolasyonda ise yarı seçici besi yerinden P-278, EBBA veya mEBB kullanımını önermişlerdir.

2.2. Tohum Uygulamalarıyla İlgili Çalışmalar

Rane ve Latin (1992), *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli* adlı bakteriyel etmenin neden olduğu karpuz bakteriyel meyve leke hastalığında tohum-patojen arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. Doğal bulaşık ve laboratuar ortamında suni olarak patojenle bulaştırılmış tohumları 20 dakika %0.525'lik NaOCl'ye, 20 dakika 50°C'deki sıcak suya ve 5 dakika %1.8'lik HCl'e daldırmışlardır. Bu uygulamasının patojeni azalttığı fakat tamamen eradike etmediğini bildirmiştir.

Doğal olarak patojenle bulaşık tohumlara yapılan uygulamada daha az başarı elde edilirken, laboratuar şartlarında suni olarak bulaştırılan tohumlara yapılan uygulamada daha fazla başarı elde edilmiştir. Bu durum patojenin tohuma yerleştiği yerle ilgili olabileceği düşünülmüştür. Doğal ve suni olarak bakteriyle bulaştırılmış tohumların, kabuğundan ve embriyodan patojen tekrar izole edilmiştir.

Hopkins ve ark., (1996) karpuzda bakteriyel meyve lekesi hastalığının mücadelesinde tohum uygulamalarının etkisini araştırmışlardır. *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*'nin hasta karpuz meyvelerinden tohumlara doğru ilerlediği ve tohumları bulaştırdığını, hasta meyvelerin yakınında bulunan sağlıklı görülen meyvelerin tohumlarına da patojenin bulaşabileceğini belirtmişlerdir. Tohumlar 12^oC'de 12 ay bekletilseler bile popülasyonlarında pek azalma tespit etmemişlerdir. Tohumlar karpuz suyuyla fermentasyona bırakılıp ardından bitki artıkları yıkanıp kurutulduğunda simptomlu meyveden alınan tohumlardaki bulaşıklılık oranı %61'den %1'e düşmüştür. Tohumların %1'lik $CaOCl_2$'de 15 dakika bekletilmesi etkili bir uygulama olamamıştır. Tohumların %1'lik HCl'e 15 dakika daldırılması fermentasyon yöntemi kadar başarılı olmuştur. Karpuz tohumlarından bakteriyel bulaşıklığın yok edilmesinde en başarılı uygulamanın 24-48 saat fermentasyon ardından %1'lik HCl'e veya %1'lik $CaOCl_2$'e 15 dakika daldırılması olduğunu bildirmişlerdir. İki farklı yöntemin kombinasyonunun kullanılması tohum çimlenmesine olumsuz bir etki yapmamıştır.

Nomura ve Shirakawa (2001) karpuz tohumlarında *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*'nin bulaşıklığını yok etmek için tohum uygulaması olarak sıcak su ve bakterisitlerin etkisini araştırmışlardır. Uygulama görmüş tohumlar ekilerek gelişen fidelerdeki hastalık çıkışına göre tohum uygulamalarının etkinliğini değerlendirmişlerdir. Bulaşık tohumların 54-56°C'deki sıcak suya 10-30 dakika daldırılmaları hastalık çıkışını azaltmış ancak tohumdaki patojen bakteri popülasyonunu tamamen yok etmemiştir. Benzer şekilde kimyasal tohum uygulamaları içerisinde antibiyotikler bakırlı bileşiklere göre daha etkili bulunurken tohumdaki bakteri bulaşıklığı tamamen yok olmamıştır. Kısa süre yüksek konsantrasyona tohumları daldırmak yerine düşük kimyasal içeriğinde uzun süre tohumları bekletmenin daha başarılı sonuçlar verdiği saptanmıştır.

Zhao ve ark., (2003) *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*'nin mücadelesinde kavun tohumlarından yok edilmesinde kimyasal (sodyum hipoklorit, bakır oksiklorür ve streptomisin) tohum uygulamalarının etkisini araştırmışlardır. Çalışma sonunda %3'lük sodyum hipoklorite ile tohumları 15 dakika daldırma, %47'lik bakır oksiklorürde bir gece bekletme ve streptomisin uygulamaları başarılı bulunmuştur. %47'lik bakır oksiklorürde bir gece bekletmeyi en başarılı uygulama olarak bildirilmiştir.

Hopkins ve ark., (2003) karpuz tohumlarında tohum kökenli olarak yaşamını sürdüren fungal ve bakteriyel hastalık etmenlerinin mücadelesinde peroksi asetik asitin etkisini araştırmışlardır. Yapılan bu çalışmada peroksiasetik asit düşük konsantrasyonda *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli, Fusarium oxysporum* ve *Didymella bryoniae'*ye etkili bulunmuştur. Karpuz tohumları 1600 µg/ml dozunda hazırlanan peroksi asetik asit içine 30 dakika daldırıldığında tohumdaki *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* ve *Didymella bryoniae'*ye karşı etkili tohum uygulaması olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca 10.000 µg/ml dozunda hazırlanan hidroklorik asit uygulaması patojenleri engellemede etkiliyken tohumun çimlenmesini azaltmıştır. Sonuç olarak, en etkili uygulamanın karpuz tohumlarını 1600 µg/ml dozunda hazırlanan peroksi asetik asit içine 30 dakika bekletip ardından 40°C'deki fırında 48 saat tohumları kurutma olduğu bildirilmiştir.

Lovic ve Hopkins (2003) kabakgil tohumluğu üretiminde tohum kökenli hastalık etmenlerinin tohuma bulaşmasını önlemek için tarla döneminde pek çok önlemin (koruyucu ilaçlamalar, hastalığın risk analizinin yapılması, tarla evresinde izleme) alınması gerektiğini bildirmişlerdir. En büyük risk faktörünün, hasat zamanına gelmiş tarlalarda sağlıklı görülen ancak patojenle bulaşık meyvelerden elde edilen bulaşık tohumlar olduğunu belirtmişlerdir. Tohumlar fermentasyon işleminden sonra kurutulduğunda tohumdaki *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* popülasyonun büyük oranda azaldığı belirtmişlerdir. Tohumlar kurumadan önce bir dezenfektana batırılarak yapılan tohum uygulamalarında başarı şansının azaldığını vurgulamışlardır. Tek bir tohum uygulaması yerine birkaç uygulamayı kombine ederek kullanmanın başarıyı artıracağına dikkat çekmişlerdir.

Fessehaie ve Walcott (2005) karpuz tohumlarından izole ettikleri farklı antagonistleri (*Pseudomonas fluorescens* A506, *Acidovorax avenae* subp. *avenae* AAA 99-2 ve tanılanmamış gram pozitif bir bakteri WS-1) karpuz bakteriyel meyve lekesi hastalığının biyolojik mücadelesinde tohum uygulaması olarak kullanmışlardır. Tohum uygulaması olarak AAA 99-2 kodlu antagonist kullanıldığında fidelerde hastalık çıkışı % 96.5 oranında engellenmiştir. Ayrıca bu antagonistler karpuzun çiçeklenme döneminde çiçeğe püskürtülmüş ve elde edilen tohumlardaki patojenle bulaşma durumları araştırılmıştır. AAA 99-2 kodlu antagonist çiçeğe püskürtüldüğünde tohum lotundaki bulaşma oranı sadece %13.8 olmuştur. Bu çalışma başarılı bir hastalık yönetiminde, antagonistlerin sadece tohuma değil çiçeklere de püskürtülmesinin sağlıklı tohum elde etmede önemli olduğunun kanıtıdır.

Hopkins ve Thompson (2006) karpuz fidesi yetiştirilen ticari fideliklere ve karpuz meyvesi yetiştirilen tarlalara *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*'nin, ilk bulaşma yolunun bulaşık tohumlar olduğunu bildirmiş ve bu bulaşıklılığı önlemek için sıcak su (55^oC'de 2 saat ve 60^oC'de 1 saat), peroksi asetik asit, hidroklorik asit ve asetik asitin etkisini araştırmışlardır. Tohuma hidroklorik asit uygulaması etkili olmasına rağmen tohum kalitesini bozduğu için önerilen bir yöntem olarak bildirilmemiştir. Benzer şekilde 60^oC'de 1 saat tohumların bekletilmesi patojeni elimine ederken tohumun çimlenmesini azaltmıştır. Fermentasyon bakterileri olan *Lactobacillus brevis* ve *Lactobacillus plantarum* eklenerek 16-24 saat yapılan doğal fermentasyon yöntemi genel olarak etkili olsa da tüm tohum partisinde başarılı olamamıştır. Kısa süreli fermentasyon başarılı bulunmazken triploid tohum kalitesine de etkisi bilinmemektedir.

Oliveira ve ark., (2006) hastalık belirtisi göstermeyen kavun bitkilerinden epifitik ve endofitik 96 bakteri izolatıyla, 69 endofitik fungus izolatını elde etmiş ve bunların sera koşullarında tohum uygulaması olarak meyve lekesi hastalığına etkisini araştırmışlardır. Bu aday antagonistler arasında tanılanamayan bir tür ve beş adet *Bacillus* izolatı hastalıkla mücadelede başarılı bulunmuştur. Bu antagonistlerin tümü istatistiki olarak kontrolden farklı bir grupta yer almış ve iki antagonist izolat tohum uygulaması olarak kullanıldığında %93.6 oranında hastalık şiddetini azaltmıştır.

Feng ve ark., (2007) $KMnO_4$, $CuSO_4$ and $ZnSO_4$ solüsyonlarıyla tohuma yaptıkları priming uygulamasının, triploid karpuz tohumlarında (Hemi No.2 çeşidi) bulunan *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*'nin dezenfeksiyonundaki etkisini ve tohumların çimlenme yeteneğindeki etkisini araştırmışlardır. $KMnO_4$ uygulamasından başarı elde edilemezken tohumlar %0.1'lik $CuSO_3$ solüsyonuna 4 saat bandırıldığında çimlenme oranı %71.1 oranında artış göstermiştir. Tohumlar %0.2'lik $ZnSO_4$ solüsyonunda 24 saat bekletildiğinde çimlenmedeki artış %73.3 olmuştur. Uygulama görmüş ve görmemiş tohumlarda patojen bakterinin varlığı immuno-strip ve klasik PCR ile araştırılmıştır. $CuSO_4$ ve $ZnSO_4$ solüsyonlarıyla uygulama görmüş tohumlarda, patojen tespit edilememiştir.

Feng ve ark., (2009) kavun ve karpuz tohumlarından *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*'nin eradikasyonunda farklı tohum uygulamalarının etkisini araştırmışlardır. Tohumlar asidik su içindeyken 30 dakika elektrik uygulanmış, 50^oC'deki sodyum hipo klorit içine 20 dakika veya asidiye edilmiş 50^oC'deki bakır asetat içine 20 dakika bandırılmıştır. Bu uygulamaların tümü farklı oranlarda tohumdaki patojeni eradike etmiştir.

Wang ve ark., (2011) karpuz tohumlarından *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*'nin biyolojik mücadelesinde *Pichia anomala* adlı mayayı tohum uygulaması olarak kullandıklarında streptomisin sülfat ve hidroklorik asit kadar etkili bulmuşlardır. Tohuma antagonist maya uygulaması fidelerdeki hastalık çıkışını %96 oranında engellerken, hidroklorik asit uygulaması %97, streptomisin sülfat uygulaması da %94 oranında hastalık çıkışını baskılamıştır.

Johnson ve ark., (2011) tohumda bulunan *Acidovorax citrulli* popülasyonunu azaltmak veya yok etmek için patojenik olamayan bir *Acidovorax citrulli* izolatını tohuma uygulamışlar ve fidelerde hastalık gelişimi %81.8 oranında azalmıştır. Bu izolatın gelecekte bakteriyel meyve lekesi hastalığının yönetiminde biyolojik tohum uygulaması olarak kullanılabileceği gösterilmiştir.

Elizalde Jiménez ve ark., (2011) Meksika için bir karantina etmeni olan *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*'nin ticari fideliklerde %100'e varan ürün kayıpları ve tarla döneminde büyük zarar oluşturması göze alındığında, Meksika'ya giren karpuz tohumlarındaki risk durumu değerlendirilmiştir. İklim koşullarının patojen

için uygun olduğu Mayıs ve Haziran aylarında duyarlı çeşit yetiştirildiğinde Yucatan, QuintanaRoo, Campeche, Tabasco ve Southern Veracruz yöresinde hastalık riskinin yüksek olduğu bildirilmiştir. Meksika'nın Sinaloa, Durango, Zacatecas, Mexico, Hidalgo, Queretaro, Michoacan, Guanajuato, Tlaxcala ve Puebla yöresinde hastalık riskinin daha az olduğu belirlenmiştir. Tohumlara peroksi asetik asit uygulamasının hastalık çıkışını azaltmak için başarılı bir tohum uygulaması olduğunu bildirmişlerdir.

Zhang ve ark., (2012) *Acidovorax citrulli* ile bulaşık olduğunu buldukları *Cucurbita pepo* tohumlarındaki patojeni yok edebilmek için tohum uygulaması olarak $CuSO_4$, toz haldeki ev dezenfektanı, HCl, peroksi asetik asit, streptomisin, doksicycline ve kuru sıcak havayı kullanmışlardır. Tohumların 80°C'de 48 saat bekletilmesinin etkisiz bir uygulama olduğunu bildirmişlerdir. Tohumların bakır sülfat ve dezenfektanlara (%0.5'lik hipoya 5 dakika) batırılmasının en etkili uygulama olduğunu saptamışlardır. Basit ve ucuz olan bu solüsyonların *Cucurbita pepo* tohum üretim aşamalarında kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Mengulluoglu ve Soylu (2012) sekiz farklı bitkiden ekstrakte edilen uçucu yağların *in vitro* koşullarda *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*'nin gelişimine etkisi araştırdıkları çalışmada, *Thymbra spicata* ve *Origanum majorana* uçucu yağlarının başarılı uçucu yağlar olduğunu bildirmişlerdir. İki farklı kekik türü ekstaktından elde edilen uçucu yağların gelecekte tohum uygulaması olarak kullanma potansiyellerinin olduğunu bildirmişlerdir.

Kubota ve ark., (2012) Japonya'da kullanılan kavun, karpuz ve çerezlik kabak çeşitlerindeki *Acidovorax citrulli* bulaşıklığını yok etmek için kuru sıcak hava uygulamasının etkisini araştırmışlardır. 85°C'deki sıcak hava veren fırınlarda tohumlar 3-5 gün bekletildikten sonra ekilmiş ve gelişen fidelerdeki hastalık belirtileri izlenmiştir. En etkili tohum uygulamasının, tohumların 85°C'de 7 gün bekletilmesinde elde etmişlerdir. Bu uygulama tohumun çimlenmesine herhangi bir olumsuz etki yapmamıştır.

Kubota ve ark., (2013) kabakgil tohumlarından *Acidovorax citrulli*'yi yok etmek için tohum uygulaması olarak, farklı kimyasalları (askorbik asit, peroksi asetik asit, oksitetrasyklin, streptomisin ve $CuSO_4$) ve kuru sıcaklık uygulamasını kombine

ederek kullanmışlardır. Kavun, kabak ve çerezlik kabak tohumları oksitetrasıklin, streptomisin ve $CuSO_4$ karışımına 60 dakika daldırılıp tohumlar 75°C'de 4 gün kuru sıcaklık uygulamasına maruz bırakıldığında çimlenme yetenekleri azalmadan patojen yok olmuştur. Daha iri tohumlara sahip dev bal kabağı ve siyah renkli çerezlik kabak tohumları kimyasal karışımında 60 dakika bekletilip 80°C'de 4 gün kuru sıcaklıkta tohumlar kurutulduğunda patojen yok olmuştur ancak tohumun çimlenmesinde az oranda azalış tespit edilmiştir. Bu uygulamalar, küçük ve açık renkli kabakgil tohumlarının çimlenme gücünü azaltmıştır.

Song ve ark., (2013) altı farklı tohum uygulamasının tohum kökenli *Acidovorax citrulli*'nin neden olduğu bakteriyel leke hastalığına etkisini gelişen karpuz fidelerinde incelemişlerdir. Tohumlar fermentasyon öncesi oda sıcaklığında kurutulduktan sonra sıcak havayla muamele edildiğinde patojen tohumlarda yaşamaya devam etmiş ve gelişen fidelerde su emmiş lekeler gözlenmiştir. Tohumların bakterisite bandırılması ardından priming uygulaması olarak solüsyonda bekletilmesi başarılı bir uygulama olarak saptanmıştır.

Li ve ark., (2013) Çin Halk Cumhuriyeti'n 'de karpuz tohumlarında *Acidovorax citrulli* bulaşıklığını yok etmek veya azaltmak için tohum uygulaması olarak chitosan kullanmışlar. Chitosanın 0.40 mg ml^{-1} dozunda patojen gelişimini petride engellediği, tohum uygulaması olarak kullanıldığında gelişen fidelerde hastalık şiddetinin azaldığı, fidelerin yaş ve kuru ağırlığında artış olduğunu saptamışlardır. Chitosan solüsyonu tohum uygulaması olarak etkiliyken aynı dozda yeşil aksama uygulandığında aynı başarı elde edilememiştir.

Basım ve Basım (2014), *Acidovorax citrullii* izolatlarına karşı gül (*Rosa damascena* L.) yağının antibakteriyel etkisini ve tohum koruyucu olarak kullanımını araştırmışlardır. *Acidovorax citrullii* izolatlarına karşı gül yağının 50 µg/ml dozu en etkin antibakteriyel doz olarak bulunmuştur. Antibakteriyel etki *Thybra spicata* var. *spicata* (100 µg/ml) eterik yağı ve streptomycin (100 µg/ml) ile karşılaştırılmıştır. 50 µg/ml gül yağı ile muamele edilen karpuz tohumları *A. citrullii*'nin gelişimini tamamen engellemiştir. Karpuz tohumunun çimlenmesi üzerine gül yağının olumsuz bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir. Sonuç olarak gül yağının *Acidovorax citrullii*

izolatlarına karşı doğal bir tohum koruyucu olarak kullanılabileceği ortaya konmuştur.

Horuz ve Aysan (2014) tarafından karpuz bakteriyel meyve leke hastalığı etmeni *Acidovorax citrullii*'ye karşı tohum uygulaması olarak farklı antagonistlerin etkisi araştırılmıştır. Bu çalışmada sağlıklı karpuz yaprak ve çiçekleri ile topraktan 322 adet aday bakteriyel antagonist izole edilmiştir. *In vitro* çalışmalarında en etkili bulunan 14 adet bakteriyel antagonist seçilmiştir. Bu antagonistlerin karpuz bakteriyel meyve lekesi hastalığına tohum uygulaması olarak etkisi araştırılmıştır. Denemede 14 adet antagonist hastalık oluşumunu %6-94 oranında engellerken, fidelerdeki hastalık şiddetini %10-93 oranında azaltmıştır. Denemede yedi izolat (Antg-12, Antg-57, Antg-79, Antg-147, Antg-197, Antg-198 ve Antg-273) hastalık çıkışını %85 ve hastalık şiddetini %88'in üzerinde baskılayan başarılı izolatlar olarak değerlendirilmiştir. Yapılan bu çalışma tohum uygulamaları olarak antagonistlerin hastalığı azaltabileceğini ortaya koymuştur.

Farimaz ve ark., (2014) çeşitli bitki aktivatörleri ve ticari gübreler tohum uygulaması olarak kullanarak, karpuz bakteriyel meyve leke hastalığına etkisini araştırmışlardır. Bu hastalıkla mücadelede 12 adet preparatın (ISR 2000, Crop-Set, Stubble-Aid, Messenger, Peras INC-2, Biocrop L45, Biozyme TF, Seaweed, Reva Zinc, Streptomycin, Okey ve Peras) etkinliği araştırılmıştır. İklim odasında farklı dönemlerde yürütülen üç tohum denemesi sonucuna göre, Crop-Set hariç tüm preparatlar %15-58 oranında hastalığı baskılamıştır. Reva Zinc uygulaması hastalığı ortalama %58, Stubble-Aid uygulaması hastalığı ortalama %53 oranında engellemiştir. Karpuz bakteriyel meyve leke hastalığının mücadelesinde en etkili tohum uygulamasının Reva Zinc ve Stubble-Aid olduğu saptanmış ve bu iki preparat pratikte kullanılabilir olarak değerlendirilmiştir.

3. MATERYAL VE METOD

3. 1. Materyal

Patojen İzolatlar: Çalışmanın ana materyalini Adana, Antalya ve Osmaniye illerindeki tohumluk karpuz üretim alanlarından ve karpuz fideliklerinden izole edilen *Acidovorax citrulli*'nin bölge izolatları (Çizelge 4.2) ve referans izolat olarak ABD'den temin edilen Aac-8408 kodlu *Acidovorax citrulli* izolatı kullanılmıştır. Testlerde karşılaştırma kültürü olarak Prof. Dr. Yeşim AYSAN'dan temin edilen *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis* (GSPB 382) izolatı, Ziraat Yüksek Mühendisi Benian AKTEPE'den temin edilen BA-6/10 kodlu *Erwinia amylovora*'nın bir bölge izolatı, Antalya Zirai Karantina Müdürlüğü kültür koleksiyonunda bulunan AZ-8/2 kodlu *Pectobacterium caratovorum* subsp *caratovorum*'un bir bölge izolatı kullanılmıştır.

Besi Yerleri: Karpuz tohumlarını ezme işleminde kullanılan 0.05 M phosfat buffer tween-PBST, ezilen tohumları sulandırma işleminde kullanılan 0.01 M phosfat buffer-PB, genel besi yeri olarak King B ve Nutrient Agar (NA) besi yerleri kullanılırken, yarı seçici besi yeri olarak ise *Acidovorax citrulli* için yarı seçici besi yeri olan P-278 ile *Acidovorax citrulli*'ye spesifik Phosfat Buffer, -80 ^{o}C'de saklama için sıvı Nutrient Broth-NB-glycerol ve + 4 ^{o}C'de saklama için eğik yeast ekstrakt kalsiyum karbonat agar (YDCA) besi yeri kullanılmıştır. Besi yerlerinin içerikleri ve hazırlanması Ek 1, Ek 2, Ek 3 'de ayrıntılı olarak verilmiştir.

Boya maddesi ve Antibiyotikler: P-278 besi yerinde ve *Ac*'ye spesifik phosfat bufferda kullanılan boya maddesi (Riedel-de Haën marka 32714), brothymol blue (Fluka marka 32714) ve methyl violet (Merck marka 1.15945.0025)'dir. P-278 besi yerinde kullanılan antibiyotikler ise ampicillin-Na (Fluka marka 10047), cycloheximide (Sigma marka C7698), cefaclor (Sigma marka C6895), gentamycin (Fluka marka 48760), 5-Flourosil (Merck marka 8.18505.0005) ve vancomycin (Fluka marka 94747) kullanılmıştır.

Alet ve Ekipman: Hassas terazi (Sartorius TE214S), pH metre (WTW), otoklav (Hirayama Hiclave HV 50 ml), etüv (Memmert), sıcak su banyosu

(markaGFL), steril kabin (Holten), inkübatör (ES 500), tüp çalkalayıcı (Heidolph reax top), erlen çalkalayıcı (Heidolph unimax 1010), stomacher (Seward), santrifüj (Hettirch 400 circulatör), homogenizatör (Heidolph DIAX 900), ELISA okuyucusu (Medispec ESR 200), thermocycler (Applied Biosystems), transiliminatör, elektroforez (Atta AE-6110), güç kaynağı (Atta AE-8750), IF mikroskobu (Zeizz axioskop 40), IF güç kaynağı (Mbp 52 ac), buzdolabı ve derin dondurucu kullanılmıştır.

Karpuz Tohum ve Fideleri: Tohum uygulamaları çalışmalarında ve iklim odasında yapılan saksı çalışmalarında Hollanda kökenli Nickerson Zwaan'a ait Crimson Sweet (lot:J93606/E) standart tipi karpuz tohumu kullanılmıştır. Patojenite çalışmalarında ticari fide firmasından alınan Crimson Tide karpuz çeşidi, Amcostar kabak çeşidi ve Korsika su kabağı çeşidine ait fideler kullanılmıştır.

Toprak, Saksı ve Viyol Özellikleri: Patojenite çalışmalarında ve saksı denemelerinde, 3:2 oranında tarla toprağı ve torf karıştırılarak hazırlanmış ve karışım 15 cm çapındaki plastik saksılara doldurularak kullanılmıştır. İklim odası denemelerinde ise aynı toprak karışımı 48'lik viyollere konulmuş ve tohum ekiminde kullanılmıştır.

İklim Odasının Özellikleri: Antalya Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü (BATEM) Çallı, Antalya'daki Bitki Koruma Bölümünde bulunan 25±2°C, %70 nem, 16 saat aydınlık 8 saat karanlık koşullarına sahip üstten aydınlatmalı, klima ile ısıtılan iklim odasında denemeler yürütülmüştür.

Hidroklorik Asit (HCl): Tohum uygulamasında kullanılmak üzere %37'lik 2.5 litrelik hidroklorid asit (Merck-1.00314.2500) kullanılmıştır.

Sodyum hipoklorit (NaOCl): Tohum uygulamasında kullanılmak üzere % 6-14 aktif klor oranına sahip sodyum hipoklorit (Merck-1.05614.2500) kullanılmıştır.

Laktik Asit: 2.5 litre %90'lık laktik asit **(**Merck-1.00366.2500) kullanılmıştır.

Carboksi Methyl Cellulose (CMC): Hastalığı tohuma bulaştırma aşamasında yapıştırıcı madde olarak carboksi methyl cellulose (CMC) (Fluka-21902) kullanılmıştır.

Tween 20: ELISA yıkama bufferında ve *Acidovorax citrulli*'ye spesifik bufferda Tween 20 (Sigma-274348) kullanılmıştır.

Ethanol: Dezenfeksiyon için %96'lık ethanol (Merck-1.00971.2500) kullanılmıştır.

ELISA Tanı Kiti: Sediag marka monoklonal antiserum içeren DAS-ELISA **(**Aac-SRA 500) tanı kiti kullanılmıştır.

IF Tanı Kiti: Immunofloresan (IF) **(**Loewe-katalog no:07354PC) tanı kiti kullanılmıştır.

PCR Malzemeleri: Walcott ve Gitaitis (2000)'in bildirdiği gen dizilimi, İontek (İstanbul) firması tarafından sentezlenen WFB1 (5'-GAC CAG CCA CAC TGG GAC-3') ve WFB2 (5'-CTG CCG TAC TCC AGC GAT-3') primer çifti kullanılmıştır. Fermantas marka K1081 kodlu PCR master mix, Fermantas marka SM0311 kodlu 1 kb ve SM0241 kodlu 100 bp'lik DNA markerlar ve agaroz (Sigma A9539) kullanılmıştır.

3.2. Metod

3.2.1. Hastalık Belirtisi Gösteren Karpuz Bitkilerinin Toplanması

Adana ve Osmaniye illerindeki karpuz yetiştiriciliği yapılan tarlalar, 2009 ve 2010 yıllarının yaz aylarında (Haziran-Temmuz-Ağustos) ziyaret edilmiş yaprak ve meyvelerde hastalık belirtileri gösteren örnekler toplanmıştır. Özellikle yapraklarda kahverengi lekeler, yağ emmiş belirtiler bulunan örnekler toplanmıştır. Yaprak örnekleri gazete kağıdı arasına sarılıp polietilen torba içerisinde termostatla laboratuvara getirilmiştir. Meyvelerde ise dış kabukta su emmiş leke görünümüne sahip, güneş yanığı benzeri sarı veya açık kahverengi lekeli, kabukta çatlak veya asidik köpük belirtileri gösteren meyvelerden örnekler alınmıştır. Meyve örnekleri polietilen torba içerisinde laboratuara getirilmiştir.

Antalya ilinde ticari karpuz fidesi yetiştiriciliği yapılan fidelikler, 2010 yılının Ocak ve Şubat aylarında ziyaret edilmiştir. Yeni gelişen fidelerin kotiledon yapraklarında su emmiş leke veya yanıklık belirtisi gösteren fide örnekleri

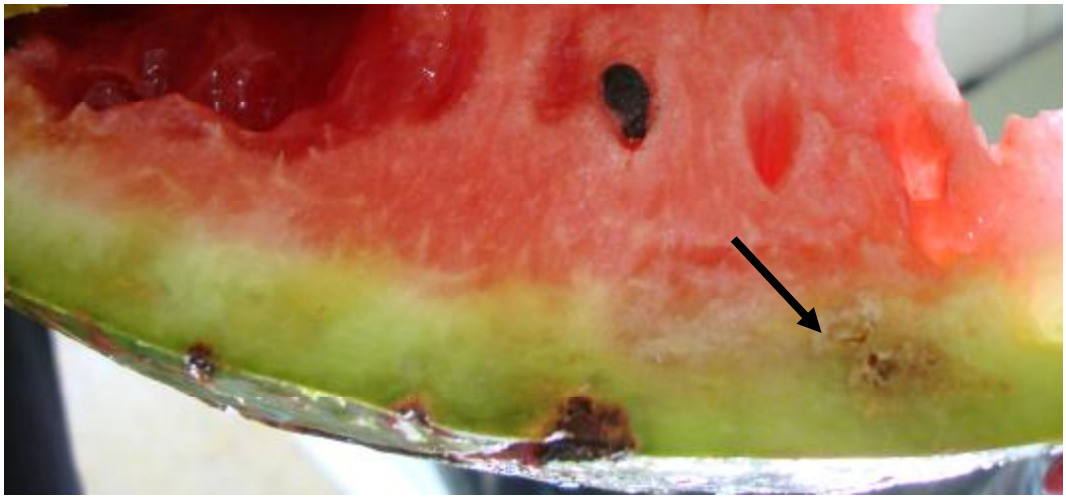
toplanmıştır. Antalya ilinde fide yetiştiren üreticiler tarafından laboratuarımıza hastalık şüphesiyle getirilen fide örnekleri çalışmaya dahil edilmiştir. Ayrıca Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Antalya İl Müdürlüğünde görev yapan ziraat mühendisi meslektaşlarımızın görev kapsamında ziyaret ettikleri fideliklerden aldıkları örnekler de izolasyon amaçlı laboratuarımıza ulaştırılmıştır.

3.2.2. Hasta Karpuz Bitkilerinden Etmenin İzolasyonu

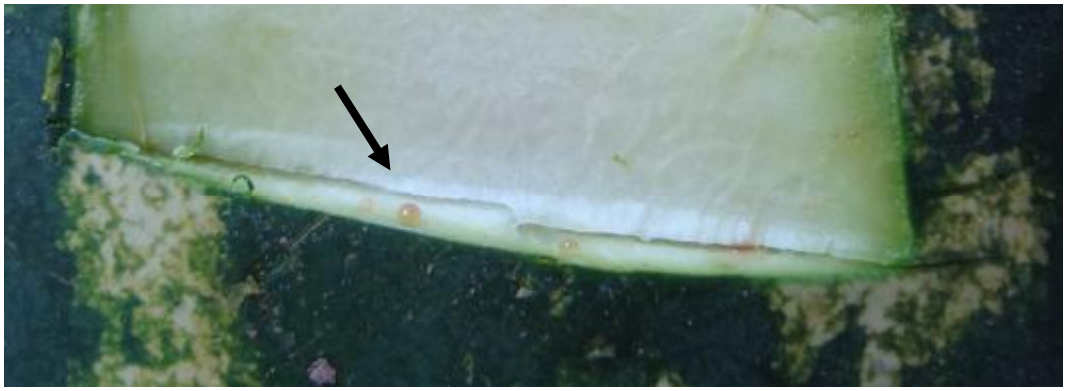
Hastalık belirtisi gösteren karpuz fide ve meyve örnekleri laboratuara getirildikten sonra çeşme suyuyla yıkanıp iyice kurutulmuştur. Fidelerin yapraklarında su emmiş veya kahverengi lekelerden hastalıklı ve sağlıklı bitki parçasını içeren doku örnekleri alınmıştır. Lekeli meyvelerin kabuk kısmının altında yer alan, beyaz etli kısımda gözlenen açık kahverengi lekeler (Şekil 3.1) ve kabuk kısmında gözlenen eksudatlar (Şekil 3.2), izolasyon örneği olarak kullanılmıştır.

Dokulardan alınan 2-3 cm büyüklüğünde bitki parçaları %70'lik alkol veya %1'lik NaOCl ile yüzeyden dezenfekte edilmiştir. Steril havanda %0.85 NaCl içeren saline bufferda homojenize edilmiştir. Havandaki örnekler 15 dakika steril kabinde bekletildikten sonra, burdan bir öze dolusu süspansiyon alınıp King B (King ve ark, 1954), Nutrient Agar (Lelliot ve Stead, 1987) ve P-278 (Randhawa ve ark., 2001) besi yeri içeren petrilere çizgi ekimiyle çizilmiştir. King B ve Nutrient Agar besi yeri içeren petriler 27°C'deki inkübatörde 2 gün, P-278 besi yeri içeren petriler 7 gün inkübe edilmiştir. King-B besi yerinde 2-3 mm çapında krem renginde, Nutrient Agar'da 2-3 mm çapında krem-beyaz renkte ve P-278 besi yerinde önce 2-3 mm çapında açık lila yaşlandıkça merkezi yeşil renk alan koloniler seçilerek saflaştırılmıştır.

Saflaştırılan izolatlar gelecekteki çalışmalarda kullanılmak üzere eğik olarak hazırlanmış YDCA besi yerinde geliştirilmiş ve +4°C'de buzdolabında saklanmıştır. Uzun süreli saklamalar için izolatlar etiketlenerek eppendorf tüpü içindeki Nutrient Broth sıvı besi yerine bir öze dolusu ilave edilmiş üzeri gliserol ile kapatılmış ve -80°C'deki derin dondurucuda saklanmıştır.



Şekil 3.1. Meyvenin beyaz eti kısmında (albedo) görülen lekeler



Şekil 3.2. Meyve kabuk altında gözlenen eksudatlar

3.2.3. Patojenite Testi

Patojenite çalışmalarında ticari fide firmasından alınan Crimson Tide karpuz çeşidi, Amcostar kabak çeşidi ve Korsika su kabağı çeşidine ait fideler kullanılmıştır. Hasta karpuz meyvelerinden ve fidelerinden izole edilen bakteri izolatları King B besi yerinde 27°C'deki inkübatörde 48 saat geliştirildikten sonra iki farklı inokülasyon yöntemiyle fidelere bulaştırılmıştır. King B besi yerinde 48 saat geliştirildikten sonra spektrofotometre yardımıyla 600 nanometrede 0.1 absorbans değerinde (A_{600}:0.1) 4.3x10^{8} hücre/ml'lik değere denk gelen bir bakteri süspansiyonu hazırlanmıştır. Bu süspansiyonun içerdiği bakteri yoğunluğu, süspansiyondan seyreltme serileri hazırlanarak besi yerine yayılmasıyla hesaplanmıştır. Birinci yöntemde 4.3x10^{5} hücre/ml yoğunluğunda hazırlanan bakteri süspansiyonu karpuz,

kabak ve su kabağı yaprağının alt kısmından damar aralarına şırıngayla enjekte edilmiştir. İkinci yöntemde Nutrient agar besi yerinde 48 saat geliştirilen bakteri kültürlerinin tek kolonisinden kürdan ucu yardımıyla alınıp iki yaprak sapının birleşim yerindeki gövdeye bakteri bulaştırılmıştır. Bakteri izolatlarıyla iki farklı inokulasyon yöntemiyle bulaştırılan fideler 25°C sıcaklık, %70-80 nem ve 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık koşullarındaki iklim odasında muhafaza edilmiştir. Pozitif kontrol olarak, ABD'den temin edilen Aac-8408 kodlu *Acidovorax citrulli* kültürü kullanılmıştır. Negatif olarak bitkiler steril suyla aynı şekilde bulaştırılmıştır.

Birinci inokulasyon yöntemiyle bulaştırılan su kabağı bitkilerinde 5 gün sonra hastalık belirtisi gözlenirken kabak ve karpuz bitkilerinde 7 günden sonra hastalık belirtileri tespit edilmiştir. İkinci yöntemle bulaştırılan bakteri izolatları su kabağı fidelerinde 3 gün, karpuz fidelerinde 4 gün ve kabak fidelerinde 5 gün sonra hastalık belirtisi oluşturmuştur. Yapraklarda oluşan yanıklık belirtilerinin varlığı veya yokluğuna göre izolatların patojenite yetenekleri var/yok olarak değerlendirilmiştir. Hastalık belirtileri gösteren tüm bitkilerden re-izolasyonlar yapılarak Koch Postulatlarına ait işlemler tamamlanmıştır. King B besi yerine yapılan re-izolasyon işlemlerinden sonra elde edilen re-izolatlar ile tanı çalışmaları yapılmıştır.

3.2.4. Hasta Bitkilerden Elde Edilen İzolatların Klasik Testlerle Tanısı

Hastalık belirtisi gösteren karpuz meyveleri ve fidelerinden izole edilen bakteri izolatlarının tanısı, genel (King B ve Nutrient agar) ve yarı seçici (P-278) besi yerlerindeki koloni morfolojisi, potasyum hidroksit (KOH) ile gram reaksiyon, LOPAT testleri (Levan tipte koloni üretimi, Oksidaz reaksiyonu, Patateste pektolitik aktivite, Arginin dehidrolaz aktivitesi ve Tütünde aşırı duyarlılık reaksiyonu) ve kabakgil fidelerinde patojenite testi sonuçlarına göre yapılmıştır. Tanı sonucunu desteklemek için serolojik testlerden türe spesifik monoklonal antiserum kullanılarak Das- ELISA ve moleküler testlerden türe spesifik primer kullanılarak PCR testleri yapılmıştır.

Bakterinin Koloni Morfolojisi: Karpuzun meyve ve fidelerinden elde edilen bakteri izolatlarının, genel besi yerleri olan King B besi yerinde 2-3 mm çapında

krem renge sahip kolonilerin varlığı, Nutrient agar besi yerinde 2-3 mm çapında ve beyaz-krem renge sahip kolonilerin varlığı, yarı seçici besi yeri olan P-278'de ise 5-7 gün içinde yaklaşık 2 mm çapında açık lila-mor renkte ve bir haftadan sonra 3-4 mm çapında koyu yeşil renge sahip kolonilerin varlığı yönünden incelenmiştir.

Potasyum Hidroksit Testi (KOH) ile Gram Reaksiyon: Taze hazırlanan %3'lük potasyum hidroksit solüsyonundan lam üzerine 1 damla damlatıldıktan sonra karpuz re-izolatının 48 saatlik kültüründen platin özeyle alınan bakteriler solüsyona dairesel hareketlerle karıştırılmıştır. 15-20 saniye sonra öze yukarı kaldırıldığında viskoz, yapışkanımsı bir sünmenin oluşması gram negatif olarak değerlendirilmiştir. Kontrol olarak gram pozitif özelliğe sahip *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis* (GSPB 382) kültürü ve gram negatif özelliğe sahip ABD'den temin edilen Aac-8408 kodlu *Acidovorax citrulli* kültürü kullanılmıştır.

Levan Tipte Koloni Üretimi: Nutrient Agar besi yerine %5 oranında Sakkaroz eklenerek hazırlanan Sakkaroz Nutrient Agar (SNA) besi yerine (Ek 1) re-izolatlar ve referans izolat (Aac-8408) çizgi ekim yöntemiyle aşılandıktan sonra petriler 25°C'de 3-4 gün inkübe edilmiştir. Kalın, beyaz, konveks, mukoid koloniler pozitif olarak değerlendirilmiştir. Pozitif kontrol olarak BA-6/10 kodlu *Erwinia amylovora*'nın bir bölge izolatı (Aktepe, 2012) kullanılmıştır.

Oksidaz Testi: Taze hazırlanan %1'lik N;N;N;N'-Tetramethyl-1.4 phenylene diammonium diclorid eriyi steril filtre kağıdına damlatılmıştır. Re-izolatlar ve referans izolatın 48 saatlik kültürü platin öze ile ıslak kurutma kağıdına çizildiğinde 10 saniye içinde oluşan koyu mor renk pozitif olarak değerlendirilmiştir. Pozitif kontrol olarak ABD'den temin edilen Aac-8408 kodlu *Acidovorax citrulli* kültürü kullanılmıştır.

Patateste Pektolitik Aktivite: Patates yumruları yüzey dezenfeksiyonu için önce deterjanlı suda fırçalanarak yıkanmış ve daha sonra %1'lik NaOCl'de 3 dakika bekletilmiştir. NaOCl'yi uzaklaştırmak için 3 kez steril saf su ile durulanmıştır. Steril ıslak filtre kağıdı içeren steril petri içine kabuğu soyulmuş yaklaşık 1 cm kalınlığındaki patates dilimleri yerleştirilmiştir. Bir öze dolusu bakteri kültürü patates dilimi üzerine bulaştırılmıştır. 25°C'de iki günlük inkübasyondan sonra değerlendirme yapılmıştır. Pozitif kontrol olarak AZ-8/2 kodlu *Pectobacterium*

caratovorum subsp *caratovorum*'un bir bölge izolatı kullanılmıştır. Ayrıca ABD'den temin edilen Aac-8408 kodlu *Acidovorax citrulli* kültürü kullanılmıştır.

Arginin dehidrolaz aktivitesi: Litrede 1g pepton, 5g NaCl, 0.3g K_2HPO_4, 10g L(+) arginin HCl, 0.01g fenol kırmızısı, 3g agar içeren besi yeri hazırlandıktan sonra pH 7.2'ye ayarlanmıştır. 16x1.5 cm'lik tüplere 3'er ml besi yeri konup otoklav edilmiştir. Taze geliştirilmiş bakteriyel fide yanıklığı bölge izolatlarıyla nokta aşılama yapılmıştır. Tüplerin üzeri steril vaspar eriyiği (vaspar 1 ölçü vazelin, 3 ölçü sıvı parafin eritilen vazeline parafin ilave edilir ve 121 °C'de 15 dakika otoklav edilir) ile kapatılmıştır. Kültürler 26°C'de 2 hafta inkübe edildikten sonra kırmızıdan (pembe) vişne rengine dönenler pozitif kabul edilmiştir (Lelliot ve Stead, 1987). Negatif kontrol olarak üç tüp aşılanmamıştır.

Tütünde Aşırı Duyarlılık Reaksiyonu: Tütün (*Nicotiana tabacum* cv Samsun) bitkisi yaprağının alt yüzeyine damar aralarına karpuz re-izolatlarının 10^8 hücre/ml yoğunluğundaki süspansiyonu bir enjektör yardımı ile infiltre edilmiştir. 24-48 saat sonra inokule edilen alanlarda oluşan nekrotik görünüm pozitif olarak kabul edilmiştir. Pozitif kontrol olarak ABD'den temin edilen Aac-8408 kodlu *Acidovorax citrulli* kültürü kullanılmıştır.

3.2.5. Hasta Bitkilerden Elde Edilen İzolatların Serolojik Tanısı

Akdeniz Bölgesinin farklı illerden Adana, Antalya ve Osmaniye'den izole edilen, klasik testlere göre *Acidovorax citrulli* olarak tanılanan karpuz izolatlarının tanı sonucunu desteklemek amacıyla serolojik testlerden DAS-ELISA testi kullanılmıştır. Testte kullanılan çözeltilerin içerikleri ayrıca Ek 2'de detaylı olarak açıklanmıştır. ELISA testi işlemleri Clark ve Adams (1977) ile McLaughlin ve Chen (1990)'a göre yapılmıştır. Monoklonal antiserum içeren DAS-ELISA tanı kiti ile yapılan çalışma iki tekrarlı olarak yürütülmüştür. Çalışmada tüm re-izolatlar kullanmıştır. Negatif kontrol olarak kültür hazırlanmasında kullanılan PBS ve sağlıklı karpuz yaprağı ile pozitif kontrol olarak Aac-8408 kodlu referans izolat kullanılmıştır.

Testlenecek izolatlar 48 saat King B besi yerinde geliştirilmiş ve bu kültürlerden birer öze alınıp 1 ml PBS içine konarak spektrofotometrede yoğunluğu 600 nanometrede 0.1 absorbans değerine (A_{600}:0.1) ayarlanmıştır. Süspansiyonlar ELISA plakası çukurlarına 100'er µl ve 2 tekrarlı olarak yerleştirilmiştir. Plaka coating antibodyler, coating buffer ile sulandırılmıştır (etmene göre bu sulandırma değişir örn:1/200). Her bir çukura 100 µl eklenip, 37°C'de 2 saat bekletilmiştir. 3 kez yıkama bufferı (PBST) ile yıkanmıştır. 0.5 g taze kültür (veya bitki) 2 ml PBS ile sulandırılmıştır. Her bir çukura 100 µl eklenip 16 saat (bir gece) +4°C'de bekletilmiştir. 5 kez PBST ile yıkanmıştır. Conjugate antibody, RUB3 enzim konjugate ile sulandırılmıştır (*Acidovorax citrulli* için 1/200). Her bir çukura 100 µl eklenip, 37°C'de 2 saat bekletilmiştir. 3 kez yıkama bufferı (PBST) ile yıkanmıştır. 1 mg PNPP/1 ml substrat buffer ile hazırlanıp, her bir çukura 100 µl eklenip, 37°C'de 45 dakika bekletilmiştir. ELISA okuyucunda 405 nm'de absorbans değerleri 45 dakika sonra okunmuş ve negatif kontrolde (PBS tamponu) okunan değerin en az iki katı ve fazlası veya pozitif kontrole yakın olan değerler pozitif olarak değerlendirilmiştir.

3.2.6. Hasta Bitkilerden Elde Edilen İzolatların Moleküler Tanısı

Karpuz meyve ve yapraklarından izole edilen bakteri izolatlarının PCR işlemleri için DNA ekstraksiyonu De Boer ve Ward (1990) yöntemine göre yapılmıştır. Bakterilerden genomik DNA'nın hazırlanması aşamasında 48 saatlik bakteri kültürü sıvı besi yerine (Nutrient Agar) aşılanmış ve 24 saat geliştirilmiştir. Bakteri süspansiyonundan 1 ml ependorf tüpüne alınmıştır (2-3 tekerrür halinde) ve 14 000 g'de 20 dakika santrifüj edilmiş ve pellet toplanmıştır. Pellet üzerine hücre parçalanmasını sağlamak amacı ile %1'lik SDS (Sodium dodecyl sülfat) içeren Tris-EDTA bufferdan (Ek 3) 100 µl eklenerek vorteks yapılmış ve tekrar süspansiyon haline getirilmiştir. Ependorflar 3 saat 50°C'deki su banyosunda bekletilmiştir. Saatte bir ependorflar vorteksle karıştırılmıştır. Isı ile muamele edilmiş örneklere yarım hacim 7.5 M Amonyum asetat (Ek 3) eklenmiştir (100 µl ye 50 µl). Bu aşamadan sonra vorteksle karıştırma yapılmamıştır. 14.000 g'de 10 dakika santrifüj edilmiştir.

Amonyum asetat artıkları aşağıda toplanmış üstte süpernatant içinde DNA yer almıştır. Yeni bir ependorf tüpüne ucu kesik bir pipet ucu ile yaklaşık 130 µl ölçülerek süpernatant alınmıştır. Süpernatanta eşit (130 µl) miktarda derin dondurucuda soğutulmuş isopropanol eklenmiştir. Ardından ependorf tüpler derin dondurucuda 45 dakika bekletilmiştir. 10.000 g'de 10 dakika santrifüj edilerek pellet toplanmıştır. Soğutulmuş %70'lik alkolden 100 µl ependorflara eklenmiştir. 10.000 g'de 10 dakika santrifüj edilerek alkolle yıkama yapılmıştır. Alkol dökülüp yaklaşık bir saat steril kabinde kurumaya bırakılmıştır. Pellet üzerine 50 µl bidestile su eklenmiştir. Total-DNA'ların izole edilip edilmediğini anlamak için jele verilmiştir. Jele verilmeden önce hafifçe vorteksle karıştırılmıştır. -20°C'deki saklanan DNA'lar çalışmadan önce eritilerek kullanılmıştır.

PCR işlemlerinde, 16S ribozomal RNA gen bölgesini kodlayan DNA diziliminden dizayn edilen, WFB1 (5'-GAC CAG CCA CAC TGG GAC-3') ve WFB2 (5'-CTG CCG TAC TCC AGC GAT-3') adlı primer çifti kullanılarak 360 bp'lık bantların varlığına göre izolatların moleküler tanısı yapılmıştır (Walcott ve Gitaitis, 2000).

PCR karışımı bir ependorf tüpte 2 µl total-DNA örneği, 12.5 µl PCR Master Mix, her bir primerden 2 µl ve 6.5 µl steril saf su olmak üzere 25 µl'ye tamamlanmıştır. PCR tüplerinin üzerine birer damla mineral yağ eklenmiştir. Ardından tüpler PCR işlemlerinde kullanılan thermo cycler cihazına yerleştirilmiştir. PCR'da kullanılacak program Walcott (2004)'e göre programlanmıştır. Amplifikasyon 95°C'de 1 dakika ısınma peryoduyla başlatılmış, 95°C'de 5 dakika ilk denatürasyon ve 95°C'de 30 saniye, 65°C'de 30 saniye ve 72°C'de 30 saniye1 döngü olacak şekilde 30 döngüye tamamlanmıştır. En son uzama olarak 72°C'de 5 dakika ile program tamamlanmıştır. PCR ürünleri agaroz jelde yürütülene kadar +4°C'de muhafaza edilmiştir.

Elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez işlemleri Sambrook ve ark., (1989)'a göre yapılmıştır. Bunun için %1.5 agaroz jel hazırlanmış ve 50°C'ye soğutulduktan sonra tarakları içeren kaba dökülmüştür. Elektroforez kabı içinde TAE buffer bulunan elektroforez tankı içerisine yerleştirilmiştir. Daha sonra 18 çukurlu tarak jelden dikkatlice çıkarılmış ve oluşan çukurlara 2 µl loading buffer (Ek 3) ve 8

µl PCR ürünü karışımı bir otomatik mikropipet yardımıyla yerleştirilmiştir. Oluşan bandların büyüklüğünü ölçmek için 100 bp'lik moleküler işaretleyici (marker) kullanılmıştır. PCR ürünleri 75 miliamper elektrik akımı verilerek yaklaşık 1.5 saat yürütülmüştür. Bantların UV ışık altında görülebilmesi için etidyum bromit ile (10 mg/ml) 10 dakika boyama yapılmış ve daha sonra 10 dakika steril saf su ile çalkalanmıştır. Etidyum bromit ile boyanan jeller üzerindeki bantlar transiliminatörde (302 nm) incelenmiş ve gözlenen 360 bp büyüklüğündeki bantlar fotoğraflanmıştır.

3.2.7. Ülkemize İthal Gelen Karpuz Tohum Lotlarının ve İç Karantina Amaçlı Gelen Karpuz Fidelerinin Patojenin Varlığı Yönünden İncelenmesi

Ülkemize ithal gelen tohum lotlarının *Acidovorax citrulli* bulaşıklığı yönünden incelenmesi, 6968 sayılı Zirai Karantina Numune Alma ve Analiz Yönetmeliği'ne göre Antalya Zirai Karantina Müdürlüğü Bakteriyoloji laboratuarında yapılmıştır. 2009-2012 yılları arasında ABD, Çin, Fransa, Hindistan, Hollanda, İspanya, İsrail, İtalya, Japonya, Meksika, Peru, Şili, Tayland, Tayvan, Ürdün, Yunanistan olmak üzere 16 ülkeden ithal edilen 48 çeşide ait 217 adet karpuz ve karpuz anacı tohum lotları yarı seçici özellikteki bufferda tohumların çalkalanması, yarı seçici besi yerine ekim, floresan pigmentasyon, gram reaksiyon, oksidaz, tütünde aşırı duyarlılık, IF boyama yöntemi, DAS-ELISA ve patojenite testleri yapılmıştır.

2009 yılında ülkemize ithal gelen sadece karpuz tohum lotlarından inspektörlerin laboratuar incelemesi için almış oldukları 50 gr tohum örneği steril *Acidovorax citrulli*'ye spesifik 250 ml buffer (7.42 g K_2HPO_4, 2.02 g KH_2PO_4, 10 mg brothymol blue, 1000 ml destile su, pH: 7.0 otoklavdan sonra; 50 µl tween 20) içinde 4 saat çalkalanmıştır. Tohumlar dibe çökmesinden dolayı üstte bulunan bufferdan 30 ml alınıp santrifüj tüpüne aktarılmış ve 9.000 rpm'de 20 dakika santrifij yapılarak süpernatant uzaklaştırılıp pellet alınmıştır. Elde edilen pellet 1 ml PBS içinde çözülüp bu süspansiyondan 100'er µl alınıp King B ve P-278 besi yerlerine üç tekrarlı olarak ekimi yapılmıştır. Petriler 27^oC'deki inkübatörde 7 gün

inkübasyondan sonra incelenmiştir. Eğer besi yerinde *Acidovorax citrulli* kolonilerine benzer gelişim gözlenirse saflaştırıp referans kültürle farklı besi yerlerindeki koloni morfolojileri karşılaştırılmıştır. Kolonilerden halen *Acidovorax citrulli* şüphesi varsa floresan pigmentasyon, gram reaksiyon, oksidaz, tütünde HR, IF boyama, Das-ELISA testlerinin ardından patojenite testi yapılarak sonuçlar referans kültürle karşılaştırılmıştır. IF boyama yöntemi aşağıda anlatılmıştır. Ayrıca kullanılan diğer testler daha önce anlatıldığından dolayı burada tekrar edilmemiştir.

15 Mart 2010 tarihinden itibaren 6968 sayılı Zirai Karantina Numune Alma ve Analiz Yönetmeliği'nde öre tohumları analiz protokolünde değişiklik yapılmıştır. Bu tarihten sonra sadece karpuz tohumları değil aynı zamanda tüm kabakgil (karpuz, kavun, hıyar, kabak ve bunların anaçları) tohumları bu etmen açısından analize tabii tutulmaya başlanmıştır. Analizlerde 50 gr olarak kullanılan örnek miktarı bu tarihten itibaren, küçük kabakgil tohumlarına sahip hıyar, karpuz ve kavun için 450 gr'a, iri tohuma sahip kabak ve karpuz anaç tohum lotları için 500 gr'a genel olarak da 10.000-30.000 adete çıkarılmıştır. Yönetmelikteki değişiklik tarihine kadar tohumlar parçalanmadan kullanılırken bu tarihten itibaren parçalanarak kullanılmıştır. Gelen örnek (10.000-30.000 adet veya 450-500 gr) alt örneklere ayrılarak tamamı analize tabi tutulmuştur. Alt örnek büyüklüğü 2.000 adet tohumdan oluşmuştur, 10.000 adet tohum için 5 alt örnek yapılmıştır. Her bir alt örnek için (karpuz, kavun, kabak ve hıyar tohumları), 250 ml *Ac*'ye spesifik Phosfat buffer tohumların üzerine ilave edilmiştir. 4°C'de 24 saat veya oda sıcaklığında (20-24°C'de) 4 saat süreyle, 120 rpm'de çalkalanarak inkübe edilmiştir. Kullanılan buffer miktarı diğer *Cucurbita* spp. tohumları için, tohumların üzerini kaplayacak şekilde ayarlanmıştır. Çalkalanan ekstrakttan steril bir santrifüj tüpüne 50 ml alınıp 2500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Dipteki pellete dokunmadan üst sıvının tamamı steril bir santrifüj tüpüne eklenmiştir. Alınan üst sıvı 10.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilip pellet alınmıştır. Pellet üzerine 1 ml phosphate buffer ilave edilerek, çözülünceye kadar vortekste karıştırılmıştır.

İç karantina amaçlı karpuz fidelerinin *Acidovorax citrulli* bulaşıklığı yönünden incelenmesi 11/06/2010 tarihli ve 5996 sayılı Veteriner Hizmetleri, Bitki Sağlığı , Gıda ve Yem Kanununun ilgili maddelerine dayanılarak hazırlanan Bitki

Pasaportu Sistemi ve Operatörlerin Kayıt Altına Alınması hakkındaki yönetmeliğe göre Antalya Zirai Karantina Müdürlüğü Bakteriyoloji laboratuarında yapılmıştır. 2009-2012 yılları arasında Tarım İl Müdürlüğünde görev yapan ziraat mühendisi meslektaşlarımızın görev kapsamında ziyaret ettikleri ticari fideliklerden aldıkları beş çeşide ait 37 adet karpuz fide örnekleri, genel bakteri izolasyon yöntemine göre analiz edilmiştir. İzolasyonlarda genel besi yeri olarak King B ve yarı seçici besi yeri olarak P-278 kullanılmıştır. İzolasyon petrilerinin 27°C'de inkübasyonundan sonra *Acidovorax citrulli* benzeri koloniler saflaştırılmış ve floresan pigmentasyon, gram reaksiyon, oksidaz, tütünde aşırı duyarlılık, IF boyama yöntemi, DAS-ELISA ve patojenite testleri ile tanısı yapılmıştır.

Immuno Floresan (IF) Boyama ile Üretim Materyallerinin *Acidovorax citrulli* Yönünden İncelenmesi: Immuno Floresan (IF) testi çalışmasında, testlenecek her bir karpuz izolatının koloni ekstraksiyondan 10 gözlü teflon lamın ilk 4 kuyucuğuna 10^9 hücre/ml yoğunluktaki saf kültürden ve diğer 4 kuyucuğa ise 10^7 seyreltme serisindeki koloni süspansiyonundan 25 µl pipetle konularak oda sıcaklığında kuruması için bekletilmiştir. Lam üzerinde olan örnek 10 dakika %96'lık alkolde tutularak fiksasyon işlemi tamamlanmış, örnekler havlu kağıt üzerine konularak üzerleri hafifçe bastırılarak kurulanmıştır. 25 µl antiserum eklendikten sonra oda sıcaklığında kuruması için 30 dk bekletilip, üzeri plastik küvet ile kapatılmıştır. Küvetin arka kısmı kalın olan alüminyum folya ile kapatılmıştır. Şale içinde tutularak PBS Tween buffer (Ek 4) ile 5 dakika yıkanmıştır. Tekrar PBS bufferda (Ek 4) 5 dakika yıkama yapılmıştır. FITC'den 25 µl ekleneek lamlar 30 dakika kapalı konumda bekletilmiştir. PBS Tween, PBS buffer ve steril suda 5 dk bekletilmiştir. Her bir kuyucuğun üzerine bir damla gliserol buffer konulup, lamel ile kapatılmıştır.

Hazır olarak alınan FITC'ler 50 µl olarak steril mikrofüj tüplerine bölünmüştür (Steril kabin içinde bölünmüş ve kabin çalışmaya başlamadan önce 30 dk UV ışıkta bekletilerek steril edilmiştir). -20°C'de bekletilen FITC'ler alınan örnekteki prosedür gibi üzerine 9500 µl %50 gliserol-su eklenerek seyreltilmiş ve +4 ^{o}C'de muhafaza edilmiştir. Seyreltme işleminde öncelikle büyük olan tüplere 9000 µl karışımdan konulmuş ve 950 µl olan kısım ise öncelikle mikrofüj tüpte

karıştırılarak daha sonra büyük tüpe alınmıştır. IFTC ise prosedüre göre seyreltilmiş ve 50 µl olarak bölünmüştür. Bu 50 µl olan miktara 9950 µl buffer konulduğunda 1:200 oranında seyreltme yapılmıştır. *Acidovorax citrulli* için tavsiye edilen sulandırma oranı 1/1000 oranında önerilmiştir. Tüm bu işlemler hazır olarak alınan IF kiti içerisindeki pozitif kontrole ve referans kültüre de uygulanmıştır. Daha sonra IF mikroskobundaki fosforlu yeşil renkte boyanan bakteri kolonilerinin varlığı yönünden incelenmiştir.

3.2.8. Bakteriyel Fide Yanıklığı Hastalığının Mücadelesinde Tohum Uygulamaları

Tohumda yaşamını sürdüren *Acidovorax citrulli*'ye karşı etkili yöntemlerden biri, tohum kökenli inokulumla mücadele etmektir. Bu amaçla suni olarak laboratuar koşullarında *Acidovorax citrulli*'nin bir bölge izolatıyla (HOS-4) bulaştırılan Crimson sweet çeşidi kapuz tohumlarına 21 farklı fiziksel ve kimyasal tohum uygulamaları yapılmıştır.

Uygulama görmüş tohumlar iklim odasında kontrollü koşullarda yetiştirilerek, gelişen fidelerde *Acidovorax citrulli*'nin neden olduğu bakteriyel fide yanıklığı hastalığına etkisi araştırılmıştır. Pozitif kontrol olarak sadece patojenle bulaştırılmış tohumlar, negatif kontrol olarak steril suyla uygulama görmüş tohumlar kullanılmıştır. Uygulamaların etkinliği sadece patojenle bulaştırılan pozitif kontrole göre değerlendirilmiştir. Ayrıca bu uygulamaların tohum çimlenmesine ve fide gelişimine olan etkisi de araştırılmıştır.

Tohum uygulamalarına 2010 yılında ön deneme yapılmış ve daha sonra 2011 ve 2012 yıllarında iki kez tekrarlanmıştır. Ön deneme, 3 tekrarlı ve her tekrarda 500 adet olmak üzere, her tohum uygulaması için 1500 adet tohum kullanılmıştır. Birinci ve ikinci deneme, benzer şekilde 3 tekrarlı ve her tekrarda 100 adet olmak üzere, her tohum uygulaması için 300 adet tohum kullanılmıştır. Yapılan işlemler aşağıda sırasıyla anlatılmıştır.

Fiziksel ve kimyasal tohum uygulamaları Antalya Zirai Karantina müdürlüğü bakteriyoloji laboratuvarında yapılmıştır. Uygulama görmüş tohumların yetiştirilmesi

ve fidelerdeki hastalığın izlenmesi aşamasında BATEM'in Çallı'daki araştırma istasyonundaki iklim odaları kullanılmıştır.

3.2.8.1. Tohumların Patojenle Bulaştırılması

Piyasada satışı yapılan, fungal hastalıklara karşı Thiramla ilaçlı Crimson Sweet çeşidine ait tohumlar akan çeşme suyu altında iyice yıkanarak ilaç ve boya maddelerinden arındırılmıştır. Kurutma kağıdı üzerinde 2 gün oda sıcaklığında kurutulduktan sonra kullanılmıştır. *Acidovorax citrulli*'nin bir bölge izolatı (HOS-4) King B besi yerinde 48 saat geliştirildikten sonra spektrofotometre yardımıyla 10^8 hücre/ml yoğunluğunda bakteri süspansiyonu hazırlanmış ve bakterinin tohumlara yapışmasını sağlamak amacıyla içerisine %1 oranında karboksimetil selülaz (CMC, Fluka, katalog no:21902) eklenmiştir. Crimson Sweet çeşidine ait karpuz tohumları bu süspansiyon içinde 4 saat çalkalanarak patojenle bulaştırılmıştır. 2010 yılında yapılan ön denemede, minimum 33.000 adet tohum, patojenle bulaştırılmıştır. 1500 adet tohum ise negatif kontrol olarak sadece steril su içinde 4 saat çalkalanmıştır. 2011 ve 2012 yıllarında yapılan birinci ve ikinci denemelerin her birinde, minimum 6.600 adet tohum patojenle bulaştırılmıştır. 300'er adet tohum ise negatif kontrol olarak sadece steril su içinde 4 saat çalkalanmıştır.

3.2.8.2. Fiziksel Tohum Uygulamaları

Acidovorax citrulli ile bulaştırılmış, ön, birinci ve ikinci denemede farklı sayıda (her uygulama için 1500 adet, 300 adet ve 300 adet) olan tohumlar bir tülbente sarılarak, termostatlı ve sirkülasyonlu su banyosunda 12 farklı sıcak su uygulamasına tabi tutulmuştur (Özaktan, 1991; Tireng-Karut, 2011). Patojenle bulaşık tohumlar 50^oC'deki sıcak suya 10, 15 ve 20 dakika; 55^oC'deki sıcak suya 10, 15 ve 20 dakika; 60^oC'deki sıcak suya 10, 15 ve 20 dakika; 65^oC'deki sıcak suya 10, 15 ve 20 dakika daldırılmıştır. Uygulama sonrası tohumlar steril kabin altında bir gece boyunca oda sıcaklığında kurutulmuştur.

3.2.8.3. Kimyasal Tohum Uygulamaları

Kimyasal tohum uygulaması olarak enfekteli tohumlara Hidroklorik asit (HCl), Sodyum hipoklorit (NaOCl) ve Laktik asit uygulaması yapılmıştır. Bu kimyasal tohum uygulamaları teksel uygulamanın yanında HCl ve NaOCl kombinasyon şeklinde de uygulanmıştır.

Ticari olarak satın alınan %14'lük NaOCl çözeltisi, suyla seyreltilerek %0.525 oranında (131.25 ml %14'lük NaOCl, 336.875 ml saf su içine eklenmiştir) 468 ml'lik bir çözelti olarak hazırlanmıştır. *Acidovorax citrulli* ile bulaştırılmış, her bir denemede farklı sayıda (her uygulama için 1500 adet, 300 adet ve 300 adet) olan, tülbente sarılmış tohumlar %0.525'lik NaOCl içinde 20 dakika bekletilerek uygulama gerçekleştirilmiştir (Rane ve Latin., 1992; Tireng Karut, 2011).

Merck firmasından satın alınan %37'lik HCl çözeltisi, suyla seyreltilerek %1.8 oranında (18 ml %37'lik HCl, 352 ml saf su içine eklenmiştir) 370 ml'lik bir çözelti olarak hazırlanmıştır. Her bir denemede farklı sayıda (her uygulama için 1500 adet, 300 adet ve 300 adet) olan, tülbente sarılmış patojenle bulaşık tohumlar %1.8'lik HCl içinde 5 dakika bekletilerek uygulama gerçekleştirilmiştir (Rane ve Latin., 1992; Tireng-Karut, 2011).

Kombinasyon uygulaması olarak, eşit oranda hazırlanmış 250 ml %5'lik NaOCl çözeltisiyle 250 ml %1.8'lik HCl çözeltisi karışımına tülbente sarılmış patojenle bulaşık tohumlar (her uygulama için 1500 adet, 300 adet ve 300 adet) 15 dakika daldırılarak uygulama gerçekleştirilmiştir.

Tireng-Karut, (2011)'un önerisine göre ilk denemede Merck firmasından satın alınan %90'lık laktik asit (Merck 1.00366.2500) çözeltisi, suyla seyreltilerek %30 oranında (150 ml %90'lık laktik asit, 300 ml saf su içine eklenmiştir) 450 ml'lik bir çözelti olarak hazırlanmıştır. Her bir denemede farklı sayıda (her uygulama için 100 adet, 300 adet ve 300 adet) olan, tülbente sarılmış patojenle bulaşık tohumlar %30'luk laktik asit içinde 15 dakika bekletilerek uygulama gerçekleştirilmiştir (Wolf ve ark., 2008; Tireng Karut, 2011). Benzer şekilde aynı sayıda patojenle bulaşık tohumlar %30'luk laktik asit içine ayrıca 20 ve 30 dakika daldırılarak diğer uygulamalar yapılmıştır.

Bu ilk yapılan ön deneme sonrası %30'luk laktik asitle uygulama görmüş tohumların hiç birinde çimlenme olmayınca birinci ve ikinci denemede %90'lık laktik asitin %2'lik (10 ml %90'lık laktik asit, 440 ml saf su içine eklenmiştir) 450 ml'lik çözeltisi kullanılmıştır. Uygulama süresi de 15, 20 ve 30 dakika yerine 10, 15 ve 20 dakikaya düşürülmüştür. Uygulama sonrası tüm tohumlar steril kabin altında bir gece boyunca oda sıcaklığında kurutulmuştur.

3.2.8.4. Fiziksel ve Kimyasal Tohum Uygulamalarının Bakteriyel Fide Yanıklığı Hastalığına Etkisi

Toplamda 21 farklı fiziksel ve kimyasal tohum uygulamaları görmüş tohumlar, 3:2 oranında tarla toprağı ve torf içeren 48'lik viyollere ekilmiştir. Viyoller 25±2°C, %70 nem, 16 saat aydınlık 8 saat karanlık koşullarına sahip üstten aydınlatmalı, klima ile ısıtılan iklim odasına yerleştirilmiştir. Tohum ekildiği gün sulanan viyoller tohum çimlenene kadar sulanmamıştır. Çimlenmeden sonra günlük olarak kontrol edilerek sulaması yapılmış ve hastalık açısından incelenmiştir. Pozitif kontrol olarak hiçbir tohum uygulaması yapılmamış sadece patojenle bulaştırılan tohumlardan gelişen fidelerin kotiledon yapraklarında su emmiş ve/veya açık kahverengi lekelerin varlığı gözlenene kadar bitkiler izlenmiştir. Pozitif kontroldeki hastalık gelişiminden sonra tüm uygulamalardaki bitkiler incelenmiş, hastalıklı fide sayısı belirlenmiştir. Tüm uygulamalardaki ve her bir tekrardaki toplam fide sayısı, hasta fide sayısı kaydedilerek hastalık %'si hesaplanmıştır. Tüm uygulamalardaki hastalık %'si belirlendikten sonra pozitif kontrol olarak sadece patojenle bulaştırılan tohumlardaki hastalık %'si, uygulama görmüş tohumlardaki hastalık %'siyle karşılaştırılarak uygulamaların etkinliği Abbott formülüyle hesaplanmıştır. Uygulamaların % etkinliğinin açı değerleri alınarak, Anova istatistik programında Duncan çoklu karşılaştırma testinde $p \leq 0.05$ önem düzeyinde uygulamalar arasındaki istatistiki farklar saptanmıştır. Aynı istatistiki grupta yer alan uygulamalar aynı harfle işaretlenmiş ve sonuçlar yorumlanmıştır.

3.2.8.5. Fiziksel ve Kimyasal Tohum Uygulamalarının Tohum Çimlenmesine Etkisi

Tohum uygulamaları sonucu tohum çimlenmesinde meydana gelen değişim araştırılmıştır. Bu amaçla, farklı fiziksel ve kimyasal tohum uygulaması görmüş ve kontrol olarak sadece steril suyla uygulama görmüş tohumlar viyollere ekilmiş ve iklim odasında çimlendirilmiştir. Çimlenmeden sonra her bir uygulama için ekilen tohum sayısı ve çimlenen tohum sayısı kaydedilerek çimlenen tohum %'si hesaplanmıştır. Uygulamalardaki çimlenen tohum sayısı, kontrol uygulamasındaki çimlenen tohum sayısına oranlanarak çimlenmedeki azalış oranı hesaplanmıştır. Uygulamaların % etkinliğinin açı değerleri alınarak, Anova istatistik programında Duncan çoklu karşılaştırma testinde $p \leq 0.05$ önem düzeyinde uygulamalar arasındaki istatistiki farklar saptanmıştır. Aynı istatistiki grupta yer alan uygulamalar aynı harfle işaretlenmiş ve sonuçlar yorumlanmıştır.

3.2.8.6. Fiziksel ve Kimyasal Tohum Uygulamalarının Bitki Gelişimine Etkisi

Tohum uygulamalarının sadece tohum çimlenmesinde etkisi değil aynı zamanda gelişen fide ve bitkiye olan etkisi de araştırılmıştır. Bu amaçla uygulama görmüş tohumlar iklim odası koşullarında karpuzun çiçeklenme evresine kadar yetiştirilmişlerdir. Bitki gelişimi çok iyi, iyi, orta, zayıf ve çok zayıf olarak Şekil 3.3'de görüldüğü gibi kategorize edilip, 1-5 skalası (1: Cılız yaprak ve gövde gelişimi ve çimlenme yeteneği az, çok zayıf gelişme; 2: Sarımsı yeşil yaprak gelişimi, nispeten kalın gövde ve çimlenme, zayıf gelişme; 3: Açık yeşil yaprak gelişimi, kalın gövde ve nispeten çimlenme tam, orta gelişme; 4: Yeşil yaprak gelişimi, kalın gövde ve çimlenme yeteneği tam, iyi gelişme; 5: Koyu yeşil yaprak gelişimi, kalın gövde ve çimlenme yeteneği tam, çok iyi gelişme) oluşturulmuş ve uygulamaların bitki gelişimine etkisi değerlendirilmiştir.



Şekil 3.3. Bitki büyümesi çok iyi, iyi, orta, zayıf ve çok zayıf olarak kategorize edilmiş karpuz fideleri

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Hastalık Belirtisi Gösteren Karpuz Bitkilerinin Toplanması

Adana ve Osmaniye illerinde 2009 ve 2010 yıllarının yaz aylarında, karpuz yetiştiriciliği yapılan 25 adet tarla ziyaret edilmiş bakteriyel meyve lekesi hastalığına benzer belirtiler gösteren örnekler toplanmıştır. Her tarladan hastalık belirtisi gösteren 2 meyve ve çok sayıda yaprak örneği alınmıştır. Yapılan laboratuvar çalışmaları sonucu 25 tarlanın 14'ünden bakteriyel meyve lekesi hastalığı etmeni izole edilmiştir (Çizelge 4.1).

Ziyaret edilen hasta bitkilerin bulunduğu bu tarlalarda renk açılması, sararma, düzensiz kahverengi lekeler ve yağ emmiş alanların varlığı yaprak belirtisi olarak kaydedilmiştir (Şekil 4.1). Meyve belirtisi olarak dış kabukta mumsu tabaka, su emmiş lekeler, bazı meyvelerde ise güneş yanığı benzeri sarı veya açık kahverengi leke belirtileri (Şekil 4.2), kabukta çatlama, çatlakların arasından dışarıya çıkan koyu kahverengi küçük damlalar şeklinde akıntı ve çatlakların arasından dışarıya çıkan beyaz köpük (Şekil 4.3) belirtileri tespit edilmiştir. Meyve kesildiğinde kabuk altında yer alan beyaz kısımda (meyve etinde) açık kahverengi renk değişimi saptanmıştır.

Üreticilerle yapılan görüşmelerde, yapraklardaki hastalık belirtilerinin dikkat çekici olmadığını, yapraklarda tipik olmayan belirtileri önemsemediklerini ancak meyve hasat zamanına yakın dönemde aniden şiddetli meyve belirtileri gözlediklerini bildirmişlerdir. Hatta bazı tarlalarda hiç yaprak belirtisi olmadan sadece meyve belirtilerinin olduğu saptanmıştır. Adana'nın Karataş ilçesindeki bir tarlada ve Osmaniye'nin Kadirli ilçesindeki bir tarlada meyvelerin tamamına yakını hastayken yaprakların sadece %10'unda yaprak belirtisi tespit edilmiştir. Hastalığın özellikle yağmurlama sulama yapılan tarlalarda çok şiddetli olduğu gözlenmiştir.

2010 yılının Ocak ve Şubat aylarında Antalya'daki ticari fideliklere yapılan ziyaretlerde toplanan şüpheli örneklerle yapılan laboratuvar çalışmaları sonucu 6 ticari fideliğin 2'sinden *Acidovorax citrulli* izole edilmiştir (Çizelge 4.1). Ziyaret edilen ticari fideliklerde fidelerin kotiledon yapraklarında su emmiş lekeler veya yanıklık belirtisi (Şekil 4.4) tespit edilmiştir.



Şekil 4.1. Karpuz yapraklardaki yağ emmiş alanlar (solda), sararma ve düzensiz kahverengi lekeler (sağda)



Şekil 4.2. Karpuz meyve kabuğundaki mumsu tabaka (solda), güneş yanığı benzeri sarı veya açık kahverengi lekeler (sağda)



Şekil 4.3. Karpuz meyve kabuğundaki çatlakların arasından dışarıya çıkan koyu kahverengi küçük damlalar (solda) ve beyaz köpük (sağda)



Şekil 4.4. Karpuz kotiledon yapraklarında tespit edilen su emmiş leke (solda) ve yanıklık (sağda)

Çizelge 4.1. Hasta karpuz bitkilerinin toplandığı alanlar hakkında bilgiler

No	Yer	Tarla/Fidelik	Yıl	Örneklenen Materyal
1	Doğankent beldesi, Yüreğir, Adana	Tarla	2009	Meyve
2	Taşçı köyü, Karataş, Adana	Tarla	2009	Meyve
3	Tuzla beldesi, Karataş, Adana	Tarla	2009	Meyve
4	Tuzla beldesi, Karataş, Adana	Tarla	2009	Meyve
5	Tuzla beldesi, Karataş, Adana	Tarla	2009	Meyve
6	Mecidiye köyü, Kadirli, Osmaniye	Tarla	2009	Meyve
7	Aşağı Çiyanlı köyü, Kadirli, Osmaniye	Tarla	2009	Meyve
8	Aydınlar köyü, Kadirli, Osmaniye	Tarla	2009	Meyve
9	Topraktepe köyü, Kadirli, Osmaniye	Tarla	2009	Meyve
10	Topraktepe köyü, Kadirli, Osmaniye	Tarla	2009	Meyve
11	Kesikeli köyü, Kadirli, Osmaniye	Tarla	2009	Meyve
12	Konaklı köyü, Yüreğir, Adana	Tarla	2010	Meyve
13	Hamamköy köyü, Kozan, Adana	Tarla	2010	Meyve
14	Tabaklar köyü, Karataş, Adana	Tarla	2010	Meyve
15	Serik, Antalya	Fidelik	2010	Yaprak
16	Manavgat, Antalya	Fidelik	2010	Yaprak

4.2. Hasta Karpuz Bitkilerinden Etmenin İzolasyonu

Adana ve Osmaniye illerinde, 2009 ve 2010 yıllarında ziyaret edilen hasta karpuz tarlalarından toplanan meyve ve yaprak örneklerinden King B besi yerine yapılan izolasyonda, iki gün sonra besi yerinde 2-3 mm çapında krem rengi koloniler gelişmiştir. *Acidovorax citrulli* için yarı seçici besi yeri olan P-278'de bir hafta sonra 2-3 mm çapında açık lila renginde yaşlandıkça rengi koyulaşan merkezi açık yeşil renkte haleli koloniler tespit edilmiştir. Tarladan alınan meyve ve yaprak örneklerinden 72 adet bölge izolatı elde edilmiştir. Antalya ilinde 2010 yılında ziyaret edilen ticari fideliklerde fide yanıklığı belirtisi gösteren karpuz fidelerinin yapraklarından 12 adet izolat elde edilmiştir. Doktora çalışmasındaki tüm surveyler sonucunda, her iki yılda yapılan izolasyonlar sonucu toplamda 84 bölge izolatı elde edilmiştir.

İzolatların tümüyle çalışma yapılma zorluğu göze alındığında, bu izolatlar içerisinden hasta her tarladan ve fidelikten birer izolat olmak üzere 14 tarla izolatı ve 2 fidelik izolatı olmak üzere 16 izolat seçilmiştir. Seçilen bu izolatlarla klasik,

serolojik ve moleküler testlerden oluşan tanı çalışmaları yapılmış ve izolatların listesi Çizelge 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4. 2. Tanı çalışmaları için seçilen izolatlar

No	İzolat Adı	Alındığı Yer	İzolasyon yeri	Etmen
1	HOS-1	Kozan/Adana	Meyve	*Acidovorax citrulli*
2	HOS-2	Kozan/Adana	Meyve	*Acidovorax citrulli*
3	HOS-3	Yüreğir/Adana	Meyve	*Acidovorax citrulli*
4	HOS-4	Yüreğir/Adana	Meyve	*Acidovorax citrulli*
5	HOS-5	Karataş/Adana	Meyve	*Acidovorax citrulli*
6	HOS-6	Karataş/Adana	Meyve	*Acidovorax citrulli*
7	HOS-7	Kadirli/Osmaniye	Meyve	*Acidovorax citrulli*
8	HOS-8	Kadirli/Osmaniye	Meyve	*Acidovorax citrulli*
9	HOS-9	Kadirli/Osmaniye	Meyve	*Acidovorax citrulli*
10	HOS-10	Kadirli/Osmaniye	Meyve	*Acidovorax citrulli*
11	HOS-11	Kadirli/Osmaniye	Meyve	*Acidovorax citrulli*
12	HOS-12	Kadirli/Osmaniye	Meyve	*Acidovorax citrulli*
13	HOS-13	Kadirli/Osmaniye	Meyve	*Acidovorax citrulli*
14	HOS-14	Kadirli/Osmaniye	Meyve	*Acidovorax citrulli*
15	HOS-15	Serik/Antalya	Yaprak	*Acidovorax citrulli*
16	HOS-16	Manavgat/Antalya	Yaprak	*Acidovorax citrulli*

4.3. Patojenite Testi

Çizelge 4.3'de görüldüğü gibi, iki farklı yöntemle yapılan patojenite çalışmalarında, 16 bölge izolatı ve referans izolatın tümü karpuz, kabak ve su kabağı fidelerinin yapraklarında su emmiş leke, kahverengi lezyonlar ve yanıklık belirtileri oluşturarak patojen oldukları tespit edilmiştir.

Birinci yöntemde spektrofotometre A_{600}:0.1 absorbans değerine denk gelen $4.3x10^8$ hücre/ml yoğunluğundaki süspansiyonundan, 10^5 hücre/ml yoğunluğunda hazırlanan bakteri süspansiyonuyla karpuz, kabak ve su kabağı yaprağının alt kısmından damar aralarına enjekte edilen bakteri süspansiyonu, su kabağı bitkilerinde 5 gün sonra hastalık belirtisi oluşturmuştur. Kabak ve karpuz bitkilerinde ise 7 günden sonra hastalık belirtileri tespit edilmiştir. Arazide yapraklarda meydana

gelen doğal enfeksiyonunda olduğu gibi sararma, yağ emmiş alan görünümü (Şekil 4.5) ve düzensiz kahverengi lekelenmeler patojenite testinde de tespit edilmiştir.

Aynı izolatlar, ikinci inokulasyon yöntemi olarak izolatların tek kolonisinden kürdan ucu yardımıyla alınıp iki yaprak sapının birleşim yerindeki gövdeye bulaştırıldığında, su kabağı fidelerinde 3 gün, karpuz fidelerinde 4 gün ve kabak fidelerinde 5 gün sonra sararma (Şekil 4.5) ve yanıklık şeklinde hastalık belirtisi gözlenmiştir. Negatif kontrol olarak sadece suyla inokule edilen bitkilerde herhangi bir hastalık belirtisi gözlenmemiştir.

Çizelge 4.3. İzolatlarla yapılan patojenite test sonuçları

İzolat Adı	**Birinci Yöntem**			**İkinci Yöntem**		
	Su Kabağı (5. gün)	**Karpuz (7. gün)**	**Kabak (7. gün)**	**Su Kabağı (3. gün)**	**Karpuz (4. gün)**	**Kabak (5. gün)**
HOS-1	+	+	+	+	+	+
HOS-2	+	+	+	+	+	+
HOS-3	+	+	+	+	+	+
HOS-4	+	+	+	+	+	+
HOS-5	+	+	+	+	+	+
HOS-6	+	+	+	+	+	+
HOS-7	+	+	+	+	+	+
HOS-8	+	+	+	+	+	+
HOS-9	+	+	+	+	+	+
HOS-10	+	+	+	+	+	+
HOS-11	+	+	+	+	+	+
HOS-12	+	+	+	+	+	+
HOS-13	+	+	+	+	+	+
HOS-14	+	+	+	+	+	+
HOS-15	+	+	+	+	+	+
HOS-16	+	+	+	+	+	+
Aac-8408	+	+	+	+	+	+
Steril su	-	-	-	-	-	-

İkinci yöntemde hastalık belirtilerinin daha kısa sürede ortaya çıkması nedeniyle daha başarılı bir yöntem olarak değerlendirilmiştir. Patojenite çalışmalarında kullanılan karpuz, kabak ve su kabağı bitkileri arasında, her iki inokulasyon yönteminde de ilk hastalık belirtileri Korsika çeşidi su kabağında ortaya çıkmış daha sonra Crimson Tide çeşidi karpuz fidelerinde en son olarak da Amcostar çeşidi kabak fidelerinde hastalık belirtileri gözlenmiştir.



Şekil 4.5. Patojenite testinde şırınga inokulasyonu sonucu karpuz yapraklarında oluşan yağ emmiş alanlar (solda) ve kürdan inokulasyonu sonucu su kabağı yapraklarında sararma (sağda)

Koch Postulatlarına ait işlemleri tamamlamak amacıyla yapılan çalışmalarda, tipik hastalık simptomu gösteren bitkilerden yapılan re-izolasyonlar sonucu 17 adet re-izolat (16 bölge izolatı ve bir referans) tekrar elde edilmiştir.

4.4. Hasta Bitkilerden Elde Edilen İzolatların Klasik Testlerle Tanısı

Hastalık belirtisi gösteren karpuz meyveleri ve fidelerinden izole edilen 16 bölge izolatı ve bir referans izolat olmak üzere 17 adet re-izolatla yapılan tanı çalışmaları sonucunda, tüm izolatların koloni morfolojilerinin birbirine benzer olduğu saptanmıştır. İzolatlar, King B besi yerinde non-floresan tipte, Nutrient agar besi yerinde 2-3 mm çapında küçük krem rengi koloniler üretirken yarı seçici besi yeri olan P-278'de 2-3 mm çapında açık lila renginde koloniler üretmiştir. Tüm izolatlar gram negatif özellikte, levan tipte olmayan koloniye sahip, oksidaz pozitif, patateste pektolitik aktivitesi negatif, arginin dehidrolaz aktivitesi negatif, tütünde aşırı duyarlılık reaksiyonu pozitif olarak belirlenmiştir (Çizelge 4. 4).

Klasik tanılama testlerinde kullanılmak üzere seçilen 16 bölge izolatı, genel ve yarı seçici besi yerinde (King B, Nutrient agar, ve P-278) koloni morfolojisi, potasyum hidroksit (KOH) ile gram boyama ve LOPAT test sonuçları, referans kültür ile aynı sonuçları vererek *Acidovorax citrulli* olarak tanılanmıştır.

Çizelge 4.4. Bakteri izolatlarının test sonuçları

İzolat Adı	Gram Reaksiyon	Floresan pigmentasyon	L	O	P	A	T
HOS-1	-	Non-floresan	-	+	-	-	+
HOS-2	-	Non-floresan	-	+	-	-	+
HOS-3	-	Non-floresan	-	+	-	-	+
HOS-4	-	Non-floresan	-	+	-	-	+
HOS-5	-	Non-floresan	-	+	-	-	+
HOS-6	-	Non-floresan	-	+	-	-	+
HOS-7	-	Non-floresan	-	+	-	-	+
HOS-8	-	Non-floresan	-	+	-	-	+
HOS-9	-	Non-floresan	-	+	-	-	+
HOS-10	-	Non-floresan	-	+	-	-	+
HOS-11	-	Non-floresan	-	+	-	-	+
HOS-12	-	Non-floresan	-	+	-	-	+
HOS-13	-	Non-floresan	-	+	-	-	+
HOS-14	-	Non-floresan	-	+	-	-	+
HOS-15	-	Non-floresan	-	+	-	-	+
HOS-16	-	Non-floresan	-	+	-	-	+
Aac-8408	-	Non-floresan	-	+	-	-	+

L: levan tipte koloni üretimi; O: oksidaz testi, P: patateste pektolitik aktivite, A: arginin dehidrolaz aktivitesi, T: tütünde aşırı duyarlılık reaksiyonu

4.5. Hasta Bitkilerden Elde Edilen İzolatların Serolojik Tanısı

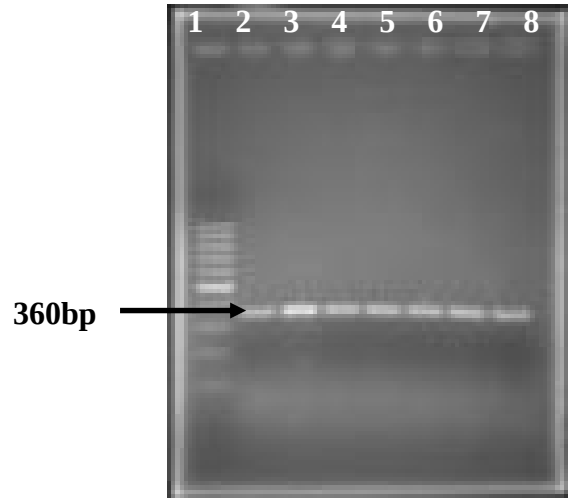
Akdeniz Bölgesinin farklı illerden Adana, Antalya ve Osmaniye'den izole edilen, klasik testlere göre *Acidovorax citrulli* olarak tanılanan karpuz izolatlarının tanı sonucunu desteklemek amacıyla monoklonal antiserumla yapılan Das-ELISA testinde, 405nm'de yapılan okumada tüm izolatların absorbans değerleri 1.696-3.432 arasında kaydedilmiştir (Çizelge 4. 5). Pozitif kontroldeki absorbans değeri 3.324 iken negatif kontrolde 0.732 (sağlıklı karpuz yaprağı) ve 0.065 (buffer) olarak belirlenmiştir. Elde edilen absorbans değerlerinin negatif kontrol değerinin 2 katından fazla oluşu ve pozitif kontrole yakın oluşuyla tüm testlenen izolatların *Acidovorax citrulli* olduğu ELISA testiyle de doğrulanmıştır.

Çizelge 4.5. İzolatların ELISA okuma değerleri

İzolat Adı	1.Kuyu	2.Kuyu	Ortalama	Sonuç
HOS-1	3.258	3.274	3.266	Pozitif
HOS-2	3.295	3.320	3.307	Pozitif
HOS-3	3.356	3.321	3.338	Pozitif
HOS-4	3.429	3.435	3.432	Pozitif
HOS-5	3.406	3.411	3.408	Pozitif
HOS-6	3.287	3.334	3.310	Pozitif
HOS-7	3.419	3.389	3.404	Pozitif
HOS-8	3.415	3.425	3.420	Pozitif
HOS-9	3.341	3.372	3.356	Pozitif
HOS-10	3.285	3.292	3.288	Pozitif
HOS-11	3.292	3.276	3.284	Pozitif
HOS-12	2.445	0.948	1.696	Pozitif
HOS-13	3.423	3.441	3.432	Pozitif
HOS-14	3.407	3.392	3.399	Pozitif
HOS-15	3.299	3.335	3.317	Pozitif
HOS-16	3.414	3.415	3.414	Pozitif
Referans Kültür	3.338	3.309	3.323	Pozitif
Sağlıklı Bitki	0.732	0.732	0.732	Negatif
Ekstraksiyon Bufferi	0.065	0.064	0.064	Negatif

4. 6. Hasta Bitkilerden Elde Edilen İzolatlarının Moleküler Tanısı

Karpuz meyve ve yapraklarından izole edilen bakteri izolatları ve WFB1 (5’-GAC CAG CCA CAC TGG GAC-3’) ve WFB2 (5’-CTG CCG TAC TCC AGC GAT-3’) primer çifti kullanılarak yapılan PCR işlemlerinde tüm izolatlar agaroz jelde 360 bp büyüklüğünde *Acidovorax citrulli*’ye spesifik bantlar oluşturduğu saptanmıştır (Şekil 4. 6). Karpuzdan izole ettiğimiz izolatların PCR yöntemiyle *Acidovorax citrulli* olduğu moleküler düzeyde saptanmıştır. Burada elde edilen sonuçların da, daha önce yaptığımız LOPAT testleri, patojenite ve serolojik testlerin birbirini desteklediği görülmektedir.



Şekil 4.6. PCR ürünlerinin agaroz jel üzerinde oluşturduğu bantlar (çukurlar: 1: 100 bp'lik markır, 2: Aac-8408 kodlu referans izolat, 3: HOS-1 kodlu izolat, 4: HOS-2 kodlu izolat, 5: HOS-3 kodlu izolat, 6: HOS-4 kodlu izolat, 7: HOS-5 kodlu izolat, 8: HOS-6 kodlu izolat)

4.7. Ülkemize İthal Gelen Karpuz Tohum Lotlarının ve İç Karantina Amaçlı Gelen Karpuz Fidelerinin Patojenin Varlığı Yönünden İncelenmesi

Ülkemize 2009-2012 yılları arasında 16 farklı ülkeden ithal edilen 48 çeşide ait 217 adet karpuz ve karpuz anacı tohum lotları, 6968 sayılı Zirai Karantina Numune Alma ve Analiz Yönetmeliği'ne göre yarı seçici özellikteki bufferda tohumların çalkalanması, yarı seçici besi yerine ekim, IF boyama yöntemi, Das-ELISA, floresan pigmentasyon, gram reaksiyon, oksidaz, tütünde aşırı duyarlılık ve patojenite testlerine göre *Acidovorax citrulli* bulaşıklığı yönünden incelenmiş ve tohum lotlarının hiç birinde bu patojene rastlanmamıştır.

İlk yıl karpuz tohumları parçalanmadan analiz edilmiş ve sonraki üç yıl tohumlar parçalanarak kullanılmıştır. İlk yıl analizlerde 50 gr tohum kullanılırken son üç yıl 450-500 gr (10.000-30.000 adet) kullanılmıştır. İlk yıl karantina laboratuvarlarında sadece karpuz tohumları analize tabi tutulurken 2010 yılından itibaren karpuz, kavun, hıyar, kabak ve bunların anaçlarına ait tohumlar incelenmiştir. Dutta ve ark., (2012b) *Acidovorax citrulli*'nin tohumda bulunduğu yerin, tohum sağlık testlerinde patojenin saptanmasına etkisinin olup olmadığını araştırdıkları çalışmasında, tohumun tüm veya parçalanarak kullanılmasının,

tohumda bakterinin yaşamını sürdürdüğü yere göre farklı sonuç verdiğini bildirmektedir. Patojen, karpuza stigmadan pistil inokulasyonu sonucu erkek organdan bulaşmışsa tohum embriyosuna yerleşirken, karpuza ovaryumdan perikarp inokulasyonu sonucu dişi organdan bulaşmışsa tohum kabuğuna yerleşmektedir. Embriyoya yerleşen bakteriyi ararken, tohum tüm olarak kullanıldığında patojenin varlığı belirlenememişken, tohum parçalanarak kullanıldığında tohumdaki patojen bakterinin varlığı saptanmıştır. Tohum kabuğuna bulaşmış bakteri, her iki yolla (tohum tüm olarak veya parçalanarak) ekstrakte edildiğinde tohumda patojenin varlığı belirlenebilmiştir. Dutta ve ark., (2012b)'nin bulguları tohum lotlarında patojeni ararken kullandığımız yöntemi güncellememiz gerektiğini doğrulamaktadır. Patojen eğer embriyoda bulunuyorsa tohumu parçalamadan testlere tabii tuttuğumuzda, patojenin varlığını belirleyememe olasılığımız bulunmaktadır. Bu nedenle, ülkemizde bu patojenle çalışan araştırıcıların ve karantina personelinin önerileri doğrultusunda Hollanda Bitki Koruma Servisinden de destek alınarak karantina işlemlerimiz 2010 yılının Mart ayında güncellenmiştir. Tohum ekstrakte etme yöntemi, testlemede kullanılacak tohum miktarı, ürün çeşitliliğinde değişiklik yapılmıştır.

Tohum sağlık testlerinde pek çok ülkede patojen varlığı yönünden analiz yapıldıktan sonra tohum ilaçlanır (Morrison, 1999). Bizim ülkemizde ise tohumlar analize geldiğinde yoğun ilaçlı ve boyalıdır. İlaçlar içindeki boyar maddeler, besi yerini kapladığından bakteri büyümesi engellenmektedir. Benzer durum Tokgönül (1998) de bahsedilmiştir.

Ülkemize 2009-2012 yılları arasında iç karantina amaçlı (11/06/2010 tarihli ve 5996 sayılı Veteriner Hizmetleri, Bitki Sağlığı, Gıda ve Yem Kanununun 15, 17, 31, 32 ve 38 inci maddelerine dayanılarak hazırlanan Bitki Pasaportu Sistemi ve Operatörlerin Kayıt Altına Alınması hakkındaki yönetmeliğe göre) karpuz fidelerinde yapılan incelemelerde sadece Antalya'nın Serik ve Manavgat ilçelerindeki ticari fideliklerden getirilen şüpheli karpuz fidesi örneklerinden *Acidovorax citrulli* adlı patojen bakteri saptanmıştır. Altı ticari fidelikten alınan örneklerin ikisinde patojenin varlığı tespit edilmiştir. Patojenle bulaşık tohum yetiştirildiğinde ilk hastalık belirtileri kotiledon yapraklarda gözlenir. Ticari

fideliklerden bakteriyi izole etmemiz, buraya patojenin tohumla bulaştığı fikrini ortaya çıkarmıştır. Patojeni fidelik evresinde saptarken tohumda saptayamamış olma nedenleri çok farklı olabilir. Kullandığımız yöntemin duyarlılığı, alınan örnekte bulaşık tohumun rast gelmeme olasılığı, çalışılan tohum miktarının azlığı, testi yapan personelin tecrübesi gibi faktörler etkili olabilir.

Sonuç olarak, 2009 yılında ülkemizde meydana gelen hastalık epidemisinin ana nedeni olarak hasta üretim materyali (tohum veya fide) düşünülse de 2009-2012 yılları arasında yapılan incelemelerde, 217 adet tohum lotunda patojenin tespit edilmeme nedeni olarak; tohumların parçalanmadan analize alınması, analizlerde çok az miktarda tohum örneği ile çalışılması, analiz edilen tohumların yoğun ilaçlı olması, patojenin sadece karpuz tohumlarında aranmış olmasından kaynaklanabilir. İnokulum ülkemize bulaşık karpuz anaçları veya diğer kabakgil türleriyle giriş yapmış olabileceği fikri de göz ardı edilmemelidir.

Pek çok karpuz anacına ait tohumlar ve diğer kabakgil tohumları ülkemize giriş yaparken, 2010 yılına kadar *Acidovorax citrulli*'nin varlığı yönünden hiçbir analize tabii tutulmamıştır. Tohumların genellikle uzak doğu ülkelerinden ithal edildiğini göz önüne alırsak, bu ülkelerdeki *Acidovorax citrulli*'nin bulaşıklılık durumunu incelemek gerekir. Son yirmi yıldır tüm karpuz ve kavun yetiştirilen ülkelerde kullanılan tohumlar Çin'de üretilmektedir (Feng ve ark., 2013). Çin'de tarlalarda (Ren ve ark., 2006) ve kabakgil tohumlarında (Ren ve ark., 2004; Ren ve ark., 2006; Zhao ve ark., 2006; Xu ve ark., 2008) *Acidovorax citrulli*'nin varlığının saptanması tüm dünya için tehlike olarak değerlendirilmektedir (Feng ve ark., 2013). Çin'de bu etmen sadece karpuz (Zhao ve ark., 2006) ve kavun (Ren ve ark., 2004) tohumlarında değil aynı zamanda çerezlik karpuz tohumlarında (Ren ve ark., 2006) da saptanmıştır. Bu hastalık etmeninin ülkemize karpuz anaçlarına ait tohumlar vasıtasıyla girmiş olma ihtimali olasıdır.

1990'ların ortasında bu hastalığın yoğun epidemi yaparak karpuz yetiştirilen pek çok ülkede benzer yıllarda ortaya çıkışının nedeni olarak bulaşık üretim materyali olduğu düşünülmüştür (Burdman ve Walcott, 2012). ABD'de 4 farklı eyalette aynı yıllarda meydana gelen epidemi sonucu üreticiler tohum firmalarını mahkemeye vermiş ve bu epidemiden üretim materyali sorumlu tutulmuştur. Sonuçta

birkaç küçük tohum firması kapanmak zorunda kalmıştır (Latin ve Hopkins, 1995; Bahar ve Burdman, 2010; Burdman ve Walcott, 2012). 1990'lı yıllarda hastalığın tüm dünyada hızlı yayılışının ana nedeni olarak global tohum üretim yerlerinin aynı ülkeler oluşu ve dünyadaki aktif tohum ticareti olarak değerlendirilebilir (Burdman ve Walcott, 2012). Tek bir tohumda sadece 10 adet *Acidovorax citrulli* hücresi bulunduğunda, ticari fideliklerde sera koşullarında yüksek nem ve sıcaklık altında bulaşık tohum yetiştirildiğinde o tohum partisinden gelişen fidelerin büyük kısmında hastalık gözlenebilir (Dutta ve ark., 2012b). Bazen bu fidelerde hastalık belirtileri gözlenmeden inokulum epifitik kalabilir. Ticari fidelikte sağlıklı yetiştirildiği düşünülen ancak patojenle bulaşık fideler tarlaya gönderildiğinde uygun iklim şartlarında hastalık gözlenebilir. 30.000-50.000 adet tohumdan sadece bir tanesinde 10 adet *Acidovorax citrulli* hücresinin varlığını karantina laboratuvarlarında saptamak gerçekten zor bir iştir. Kullanılan yöntemin son derece duyarlı olması gerekir. Karantina laboratuarlarında patojenin saptanmasında kullanılan tohum ekstaksiyon sıvısının içeriği, ekstraksiyon yöntemi, tohumların çalkalanma esnasındaki ortam sıcaklığı, patojenin tohumda bulunduğu yer ve tohumun parçalanma veya tüm olarak kullanımı gibi pek çok faktör etkilidir (Gitaitis ve Walcott, 2007; Dutta ve ark., 2012b). Ancak pek çok tohum testleme laboratuvarının en az 30.000 adet tohumla yapılan fidede belirti izleme testini öncelikle kullandığını düşündüğümüzde bu yöntemin yetersiz kalması gayet doğaldır. Çalışmamız boyunca *Acidovorax citrulli*'nin varlığı yönünden incelenen karpuz lotlarında patojeni saptayamadık, ülkemize giriş yapan karpuz tohumlarında düşük popülasyonda varlığını sürdürme olasılığını da göz önüne almak gerekir. Bu hastalık etmeninin ülkemize düşük popülasyonda bulaşık karpuz tohumları vasıtasıyla girmiş olma ihtimali de olasıdır.

Karantina laboratuvarlarında kullanılan rutin testlerde PCR gibi hızlı ve duyarlı yöntemlerin kullanılması yararlı olacaktır (Feng ve ark., 2013). Ancak tohumlarda bulunan bazı inhibitör maddelerin varlığı PCR'da kullanılan Taq polimeraz enziminin çalışmasını engelleyerek moleküler yöntemlerin kullanımını sınırlandırmaktadır (Tokgönül, 1998). Pek çok araştırıcı *Acidovorax citrulli*'nin tohumlardan saptanmasında PCR'a dayalı testlerin çok daha duyarlı olduğunu

belirtse de tohumdaki PCR'ı engelleyen koşullar nedeniyle halen karantina laboratuvarlarında bu yöntem rutin olarak kullanılmamaktadır (Burdman ve Walcott, 2012). Sonuç olarak bu sorunların aşılarak, üretim materyalindeki canlı bakteri popülasyonunu belirleyecek BIO-PCR'a dayalı hızlı ve duyarlı yöntemlerin gelecekte karantina laboratuvarlarında rutin olarak kullanılabilir şekilde modifiye edilmesi faydalı olacaktır (Zhao ve ark., 2009). Ayrıca, olanaklar elverdikçe real-time BIO-PCR yönteminin kullanılması hem zaman açısından fayda sağlayacaktır hem de personellerin kanserojen olan EtBr gibi kimyasalların olumsuz etkilerinden korunmuş olacaktır.

4.8. Bakteriyel Fide Yanıklığı Hastalığının Mücadelesinde Tohum Uygulamaları

Tohumda yaşamını sürdüren *Acidovorax citrulli*'ye karşı etkili yöntemlerden biri, tohum kökenli inokulumla mücadele etmektir. *Acidovorax citrullii*'nin bir bölge izolatıyla $4.3x10^8$ hücre/gr tohum inokulum miktarıyla bulaştırılan Crimson sweet çeşidi kapuz tohumlarına 21 farklı fiziksel ve kimyasal tohum uygulamaları yapılmadan önce bir ön deneme yapılmıştır. Daha sonraki farklı iki yılda yapılan denemelerin sonucuna göre uygulamalar bakteriyel fide yanıklığı hastalığını %61-91 oranında baskılamıştır. Hiçbir uygulama tamamen başarı göstererek tohumdaki inokulumun tümünü yok etmemiştir. Pozitif kontrol olarak sadece patojenle bulaştırılmış tohumlardaki hastalık çıkışı ortalama %89 olurken, negatif kontrol olarak steril suyla uygulama görmüş tohumlardan gelişen fidelerde hastalık belirtisi kaydedilmemiştir. Uygulama görmüş tohumlardaki çimlenme oranı %78-100 arasında olmuştur. Bazı uygulamalar (65^oC'deki sıcak su) tohumun çimlenmesini engellerken bazı uygulamalar (%30'luk laktik asit) da fide gelişimini zayıflatmıştır. Ön deneme ve farklı zamanlarda yapılan iki denemede elde edilen sonuçlar aşağıda detaylı olarak anlatılmıştır.

4.8.1. Fiziksel ve Kimyasal Tohum Uygulamalarının Bakteriyel Fide Yanıklığı Hastalığına Etkisi

Ön Deneme: Ön deneme amaçlı yapılan çalışmada sadece kimyasal tohum uygulamalarının etkinliği ortaya konmuştur. Negatif kontrol olarak sadece steril suya daldırılan tohumlarda herhangi bir hastalık gözlenmemiştir. Bu durum denemede kullandığımız tohumların sağlıklı olduğunun göstergesidir. Çizelge 4. 6'da görüldüğü gibi, ön denemede sadece *Acidovorax citrulli* ile bulaştırılan hiçbir uygulama yapılmamış 1500 adet tohumdan 1395 adeti çimlenmiş, çimlenen fidelerin 1366'sında hastalık belirtileri saptanmış ve fidelerdeki ortalama hastalık oranı %97.91 olarak belirlenmiştir. Bu oranda bulaşık tohumlara fiziksel ve kimyasal tohum uygulamaları yapıldığında fidelerdeki hastalık gelişimi farklı düzeylerde tespit edilmiştir.

Tohumlar %0.525'lik NaOCl'de 20 dakika bekletildiğinde 1500 tohumun 1383 adeti çimlenmiş, bu tohumların hiçbir uygulama yapılmamış 1500 adet tohumdan 1395 adeti çimlenmiş, çimlenen fidelerin 1155 adetinde hastalık belirtileri saptanmış ve fidelerdeki ortalama hastalık oranı %83.57 olarak belirlenmiştir. Bu tohum uygulaması hastalık çıkışını sadece %14.64 oranında engelleyerek etkisiz bir uygulama olarak değerlendirilmiştir.

Tohumlar %1.8'lik HCl'e 5 dakika daldırıldığında gelişen 1425 adet fidenin sadece 75 adetinde hastalık saptanmış, ortalama hastalık oranı %5.26 olarak belirlenmiş ve bu tohum uygulaması %94.62 düzeyinde etki gösteren en başarılı uygulama olarak değerlendirilmiştir.

Başarılı bir tohum uygulaması olan %1.8'lik HCl ve %0.525'lik NaOCl kombine edilerek 1500 adet tohum bu çözeltiye 15 dakika daldırıldığında tohumların 1335 adeti çimlenmiş, gelişen fidelerin 270 adetinde hastalık belirtileri tespit edilmiş ve fidelerdeki ortalama hastalık oranı %20.22 olarak belirlenmiştir. Bu kombinasyon hastalık oluşumunu %79.34 oranında baskılayan bir tohum uygulaması olarak değerlendirilmiştir.

Çizelge 4. 6. Kimyasal Tohum Uygulamalarının Bakteriyel Fide Yanıklığı Hastalığına Etkisi (Ön Deneme)

Uygulamalar	Fide Sayısı	Hastalıklı Fide Sayısı	Hastalık %'si	Ortalama Hastalık %'si	% Etki
Steril su Negatif Kontrol	498	0	0	0.00	-
	495	0	0		
	492	0	0		
Patojen Pozitif Kontrol	467	457	97.86	97.92 a	-
	465	455	97.85		
	463	454	98.06		
%0.525'lik NaOCl 20 dakika	458	387	84.50	83.58 b	14.65
	461	385	83.51		
	463	383	82.72		
%1.8'lik HCl 5 dakika	472	26	5.51	5.26 f	94.62
	475	25	5.26		
	478	24	5.02		
%1.8'lik HCl + %0.525'lik NaOCl 15 dak	444	87	19.59	20.22 c	79.35
	445	90	20.22		
	446	93	20.85		
%30'luk laktik asit 15 dakika	49	7	14.29	13.58 e	86.13
	43	6	13.95		
	40	5	12.50		
%30'luk laktik asit 20 dakika	23	4	17.39	17.41 d	82.22
	21	4	19.05		
	19	3	15.79		
%30'luk laktik asit 30 dakika	8	1	12.50	13.69 e	86.02
	7	1	14.29		
	7	1	14.29		

Tohumlar %30'luk laktik asit çözeltisine 15 dakika daldırıldığında toplamda 300 adet tohumun sadece 132 adeti çimlenmiştir. Çimlenen 132 adet fidenin 18'inde hastalık belirtileri gözlenmiş ve ortalama hastalık %'si 13.57 olarak saptanmıştır. Bu uygulama %86.14 oranında başarı gösterip etkili olarak görülmesine rağmen tohumun çimlenmesine olumsuz etki yapmasından dolayı önerilecek bir uygulama olamamıştır. Benzer şekilde 300 adet tohum %30'luk laktik asit çözeltisine 20 dakika daldırıldığında tohumların sadece 63 tanesi çimlenmiş, gelişen fidelerin 11 tanesinde hastalık saptanmıştır. Ortalama hastalık %'sinin 17.40 olduğu ve %82.22 oranında hastalık çıkışını baskılayan bu uygulama yine tohum çimlenmesine olumsuz etki yapmıştır. Aynı şekilde benzer bulgular bu çözeltiye 30 dakika batırılan tohumlarda da elde edilmiştir. Tohumların laktik asit içinde bekletme süresi arttıkça hastalık engellenme oranı %86.02'ye çıkarken tohumun çimlenme yeteneği daha da azalmıştır. Bu uygulamada 300 fidenin sadece 22 adedi çimlenmiştir. Yapılan bu ön

deneme sonucunda %30'luk laktik asit uygulamasının çimlenmeye yaptığı olumsuz etkiden dolayı ilerdeki denemelerde kullanılamayacağına karar verilmiştir.

Ön denemede sadece altı tohum uygulamasının etkinliği ortaya konulmuş ve bu tohum uygulamaları karpuz fidelerinde bakteriyel yanıklık hastalığını %15 ile %95 arasında değişen oranlarda hastalık çıkışını engellemiştir. Bu deneme genel olarak istatistiki açıdan incelendiğinde, uygulamaların tümü pozitif kontrolden farklı gruplarda yer alarak, farklı düzeylerde hastalık çıkışını engelleyen başarılı uygulamalar olarak değerlendirilmiştir. Tohumların %1.8'lik HCl'e 5 dakika daldırılması hastalık çıkışını %95 oranında engelleyen en başarılı uygulama olarak değerlendirilmiştir. Tohumların %30'luk laktik asit çözeltisine 15 ve 30 dakika daldırılması hastalık çıkışını %86 oranında baskılamış ve bu iki uygulama aynı istatistiki grupta yer almıştır. Başarı sırasına göre sıralama yapıldığında, tohumların %30'luk laktik asit çözeltisine 20 dakika daldırılması hastalık çıkışını %82 oranında baskılamış ve uygulama ayrı bir grup olmuştur. İki uygulamanın kombinasyonu olan %1.8'lik HCl ve %0.525'lik NaOCl çözeltisine tohumların 15 dakika daldırılmasında hastalık çıkışını %79 oranında baskılanmıştır. Bu denemede en az etkiye sahip tohum uygulaması olarak %15 başarı gösteren %0.525'lik NaOCl'de tohumların 20 dakika batırıldığı uygulama olmuştur ve ayrı bir istatistiki grupta yer almıştır.

Birinci Deneme: Çizelge 4. 7'de görüldüğü gibi, 15 farklı fiziksel ve kimyasal tohum uygulamaları, karpuz fidelerinde bakteriyel fide yanıklığı hastalığını % 85-100 oranında baskılamıştır. *Acidovorax citrulli* etmeni ile bulaştırılmış pozitif kontrol uygulamasında 300 adet tohumdan 299 adeti çimlenmiş ve çimlenen fidelerin 256 adetinde hastalık simptomu meydana gelmiştir. Pozitif kontrolde yer alan fidelerdeki ortalama hastalık oranı %85.61 olarak belirlenmiştir.

%1.8'lik HCl 5 dakika bekletilen tohumların 299 adeti çimlenmiş, sadece 42 adetinde hastalık belirtisi görülmüştür. Ortalama hastalık oranı %14.04 olarak belirlenmiş ve bu tohum uygulaması %83.60 oranında hastalık çıkışına etkili olmuştur. Bu uygulama istatistiki olarak tek bir grup oluşturmuştur.

Karpuz tohumları 50°C sıcak suda 10 dakika bekletildiğinde 288 adet tohum çimlenmiş ve bu çimlenen tohumlardan 36 adedinde hastalık gözlenmiştir. Ortalama hastalık oranı %12.63 olarak belirlenmiş ve bu tohum uygulaması %85.25 oranında

hastalık gelişimini engellemiştir. Tohumlar 55°C sıcak suda 10 dakika bekletildiğinde 294 adet fidenin 37'sinde hastalık gözlenmiştir. Ortalama hastalık oranı %12.58 olarak belirlenmiş ve bu uygulama diğer uygulamayla yakın değer olan %85.31 oranında hastalığı baskılamıştır. Bu iki uygulama arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmamış ve bir grup oluşturmuştur.

Çizelge 4.7. Fiziksel ve Kimyasal Tohum Uygulamalarının Bakteriyel Fide Yanıklığı Hastalığına Etkisi (Birinci Deneme)

Uygulamalar	Fide Sayısı	Hastalıklı Fide Sayısı	Hastalık %'si	Ortalama Hastalık %'si	% Etki
Patojen Pozitif Kontrol	99	82	82.83	85.61 a	-
	100	86	86.00		
	100	88	88.00		
50°C sıcak su 10 dakika	93	18	19.35	12.63 bc	85.25
	96	11	11.46		
	99	7	7.07		
50°C sıcak su 15 dakika	92	5	5.43	6.68 bcd	92.20
	94	5	5.32		
	97	9	9.28		
50°C sıcak su 20 dakika	96	0	0.00	2.02 ef	97.64
	98	3	3.06		
	100	3	3.00		
55°C sıcak su 10 dakika	97	8	8.25	12.58 bc	85.31
	98	18	18.37		
	99	11	11.11		
55°C sıcak su 15 dakika	88	4	4.55	5.15 de	93.99
	89	3	3.37		
	93	7	7.53		
55°C sıcak su 20 dakika	91	1	1.10	0.37 f	99.57
	97	0	0.00		
	99	0	0.00		
60°C sıcak su 10 dakika	93	1	1.08	4.56 de	94.67
	94	7	7.45		
	97	5	5.15		
60°C sıcak su 15 dakika	99	3	3.03	2.02 def	97.64
	99	2	2.02		
	100	1	1.00		
60°C sıcak su 20 dakika	97	1	1.03	0.68 f	99.21
	97	0	0.00		
	99	1	1.01		
65°C sıcak su 10 dakika	Tohumlar Çimlenmemiştir.				

65°C sıcak su 15 dakika	Tohumlar Çimlenmemiştir.				
65°C sıcak su 20 dakika	Tohumlar Çimlenmemiştir.				
%0.525'lik NaOCl 20 dakika	99	7	7.07	6.02 cde	92.96
	100	8	8.00		
	100	3	3.00		
%1.8'lik HCl 5 dakika	99	13	13.13	14.04 b	83.60
	100	9	9.00		
	100	20	20.00		
%1.8'lik HCl + %0.525'lik NaOCl 15 dk	94	0	0.00	2.06 ef	97.59
	95	2	2.11		
	98	4	4.08		
%2'lik laktik asit 10 dakika	92	2	2.17	2.09 def	97.56
	97	2	2.06		
	98	2	2.04		
%2'lik laktik asit 15 dakika	94	1	1.06	2.06 def	97.60
	98	1	1.02		
	98	4	4.08		
%2'lik laktik asit 20 dakika	95	0	0.00	0.34 f	99.61
	95	0	0.00		
	99	1	1.01		

Kimyasal bir uygulama olan %0.525'lik NaOCl'de 20 dakika bekletilen tohumlardan 299 adedi çimlenmiş ve sadece 18 adedinde hastalık gözlenmiştir. Bu uygulamanın ortalama hastalık çıkışı %6.02 ve %92.06 oranıyla hastalık gelişimini engellemiştir.

Fiziksel bir tohum uygulaması olan 50°C'deki sıcak suda 15 dakika bekletilen tohumlardan 283 adedi çimlenmiş ve sadece 19 adedinde hastalık belirtisi gözlenmiştir. Ortalama hastalık yüzdesi %6.68 olarak bulunmuş ve bu uygulamanın hastalığa etkisi %92.20 olarak tespit edilmiştir.

Tohumlar 55°C sıcak suda 15 dakika bekletildiğinde 270 adet tohum çimlenmiş ve 14 adedinde hastalık gözlenmiştir. Bu oranlarla ortalama hastalık %5.15 iken, bu uygulamanın hastalığa etkisi %93.99 oranında tespit edilmiştir. İstatistiki olarak değerlendirildiğinde bu üç tohum uygulaması aynı grupta yer almıştır. Bir diğer sıcak su uygulamasında 60°C'de 10 dakika bekletilen tohumların 299 adedi çimlenmiş ve sadece 6 adedinde hastalık tespit edilmiştir. Bu tohum uygulamasında ortalama hastalık %4.56 oranında olup, uygulamanın hastalığa etkisi

ise %94.67 oranında oldukça başarılı bulunmuştur. İstatistiki olarak değerlendirildiğinde bu iki uygulama aynı grupta yer almıştır.

Tohumlar %2'lik laktik asit içinde 10 dakika bekletildiğinde 287 adet fidenin sadece 6 adetinde hastalık belirtisi gözlenmiştir. Ortalama hastalık oranı %2.09 değerinde olup, uygulamanın hastalığı engelleme düzeyi %97.56 olarak tespit edilmiştir. Tohumlar %2'lik laktik asit içinde 15 dakika bekletildiğinde 290 adet fidenin sadece 6 adetinde hastalık belirtisi gözlenmiştir. Ortalama hastalık oranı %2.06 değerinde olup, uygulamanın hastalığı engelleme düzeyi %97.60 olarak tespit edilmiştir. 60°C sıcak suda 15 dakika bekletilen tohumlardan oluşan diğer bir fiziksel uygulamada 298 adet tohum çimlenmiş ve sadece 6 adedinde hasta fide gelişimi gözlenmiştir. Bu uygulamada ortalama hastalık oranı %2.02 olup, uygulamanın hastalığa etkisi ise %97.64 olarak belirlenmiştir. İstatistiki olarak değerlendirildiğinde bu üç uygulama aynı grupta yer almıştır.

Tohumlar 50°C sıcak suda 20 dakika bekletildiğinde 294 adedi çimlenmiş ve sadece 6 adedinde hastalık gözlenmiştir. Bu uygulamanın ortalama hastalık oranı %2.02 olup, hastalığa etkisi ise %97.64 olarak belirlenmiştir. Bir diğer kimyasal uygulama olan hidroklorik asit ve NaOCl kombinasyonu olan %1.8'lik HCl + %0.525'lik NaOCl 15 dk bekletilen tohumlardan 287 adedi çimlenmiş ve 6 adedinde hastalık tespit edilmiştir. Bu uygulamanın ortalama hastalık oranı %2.06 olup, hastalığı engelleme oranı ise %97.59'dur. İstatistiki olarak değerlendirildiğinde bu iki uygulama aynı grupta yer almıştır.

En etkili tohum uygulamaları ise fiziksel uygulamalardan 55°C sıcak suda 20 dakika, 60°C sıcak suda 20 dakika bekletilen tohum uygulaması ve kimyasal uygulamalardan ise %2'lik laktik asit içinde 20 dakika bekletilen tohum uygulamasıdır. İstatistiki olarak değerlendirildiğinde bu üç başarılı uygulama aynı grupta yer almıştır. 55°C sıcak suda 20 dakika tohumların bekletildiği uygulamada, 287 adet tohum çimlenmiş ve 1 adedinde hastalık belirtisi gözlenmiştir. Bu uygulama %0.37 ortalama hastalık oranıyla, %99.57 düzeyinde hastalığı engellemede etkili bulunmuştur. 60°C sıcak suda 20 dakika tohumların bekletildiği uygulamada, 293 adet tohum çimlenmiş ve 2 adedinde hastalık belirtisi gözlenmiştir. Bu uygulama %0.68 ortalama hastalık oranıyla, %99.21 düzeyinde hastalığı engellemede etkili

olmuştur. %2'lik laktik asitte 20 dakika bekletilen karpuz tohumlarından 289 adedi çimlenmiş ve 1 adedinde hastalık belirtisi görülmüştür. Başarılı bir kimyasal uygulama olan bu tohum uygulamasında %0.34 ortalama hastalık yüzdesiyle, %99.61 oranında bakteriyel fide yanıklığı hastalığı engellenmiştir.

Karpuz tohumlarının 65°C sıcak suya 10, 15 ve 20 dakika daldırılması sonucunda tohumların hiçbirinde çimlenme gözlenmemiştir. Bu nedenle değerlendirme yapılamamıştır.

İkinci Deneme: İkinci kez tohum uygulamalarının tekrar edildiği denemede, Çizelge 4. 8'de görüldüğü gibi, 15 farklı fiziksel ve kimyasal tohum uygulamaları, karpuz fidelerinde bakteriyel fide yanıklığı hastalığını % 93-100 oranında engellemiştir. Sadece *Acidovorax citrulli* ile bulaştırılmış pozitif kontrol uygulamasında 300 adet tohumdan tamamı çimlenmiş ve çimlenen fidelerin 246 adetinde hastalık simptomu meydana gelmiştir. Pozitif kontrolde yer alan fidelerdeki ortalama hastalık oranı %82 olarak belirlenmiştir.

Kimyasal bir tohum uygulaması olan %0.525'lik NaOCl'de 20 dakika bekletilen tohumlardan 299 adedi çimlenmiş ve 18 adedinde hastalık gözlenmiştir. Ortalama hastalık oranı %6.02 olup, hastalığı engelleme oranı %92.65 olarak belirlenmiştir. Tohumlar 50°C sıcak suda 10 dakika bekletildiğinde 294 adedi çimlenmiş ve 18 adedinde hastalık gözlenmiştir. Ortalama hastalık oranı %6.10 olarak belirlenmiş ve bu uygulamanın bakteriyel fide yanıklığı hastalığını engelleme oranı %92.56 olarak tespit edilmiştir. Bu iki uygulama aynı istatistiki grupta yer almıştır.

Fiziksel uygulamalardan 50°C sıcak suda 15 dakika bekletilen tohumlardan 299 adedi çimlenmiş ve 12 adedinde hastalık görülmüştür. Uygulamada ortalama hastalık oranı %4.02 olurken, %95.10 oranında da hastalık baskılanmıştır. Tohumlar 55°C sıcak suda 10 dakika ve 60°C sıcak suda 10 dakika bekletildiğinde sırasıyla 282 ve 282 oranında çimlenme olmuş ve bu çimlenen tohumlardan 12'şer adedinde hastalık gözlenmiştir. Ortalama hastalık oranı yaklaşık %4 olarak belirlenmiştir. Bu iki uygulamanın bakteriyel fide yanıklığı hastalığını engelleme oranı yaklaşık %95 olarak tespit edilmiştir. Diğer bir kimyasal uygulama olan %1.8'lik HCl + %0.525'lik NaOCl 15 dk'lık kimyasal kombinasyon uygulamasında ise 288 adet

çimlenen tohumdan 13 adedinde hastalık gözlenmiştir. %4.43 ortalama hastalık oranıyla bu uygulama %94.59 oranında başarılı olmuştur. Tüm bu dört uygulama birbirine yakın oranda hastalığı baskılayarak aynı istatistiki grup içerisinde yer almıştır.

Çizelge 4.8. Fiziksel ve Kimyasal Tohum Uygulamalarının Bakteriyel Fide Yanıklığı Hastalığına Etkisi (İkinci Deneme)

Uygulamalar	Fide Sayısı	Hastalıklı Fide Sayısı	Hastalık %'si	Ortalama Hastalık %'si	% Etki
Patojen Pozitif Kontrol	100	91	91.00	82.00 a	-
	100	87	87.00		
	100	68	68.00		
50°C sıcak su 10 dakika	97	5	5.15	6.10 b	92.56
	98	2	2.04		
	99	11	11.11		
50°C sıcak su 15 dakika	99	5	5.05	4.02 bc	95.10
	100	5	5.00		
	100	2	2.00		
50°C sıcak su 20 dakika	93	1	1.08	2.14 bcd	97.39
	93	4	4.30		
	96	1	1.04		
55°C sıcak su 10 dakika	93	3	3.23	4.24 bc	94.83
	94	2	2.13		
	95	7	7.37		
55°C sıcak su 15 dakika	99	2	2.02	2.01 bcd	97.55
	100	2	2.00		
	100	2	2.00		
55°C sıcak su 20 dakika	88	1	1.14	2.21 bcd	97.30
	91	2	2.20		
	91	3	3.30		
60°C sıcak su 10 dakika	89	2	2.25	4.18 bc	94.90
	95	3	3.16		
	98	7	7.14		
60°C sıcak su 15 dakika	97	1	1.03	1.70 bcde	97.93
	98	2	2.04		
	99	2	2.02		
60°C sıcak su 20 dakika	91	1	1.10	0.73 cde	99.11
	92	1	1.09		
	99	0	0.00		
65°C sıcak su 10 dakika	Tohumlar Çimlenmemiştir.				

65°C sıcak su 15 dakika	Tohumlar Çimlenmemiştir.				
65°C sıcak su 20 dakika	Tohumlar Çimlenmemiştir.				
%0.525'lik NaOCl 20 dakika	99	7	7.07	6.02 b	92.65
	100	6	6.00		
	100	5	5.00		
%1.8'lik HCl 5 dakika	96	0	0.00	2.02 bcde	97.54
	99	3	3.03		
	99	3	3.03		
%1.8'lik HCl + %0.525'lik NaOCl 15 dk	94	1	1.06	4.44 bc	94.59
	95	3	3.16		
	99	9	9.09		
%2'lik laktik asit 10 dakika	100	1	1.00	1.67 bcde	97.97
	100	2	2.00		
	100	2	2.00		
%2'lik laktik asit 15 dakika	99	0	0.00	0.33 de	99.59
	100	0	0.00		
	100	1	1.00		
%2'lik laktik asit 20 dakika	99	0	0.00	0.00 e	100
	100	0	0.00		
	100	0	0.00		

Tohumlar 50°C sıcak suda 20 dakikalık sıcak su uygulamasında ise 282 tohum çimlenmiş ve 6 adedi hasta olarak belirlenmiştir. %2.14 ortalama hastalık oranıyla %97.39 oranında hastalık baskılanmıştır. Tohumlar 55°C sıcak suda 15 dakika bekletilen tohumlardan ise 299 adedi çimlenmiş ve 6 adedinde hastalık gözlenmiştir. Ortalama hastalık oranı %2.01 ve hastalığı engelleme oranı ise %97.55 olarak belirlenmiştir. Tohumlar 55°C sıcak suda 20 dakika bekletildiğinde 270 adedi çimlenmiş ve 6 adedinde hastalık görülmüştür. Ortalama hastalık oranı %2.21 ve hastalığa etki ise %97.30 oranında başarılı olmuştur. Bu üç uygulama birbirine yakın oranda hastalığı baskılayarak aynı istatistiki grup içerisinde yer almıştır.

Karpuz tohumları 60°C sıcak suda 15 dakika bekletildiğinde, tohumların 294 adedi çimlenmiş ve 5 adet fidede hastalık belirtisi gözlenmiştir. Bu uygulamada ortalama hastalık %1.70 oranında olup, hastalığı %97.93 oranında baskılamıştır. Kimyasal uygulamalardan %2'lik laktik asit içinde 10 dakika bekletilen tohumlardan tamamı çimlenmiş ve sadece 5 adedinde hastalık gözlenmiştir. %1.67'lık ortalama hastalık oranıyla, %97.97 oranıyla bu uygulama etkili bulunmuştur. Diğer bir

kimyasal uygulama olan %1.8'lik HCl'de 5 dakika daldırılan tohumlardan 294 adedi çimlenmiş ve 6 adedi hastalıklı bulunmuştur. Ortalama hastalık oranı ise %2.02 olup, %97.54 oranında hastalığı engelleme etkisine sahiptir. Bu üç tohum uygulaması istatistiki analizler sonucunda aynı grupta yer almışlardır.

60°C sıcak suda 20 dakika bekletilen tohumlardan 282 adedi çimlenmiş ve 2 adedinde hastalık görülmüştür. Ortalama hastalık oranı %0.73 ve tohum uygulamasının başarısı ise %99.11 olarak belirlenmiştir. Bu uygulamada istatistiki analizde tek başına ayrı bir grupta yer almıştır.

Başarılı bir tohum uygulaması olarak, tohumların %2'lik laktik asite 15 dakika daldırma uygulaması olduğu bulunmuş ve bu uygulama tek başına bir istatistiki grupta yer almıştır. Tohumların %2'lik laktik asite 15 dakika daldırmasında 300 tohumun 299'u çimlenmiş ve sadece 1 fidede hastalık tespit edilmiştir. Bu kimyasal tohum uygulaması %99.59 oranında hastalığı engelleme etkisine sahip olduğu saptanmıştır.

Benzer şekilde başarılı diğer bir tohum uygulaması olarak, tohumların %2'lik laktik asite 20 dakika daldırma uygulaması olduğu bulunmuş ve bu uygulama tek başına bir istatistiki grupta yer almıştır. Tohumların 299 adedi çimlenmiş ve hiçbirinde hastalık gözlenmemiştir. Bu uygulama fidedeki hastalık gelişimini %100 oranında engelleyen en başarılı uygulama olarak değerlendirilmiştir.

İki Denemenin Ortalaması: Her iki yıldaki denemede elde edilen verilerin ortalaması alınarak yapılan değerlendirme Çizelge 4.9'da verilmiştir. Fiziksel tohum uygulamalarından 50°C'deki sıcak suya 10 dakika tohumların daldırılması, hastalık çıkışını %88.90 engellemiş ve istatistiki analizde ayrı harflendirilerek tek başına bir grup oluşturmuştur. Bu uygulamayı diğer bir fiziksel uygulama olan 55°C sıcak suya 10 dakika daldırma işlemi olan uygulama %90.07 etkiyle takip etmiştir. Kimyasal tohum uygulamaları olan %1.8'lik HCl'ye 5 dakika ve %0.525'lik NaOCl'ye 20 dakika daldırma uygulamaları sırasıyla %90.57 ve %92.80 etkiyle, istatistiki olarak aynı grupta yer alarak üçüncü sıradaki uygulama olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.9. Fiziksel ve Kimyasal Tohum Uygulamalarının Bakteriyel Fide Yanıklığı Hastalığına Etkisi (İki Denemenin Ortalaması)

Uygulamalar	**Hastalığı Engelleme %'si**		
	1.Deneme	**2.Deneme**	**Ortalama**
50°C sıcak su 10 dakika	85.25	92.56	88.90 b
50°C sıcak su 15 dakika	92.20	95.10	93.65 bcde
50°C sıcak su 20 dakika	97.64	97.39	97.51 efg
55°C sıcak su 10 dakika	85.31	94.83	90.07 bc
55°C sıcak su 15 dakika	93.99	97.55	95.77 cdef
55°C sıcak su 20 dakika	99.57	97.30	98.43 fgh
60°C sıcak su 10 dakika	94.67	94.90	94.78 bcde
60°C sıcak su 15 dakika	97.64	97.93	97.78 efg
60°C sıcak su 20 dakika	99.21	99.11	99.16 gh
65°C sıcak su 10 dakika	Çimlenme yok	Çimlenme yok	-
65°C sıcak su 15 dakika	Çimlenme yok	Çimlenme yok	-
65°C sıcak su 20 dakika	Çimlenme yok	Çimlenme yok	-
%0.525'lik NaOCl 20 dakika	92.96	92.65	92.80 bcd
%1.8'lik HCl 5 dakika	83.60	97.54	90.57 bcd
%1.8'lik HCl + %0.525'lik NaOCl 15 dak	97.59	94.59	96.09 defg
%2'lik laktik asit 10 dakika	97.56	97.97	97.76 efg
%2'lik laktik asit 15 dakika	97.60	99.59	98.59 fgh
%2'lik laktik asit 20 dakika	99.61	100.00	99.80 h

Bu uygulamaları diğer bir fiziksel uygulama olan 50°C sıcak suya 15 dakika ve 60°C sıcak suya 10 dakika daldırma işlemine tabi tutulan tohum uygulamaları

%93.65 ve %94.78 etkiyle takip etmiştir. Bu uygulamalarda istatistiki analizde aynı grupta yer almışlardır.

Fiziksel tohum uygulamalarından 55°C sıcak suya 15 dakika daldırma işlemi %95.77 oranında etkiyle tek başına ayrı bir grupta yer almış ve yine kimyasal tohum uygulamalarından %1.8'lik HCl + %0.525'lik NaOCl 15 dakika olan kombinasyon uygulaması da % 96.09 başarıyla bu uygulamayla birlikte istatistiki analizde ayrı grupta yer almıştır. Karpuz tohumları %2'lik laktik asite 10 dakika, 60°C sıcak suya 15 dakika ve 50°C sıcak su 20 dakika daldırma uygulamaları ise sırasıyla %97.76, %97.78 ve %97.51 başarı oranıyla aynı istatistiki grupta yer almışlardır.

Başarılı bir tohum uygulaması olarak tohumların 55°C sıcak suya 20 dakika ve %2'lik laktik asite 15 dakika daldırılma işlemleri %98.43 ve %98.59 etkiyle aynı istatistiki grupta yer almışlardır. Diğer bir başarılı tohum uygulaması ise %99.16 engelleme oranıyla, 60°C sıcak suya 20 dakika tohumların daldırma işlemi olmuştur. Bu tohum uygulaması tek başına harflendirilerek en etkili ikinci uygulama olarak saptanmıştır. İki denemenin ortalamasının alındığı ve bu hastalığı engelleme değerleri tekrar istatistiki olarak hesaplanıp gruplandırıldığında, %99.80 başarı gösteren tohumların %2'lik laktik asite 20 dakika daldırılma uygulaması ayrı bir grupta yer alarak en başarılı tohum uygulaması olarak belirlenmiştir.

Karpuz tohumlarının 65°C sıcak suya farklı sürelerde daldırılması sonucu tohumların hiçbiri çimlenmemiştir. Bu sıcaklıkta tohumların embriyosu zarar gördüğünden tohumlar çimlenme yeteneğini kaybetmiştir.

Tohum kökenli ve tohumla taşınan bu hastalıkla mücadelede hastalıksız tohum ve/veya fide kullanımı hastalık yönetiminde çok büyük bir öneme sahiptir. Tercihen tohumluk karpuz üretimi serin ve kuru iklime sahip yerlerde yapılmalıdır. Tohumda çok düşük popülasyonda (10 hücre/adet tohum) varlığını sürdürebilen ve kolaylıkla o tohum partisinden gelişen fideleri hastalandırabilen bu etmenle mücadele oldukça zordur. Tohumdaki bu düşük bakteri popülasyonunu saptamadaki zorluk ve tohum uygulamalarında istenilen başarının elde edilememesi hastalık yönetiminde zorluklar yaşanmasına neden olmaktadır. Tohuma fermantasyon, antibiyotik, NaOCl, HCl ve peroksi asetik asit gibi kimyasalların ve sıcak su uygulanması tohumdaki bakteri popülasyonunu azaltsa da tamamen yok

edememektedir (Sowell ve Schaad, 1979; Hopkins ve ark., 1996; Hopkins ve ark., 2003). Özellikle fideliklerde az orandaki bulaşıklılık hızla diğer sağlıklı fidelere bulaşabilir. Bu nedenle pek çok araştırıcı 1980'lerden beri tohumdaki inokulumu yok etmek için halen pek çok yöntemin etkisini araştırmaktadır. Farklı derece ve sürelerdeki sıcak su uygulamaları tohumdaki inokulumu tamamen yok etmeye yetmemiştir (Wall ve Santos, 1988; Feng ve ark., 2009). Ancak asidik suya elektrik akımı uygulandığında tohumdaki patojen oldukça önemli oranda azalmıştır (Feng ve ark., 2009).

Denemelerde suni olarak patojenle bulaşık veya doğal olarak patojenle bulaşık tohum kullanılması tohum uygulamalarının başarısına farklı düzeylerde etki etmektedir. Rane ve Latin (1992), hastalıklı meyvelerden elde ettikleri patojenle doğal bulaşık tohumlara sıcak su, NaOCl ve HCl uygulamaları yaptıklarında başarı sırasıyla; %79, %85 ve %87 iken laboratuar koşullarında sağlıklı tohumlara patojen bulaştırılıp aynı tohum uygulamaları yapıldığında başarının %96, %98 ve %98'e çıktığı saptanmıştır. Patojenle doğal olarak bulaşık tohumlarla yapılan çalışmada tohum uygulamalarının başarısının daha az oluşu patojenin tohum içine yerleştiği yerle ilgilidir. Bizim de çalışmamızda yaptığımız gibi, patojen tohuma suni yollarla bulaştırıldığında inokulum genellikle tohum kabuğuna yerleşir ve dezenfektanlar veya çeşitli kimyasallar tohumdaki inokulumu başarıyla yok eder. Bazı makalelerde tohum uygulamaları gayet başarılıyken aynı uygulama farklı araştırıcı tarafından etkili bulunmama nedeni, tohumdaki patojenin bulunduğu yerle ilgili olduğu açıktır (Rane ve Latin, 1992). Patojen karpuzun çiçeklenme evresinde bitkiye bulaşmışsa (Walcott ve ark., 2003; Dutta ve ark., 2012) inokulum tohum embriyosuna yerleştiğinden tohum uygulamaları istenilen düzeyde başarı gösterememektedir. Rane ve Latin (1992)'nin bu düşüncesini Dutta ve ark., (2012) yaptığı çalışmayla kanıtlamıştır.

Rane ve Latin (1992) sıcak suya göre NaOCl ve HCl gibi kimyasal tohum uygulamalarını daha başarılı bulmuşlardır. Karpuz gibi tohum kabuğu kalın, sert ve kaygan olan tohumlar, tohum kabuğu daha ince olanlara göre farklı tohum uygulamalarından daha az etkilenirler. Bu durumu destekleyen pek çok çalışma bulunmaktadır (Rane ve Latin 1992; Dutta ve ark., 2012). Tohum kabuğu kalın olan

karpuzda, yapılan tohum uygulamaları patojenin tohumun iç kısmına yerleşmesi nedeniyle yeterince etki edememektedir (Dutta ve ark., 2012). Bu kalın tohum kabuğu tabakası bakteriyi tohum uygulamalarından koruyan bir bariyer olarak görev yapmaktadır. NaOCl gibi dezenfektanlar tohum kabuğuna lokalize olan bakterilerle mücadelede son derece etkili sonuçlar vermektedir (Aysan ve ark., 2002; Mirik ve ark., 2005). Karpuz tohumunda hilum (göbek deliği) bölgesinin açık oluşu nedeniyle, tohumlar bakteri süspansiyonuna batırıldığında inokulum kolaylıkla tohumun içine girebilmektedir (Rane ve Latin, 1992). Bu patojen, karpuz ve kavun kollarında hastalık oluşturmamasına ve sistemik taşınmamasına rağmen tohum embriyosuna yerleşmesinde çiçek dönemindeki patojen bakteri bulaşıklığının önemli olduğu bilinmektedir (Walcott ve ark., 2003; Dutta ve ark., 2012). Bahar ve ark., (2009)' un son yıllarda yaptığı çalışmalarda, simptomsuz karpuz ve kavun bitkilerinin kollarındaki ksilem bölgesinde bu etmenin varlığını kanıtlamışlardır. Bu durum gelecekte hastalık mücadelesinde daha da zorlanacağımıza bir işarettir.

Sonuç olarak, çeşitli tohum uygulamalarıyla karpuz tohumlarındaki *Acidovorax citrulli* popülasyonu tamamen yok edilemese de ticari fideliklerde, bakteriyel fide yanıklığı hastalığı nedeniyle meydana gelecek kayıpları engellemede, çimlenmeye ve fide gelişimine olumsuz etki yapmayan tohum uygulamalarının kullanımı önerilebilir.

4.8.2. Fiziksel ve Kimyasal Tohum Uygulamalarının Tohum Çimlenmesine Etkisi

Ön Deneme: Çizelge 4.10'da görüldüğü gibi, ön denemede sadece steril su içine daldırılan, hiçbir uygulama yapılmamış 1500 adet tohumdan 1485 adeti çimlenmiş ve tohumdaki çimlenme %'si 99.33 olarak belirlenmiştir. Tohumlara kimyasal tohum uygulamaları yapıldığında, bu uygulamalar tohumun çimlenme yeteneğini %4.35 ile %92.95 arasında değişen oranlarda azaltmışlardır. Tohumların %30'luk laktik asit çözeltisine 15, 20 ve 30 dakika daldırılması çimlenmeyi sırasıyla %55.70, %78.85 ve %92.95 oranında azaltmıştır. Tohumların %30'luk laktik asit

çözeltisine daldırma uygulaması, tohum çimlenmesine yaptığı olumsuz etki nedeniyle başarısız uygulama olarak değerlendirilmiştir.

Çizelge 4.10. Fiziksel ve Kimyasal Tohum Uygulamalarının Tohum Çimlenmesine Etkisi (Ön Deneme)

Uygulamalar	Tohum Sayısı	Çimlenen Tohum Sayısı	Çimlenme %'si	Ortalama Çimlenme %'si	% Azalış
Steril su	500	492	98.40	99.33 a	-
	500	495	99.00		
	500	498	99.60		
%1.8'lik HCl 5 dakika	500	472	94.40	95.00 bc	4.35
	500	475	95.00		
	500	478	95.60		
%0.525'lik NaOCl 20 dakika	500	458	91.60	92.13 cd	7.24
	500	461	92.20		
	500	463	92.60		
%1.8'lik HCl + %0.525'lik NaOCl 15 dak.	500	442	88.40	88.80 de	10.60
	500	444	88.80		
	500	446	89.20		
%30'luk laktik asit 15 dakika	100	40	40.00	44.00 g	55.70
	100	44	44.00		
	100	48	48.00		
%30'luk laktik asit 20 dakika	100	19	19.00	21.00 h	78.85
	100	21	21.00		
	100	23	23.00		
%30'luk laktik asit 30 dakika	100	5	5.00	7.00 i	92.95
	100	7	7.00		
	100	9	9.00		

Kimyasal tohum uygulaması olarak, tohumların %1.8'lik HCl çözeltisine 5 dakika batırılması sonucu 1500 adet tohumun 1425 adeti çimlenmiş ve çimlenme oranı %95 olarak belirlenmiştir. Bu uygulama sonucu çimlenme sadece %4.35 oranında azalmış ve tohum çimlenmesine olumsuz etkisi olmayan başarılı bir uygulama olarak öne çıkmıştır. Diğer bir kimyasal tohum uygulaması olarak, tohumların %0.525'lik NaOCl çözeltisinde 20 dakika bekletilmesi de benzer şekilde çimlenmeyi sadece %7.24 oranında azaltan başarılı bir uygulama olarak belirlenmiştir. Kombinasyon uygulaması olarak, tohumlar eşit oranda hazırlanan

%1.8'lik HCl ve %0.525'lik NaOCl çözeltisine 15 dakika daldırıldığında 1500 adet tohumla yapılan denemede, çimlenmedeki azalış %10.60 olarak kaydedilmiştir.

Birinci Deneme: Çizelge 4.11'de görüldüğü gibi, yapılan birinci denemede hiçbir uygulama yapılmadan steril suda bekletilen negatif kontrolde, 300 adet karpuz tohumundan 299 adedi çimlenmiştir. Tohumdaki çimlenme yüzdesi ise %99.66 olarak belirlenmiştir. Tüm fiziksel ve kimyasal tohum uygulamaları tohum çimlenmesini %0.33 ila %9.70 oranı arasında azaltmıştır. 65°C sıcak suda 10 dakika, 15 dakika ve 20 dakika sürelerde bekletilen tohumlarda embriyo zarar gördüğünden herhangi bir çimlenme olmamıştır.

Kimyasal tohum uygulamalarından %1.8'lik HCl'de 5 dakika ve %0.525'lik NaOCl'de 20 dakika çözeltilerinde daldırılan tohumlardaki çimlenme, steril suyla aynı oranda çimlenme yeteneği göstererek, neredeyse tamamı çimlenmiş ve tohumlarda hiçbir çimlenme azalması gözlenmemiştir. Bu uygulamaların her ikisinin de tohumun çimlenme yeteneğine olumsuz bir etkisi bulunmadığı görülmüş ve istatistiki analiz sonuçlarında da aynı grupta yer almışlardır. Kimyasal uygulamalardan tohumların %2'lik laktik asitte 10, 15 ve 20 dakika bekletildiği tohum uygulamaları sonucunda, %3.01-4.01 oranlarında çimlenme azalışı göstermiş ve bu uygulamaların tohumun çimlenme gücünü etkileyecek uygulamalar olmadığı belirlenmiştir. %1.8'lik HCl + %0.525'lik NaOCl 15 dakika kombinasyonu uygulaması tohum çimlenmesini %4.01 oranında azaltmıştır.

Fiziksel uygulamalardan 50°C sıcak suda 10, 15, 20 dakika, 55°C sıcak suda suda 10, 15, 20 dakika, 60°C sıcak suda suda 10, 15, 20 dakika tohumların bekletilmesi çimlenmede %0.33-%9.70 arasında azalışa neden olmuştur. 55°C sıcak suda 15 dakika bekletilen tohum uygulamasında, çimlenme oranında diğerlerine göre daha fazla azalma olmuştur. %9.70'lik çimlenme azalışının nedeni artan sıcaklık veya uygulama sırasında fark edilmeyen başka aksiliklerden kaynaklanmış olabilir düşüncesindeyiz.

İstatistiki olarak incelendiğinde, kontrolle aynı istatistiki grupta yer alan 9 uygulama (50°C sıcak suda 10 ve 20 dakika, 55°C sıcak suda suda 10 dakika, 60°C sıcak suda suda 15 ve 20 dakika, %1.8'lik HCl'de 5 dakika, %0.525'lik NaOCl'de 20

dakika, %2'lik laktik asitte 15 ve 20 dakika) tohumun çimlenmesine olumsuz etki yapmayan uygulamalar olarak değerlendirilmiştir.

Çizelge 4.11. Fiziksel ve Kimyasal Tohum Uygulamalarının Tohum Çimlenmesine Etkisi (Birinci Deneme)

Uygulamalar	Tohum Sayısı	Çimlenen Tohum Sayısı	Çimlenme Oranı (%)	Ortalama Çimlenme Oranı (%)	Çimlenmedeki Azalış (%)
Steril su	100	99	99	99.67 a	-
	100	100	100		
	100	100	100		
50°C sıcak su 10 dakika	100	93	93	96.00 abc	3.68
	100	96	96		
	100	99	99		
50°C sıcak su 15 dakika	100	92	92	94.33 c	5.35
	100	94	94		
	100	97	97		
50°C sıcak su 20 dakika	100	96	96	98.00 abc	1.67
	100	98	98		
	100	100	100		
55°C sıcak su 10 dakika	100	97	97	98.00 abc	1.67
	100	98	98		
	100	99	99		
55°C sıcak su 15 dakika	100	88	88	90.00 b	9.70
	100	89	89		
	100	93	93		
55°C sıcak su 20 dakika	100	91	91	95.67 bc	4.01
	100	97	97		
	100	99	99		
60°C sıcak su 10 dakika	100	93	93	94.67 c	5.02
	100	94	94		
	100	97	97		
60°C sıcak su 15 dakika	100	99	99	99.33 ab	0.33
	100	99	99		
	100	100	100		
60°C sıcak su 20 dakika	100	97	97	97.67 abc	2.01
	100	97	97		
	100	99	99		
65°C sıcak su 10 dakika	100	0	0	0.00 e	100
	100	0	0		
	100	0	0		
65°C sıcak su 15 dakika	100	0	0	0.00 e	100
	100	0	0		

	100	0	0		
65°C sıcak su 20 dakika	100	0	0	0.00 e	100
	100	0	0.		
	100	0	0		
%0.525'lik NaOCl 20 dakika	100	99	99	99.67 a	0.00
	100	99	99		
	100	100	100		
%1.8'lik HCl 5 dakika	100	99	99	99.67 a	0.00
	100	100	100		
	100	100	100		
%1.8'lik HCl + %0.525'lik NaOCl 15 dak	100	94	94	95.67 bc	4.01
	100	95	95		
	100	98	98		
%2'lik laktik asit 10 dakika	100	92	92	95.67 bc	4.01
	100	97	97		
	100	98	98		
%2'lik laktik asit 15 dakika	100	94	94	96.67 abc	3.01
	100	98	98		
	100	98	98		
%2'lik laktik asit 20 dakika	100	95	95	96.33 abc	3.34
	100	95	95		
	100	99	99		

İkinci Deneme: Uygulamaların tohumların çimlenmesine etkisini belirlediğimiz ikinci denemede ise steril suda beklettiğimiz tohumların tamamı çimlenmiştir. Çizelge 4.12'de görüldüğü gibi tüm fiziksel ve kimyasal tohum uygulamaları tohum çimlenmesini %0.33 ila %10.00 oranı arasında azaltmıştır. 65°C sıcak suda 10 dakika, 15 dakika ve 20 dakika sürelerde bekletilen tohumlarda embriyo zarar gördüğünden herhangi bir çimlenme olmamıştır.

Kimyasal tohum uygulamalarından %0.525'lik NaOCl'de 20 dakika daldırılan tohumların çimlenmesi %0.33 oranında azalırken %1.8'lik HCl'de 5 dakika daldırılan tohumlardaki çimlenme %2 azalış göstermiştir. Bu iki kimyasalın kombinasyonu ise tohumların çimlenmesini %4 oranında azaltmıştır. Kimyasal uygulamalardan tohumların %2'lik laktik asitte 10 dakika bekletildiği tohum uygulamaları sonucunda, çimlenmede hiç azalma olmamıştır. %2'lik laktik asitte tohumlar 15 ve 20 dakika daldırıldığında her iki uygulama çimlenmeyi sadece %0.33

oranında azaltmıştır. Bu uygulamaların tohumun çimlenme gücünü etkileyecek uygulamalar olmadığı belirlenmiştir.

Çizelge 4.12. Fiziksel ve Kimyasal Tohum Uygulamalarının Tohum Çimlenmesine Etkisi (İkinci Deneme)

Uygulamalar	Tohum Sayısı	Çimlenen Tohum Sayısı	Çimlenme Oranı (%)	Ortalama Çimlenme Oranı (%)	Çimlenmedeki Azalış (%)
Steril su	100	100	100	100 a	-
	100	100	100		
	100	100	100		
50°C sıcak su 10 dakika	100	97	97	98.00 bc	2.00
	100	98	98		
	100	99	99		
50°C sıcak su 15 dakika	100	99	99	99.67 a	0.33
	100	100	100		
	100	100	100		
50°C sıcak su 20 dakika	100	93	93	94.00 bc	6.00
	100	93	93		
	100	96	96		
55°C sıcak su 10 dakika	100	93	93	94.00 bc	6.00
	100	94	94		
	100	95	95		
55°C sıcak su 15 dakika	100	99	99	99.67 a	0.33
	100	100	100		
	100	100	100		
55°C sıcak su 20 dakika	100	88	88	90.00 c	10.00
	100	91	91		
	100	91	91		
60°C sıcak su 10 dakika	100	89	89	94.00 bc	6.00
	100	95	95		
	100	98	98		
60°C sıcak su 15 dakika	100	97	97	98.00 bc	2.00
	100	98	98		
	100	99	99		
60°C sıcak su 20 dakika	100	91	91	94.00 bc	6.00
	100	92	92		
	100	99	99		
65°C sıcak su 10 dakika	100	0	0	0.00 d	100.00
	100	0	0		
	100	0	0		
65°C sıcak su 15 dakika	100	0	0	0.00 d	100
	100	0	0		

	100	0	0		
65°C sıcak su 20 dakika	100	0	0	0.00 d	100
	100	0	0		
	100	0	0		
%0.525'lik NaOCl 20 dakika	100	99	99	99.67 a	0.33
	100	100	100		
	100	100	100		
%1.8'lik HCl 5 dakika	100	96	96	98.00 b	2.00
	100	99	99		
	100	99	99		
%1.8'lik HCl + %0.525'lik NaOCl 15 dak	100	94	94	96.00 bc	4.00
	100	95	95		
	100	99	99		
%2'lik laktik asit 10 dakika	100	100	100	100 a	0.00
	100	100	100		
	100	100	100		
%2'lik laktik asit 15 dakika	100	99	99	99.67 a	0.33
	100	100	100		
	100	100	100		
%2'lik laktik asit 20 dakika	100	99	99	99.67 a	0.33
	100	100	100		
	100	100	100		

Fiziksel uygulamalardan 50°C sıcak suda 10, 15, 20 dakika, 55°C sıcak suda suda 10, 15, 20 dakika, 60°C sıcak suda suda 10, 15, 20 dakika tohumların bekletilmesi çimlenmede %0.33-%10 arasında azalışa neden olmuştur. 55°C sıcak suda 20 dakika bekletilen tohum uygulamasında, %10 oranında azalışla çimlenme diğerlerine göre daha fazla azalmıştır. Sıcaklıkta artış oldukça ve süre uzadıkça tohumun çimlenme gücünde azalış meydana geldiği bu ikinci denemede tekrar saptanmıştır.

İstatistiki olarak incelendiğinde, kontrolle aynı istatistiki grupta yer alan 6 uygulama (50°C sıcak suda 15 dakika, 55°C sıcak suda 15 dakika, %0.525'lik NaOCl'de 20 dakika, %2'lik laktik asitte 10, 15 ve 20 dakika daldırma) tohumun çimlenmesine olumsuz etki yapmayan uygulamalar olarak değerlendirilmiştir.

4.8.3. Fiziksel ve Kimyasal Tohum Uygulamalarının Bitki Gelişimine Etkisi

Ön Deneme: Çizelge 4. 13'de görüldüğü gibi, sadece steril suya daldırılan ve patojen bakteri süspansiyonuna bandırılan tohumlardan gelişen fideler gayet sağlıklı bir şekilde büyüme göstermiş ve geliştirilen görsel skalaya göre bitki gelişiminin çok iyi olduğu belirlenmiştir. Sadece steril suya daldırılan karpuz tohumları çiçeklenme evresine kadar büyütüldüğünde, bitkilerde herhangi büyüme problemi olmadığı gözlenmiştir (Şekil 4. 7).

Çizelge 4.13. Tohum Uygulamalarının Bitki Gelişimine Etkisi (Ön Deneme)

Uygulamalar	Skala Değeri	Fide Gelişimi	Genel Değerlendirme
Steril su Negatif Kontrol	5	Çok iyi	Çok iyi
	5	Çok iyi	
	5	Çok iyi	
Patojen Pozitif Kontrol	5	Çok iyi	Çok iyi
	5	Çok iyi	
	4	İyi	
%1.8'lik HCl 5 dakika	4	İyi	İyi
	4	İyi	
	4	İyi	
%0.525'lik NaOCl 20 dakika	4	İyi	İyi
	4	İyi	
	4	İyi	
%1.8'lik HCl + %0.525'lik NaOCl 15 dakika	4	İyi	İyi
	4	İyi	
	4	İyi	
%30'luk laktik asit 15 dakika	2	Zayıf	Zayıf
	2	Zayıf	
	2	Zayıf	
%30'luk laktik asit 20 dakika	2	Zayıf	Zayıf
	2	Zayıf	
	2	Zayıf	
%30'luk laktik asit 30 dakika	2	Zayıf	Zayıf
	2	Zayıf	
	2	Zayıf	

Kimyasal tohum uygulaması olarak %1.8'lik HCl, %0.525'lik NaOCl ve kombinasyonu uygulamasında bitkilerin büyümesi iyi olarak değerlendirilmiştir. Ancak %30'luk laktik asit çözeltisine daldırılan tohumların büyümesi çok zayıf

olmuştur. Cılızlaşma ve yaprakların renginde açılma, sararma gibi zayıf büyüme belirtileri gözlenmiştir. Böyle bitkiler tarlada sağlıklı büyüme gösterip istenilen verime ulaşamazlar. Daha önce tartışıldığı gibi laktik asidin bu konsantrasyonu diğer denemelerde kullanılmamıştır.



Şekil 4.7. Steril su uygulaması görmüş karpuz tohumlarından gelişen bitkilerin çiçek dönemindeki durumu

Birinci Deneme: Çizelge 4.14'de görüldüğü gibi sadece steril suya daldırılan ve patojen bakteri süspansiyonuna bandırılan tohumlardan ve %1.8'lik HCl'ye 5 dakika daldırma uygulamasından gelişen fideler gayet sağlıklı bir şekilde büyüme göstermiş ve geliştirilen görsel skalaya göre bitki gelişiminin çok iyi olduğu belirlenmiştir.

Fiziksel tohum uygulaması olarak 60°C sıcak su 10, 15 ve 20 dakika uygulamasında tohumlardan gelişen fideler skalaya göre orta olarak değerlendirilmiştir.

Çizelge 4.14. Tohum Uygulamalarının Bitki Gelişimine Etkisi (Birinci Deneme)

Uygulamalar	Skala Değeri	Fide Gelişimi	Genel Değerlendirme
Steril su Negatif Kontrol	5	Çok iyi	Çok iyi
	5	Çok iyi	
	5	Çok iyi	
Patojen Pozitif Kontrol	5	Çok iyi	Çok iyi
	5	Çok iyi	
	5	Çok iyi	
50°C sıcak su 10 dakika	4	İyi	İyi
	4	İyi	
	4	İyi	
50°C sıcak su 15 dakika	4	İyi	İyi
	4	İyi	
	4	İyi	
50°C sıcak su 20 dakika	4	İyi	İyi
	4	İyi	
	4	İyi	
55°C sıcak su 10 dakika	4	İyi	İyi
	4	İyi	
	4	İyi	
55°C sıcak su 15 dakika	4	İyi	İyi
	4	İyi	
	4	İyi	
55°C sıcak su 20 dakika	4	İyi	İyi
	4	İyi	
	4	İyi	
60°C sıcak su 10 dakika	3	Orta	Orta
	3	Orta	
	3	Orta	
60°C sıcak su 15 dakika	3	Orta	Orta
	3	Orta	
	3	Orta	
60°C sıcak su 20 dakika	3	Orta	Orta
	3	Orta	
	3	Orta	
65°C sıcak su 10 dakika	-	Çimlenme yok	-
65°C sıcak su 15 dakika	-	Çimlenme yok	-
65°C sıcak su 20 dakika	-	Çimlenme yok	-
%1.8'lik HCl 5 dakika	5	Çok İyi	Çok İyi
	5	Çok İyi	
	4	İyi	
	4	İyi	

%0.525'lik NaOCl 20 dakika	4	İyi	İyi
	3	Orta	
%1.8'lik HCl + %0.525'lik NaOCl 15 dakika	4	İyi	İyi
	4	İyi	
	4	İyi	
%2'lik laktik asit 10 dakika	4	İyi	İyi
	4	İyi	
	4	İyi	
%2'lik laktik asit 15 dakika	4	İyi	İyi
	4	İyi	
	4	İyi	
%2'lik laktik asit 20 dakika	4	İyi	İyi
	4	İyi	
	4	İyi	

Bu uygulamalar dışında fiziksel uygulamalardan, 50°C sıcak su 10, 15 ve 20 dakika, 55°C sıcak su 10, 15 ve 20 dakika ve kimyasal uygulamalardan ise %0.525'lik NaOCl'ye 20 dakika ve %1.8'lik HCl + %0.525'lik NaOCl 15 dakika daldırma kombinasyon uygulamaları ile %2'lik laktik asite 10, 15 ve 20 dakika daldırma denemelerinde bitki gelişimi iyi olarak değerlendirilmiştir.

İkinci Deneme: Bu denemedeki bitki gelişimiyle ilgili genel bir değerlendirme yapıldığında ise kontrol uygulamalarında ve %1.8'lik HCl'ye 5 dakika daldırma uygulamasında bitki gelişimi çok iyi olarak değerlendirilmiştir.

Fiziksel tohum uygulamalarından tohumların 50°C'deki sıcak suya 10, 15 ve 20 dakika, 55°C'deki sıcak suya 10 ve 15 dakika daldırma ve kimyasal tohum uygulamalarından ise %1.8'lik HCl + %0.525'lik NaOCl 15 dakika ile %2'lik laktik asit 10, 15 ve 20 dakika daldırma uygulamaları sonucu bitki gelişimi iyi olarak değerlendirilmiştir.

Tohumların, 55°C'deki sıcak suya 20 dakika, 60°C'deki sıcak suya 10, 15 ve 20 dakika daldırılması ve %0.525'lik NaOCl'ye 20 dakika daldırılması sonucu ise bitki gelişimi orta olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.15). Sıcak su uygulamasında sıcak suyun ısısındaki artış ve bekleme süresi arttıkça büyümedeki bu gerileme daha net görülmüştür.

Çizelge 4.15. Tohum Uygulamalarının Bitki Gelişimine Etkisi (İkinci Deneme)

Uygulamalar	Skala Değeri	Fide Gelişimi	Genel Değerlendirme
Steril su Negatif Kontrol	5	Çok iyi	Çok iyi
	5	Çok iyi	
	5	Çok iyi	
Patojen Pozitif Kontrol	5	Çok iyi	Çok iyi
	5	Çok iyi	
	5	Çok iyi	
50°C sıcak su 10 dakika	4	İyi	İyi
	4	İyi	
	4	İyi	
50°C sıcak su 15 dakika	4	İyi	İyi
	4	İyi	
	4	İyi	
50°C sıcak su 20 dakika	4	İyi	İyi
	4	İyi	
	4	İyi	
55°C sıcak su 10 dakika	4	İyi	İyi
	4	İyi	
	4	İyi	
55°C sıcak su 15 dakika	4	İyi	İyi
	4	İyi	
	4	İyi	
55°C sıcak su 20 dakika	4	İyi	Orta
	3	Orta	
	3	Orta	
60°C sıcak su 10 dakika	3	Orta	Orta
	3	Orta	
	3	Orta	
60°C sıcak su 15 dakika	3	Orta	Orta
	3	Orta	
	3	Orta	
60°C sıcak su 20 dakika	3	Orta	Orta
	3	Orta	
	3	Orta	
65°C sıcak su 10 dakika	-	Çimlenme yok	-
65°C sıcak su 15 dakika	-	Çimlenme yok	-
65°C sıcak su 20 dakika	-	Çimlenme yok	-
%1.8'lik HCl 5 dakika	5	Çok İyi	Çok İyi
	5	Çok İyi	
	5	Çok İyi	

%0.525'lik NaOCl 20 dakika	3	Orta	Orta
	3	Orta	
	3	Orta	
%1.8'lik HCl + %0.525'lik NaOCl 15 dakika	3	Orta	İyi
	4	İyi	
	4	İyi	
%2'lik laktik asit 10 dakika	4	İyi	İyi
	4	İyi	
	4	İyi	
%2'lik laktik asit 15 dakika	4	İyi	İyi
	4	İyi	
	4	İyi	
%2'lik laktik asit 20 dakika	4	İyi	İyi
	4	İyi	
	4	İyi	

Acidovorax citrulli'nin neden olduğu karpuzda bakteriyel fide yanıklığı hastalığını engelleme oranı, tohumların çimlenme yeteneği ve fidelerin gelişme durumu göz önüne alındığında en etkili tohum uygulaması olarak %2'lik laktik aside 15 veya 20 dakika, 55°C'deki sıcak suya 20 dakika ve 60°C'deki sıcak suya 20 dakika daldırma olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.16). Bu uygulamaların kullanımı tohum firmaları ve özellikle ticari fide firmalarına ekim öncesi olarak kullanımı önerilebilir.

Önceki çalışmalarda bildirildiği gibi bu hastalıkla mücadelede sağlıklı tohum kullanımının önemi açıktır. Tohum uygulamaları konusunda daha önce yapılan pek çok çalışmada olduğu gibi bizim çalışmamızda da tamamen (%100) başarı gösteren bir tohum uygulaması saptanamamıştır. Karpuz tohumlarının kabuğunun kalın ve sert oluşu, patojenin tohum kabuğu yanında embriyoya yerleşebilme durumu tohum kökenli inokulumla mücadeleyi zorlaştırmaktadır. Ancak, her ne kadar tamamen başarı elde etmesek de %98'in üzerinde etki gösteren, istatistiki olarak pozitif kontrolden farklı görülen bu dört tohum uygulamasının hastalık etmeni ile mücadele de kullanımı önerilir.

Çizelge 4.16. Tohum Uygulamalarının Hastalık Çıkışma, Çimlenmeye ve Bitki Gelişimine Etkisi

Uygulamalar	Hastalık %'si	% Etki	Çimlenme Oranı (%)	Çimlenmedeki Azalış (%)	Fide Gelişimi
Steril su	0.00	-	99.83 a	-	Çok iyi
Patojen	83.80 h	-	99.83	0.00	Çok iyi
50°C sıcak su 10 dakika	9.37 g	88.83	97.00 bcd	2.84	İyi
50°C sıcak su 15 dakika	5.35 cdef	93.62	97.00 bcd	2.84	İyi
50°C sıcak su 20 dakika	2.08 abcd	97.52	96.00 cde	3.84	İyi
55°C sıcak su 10 dakika	8.41 fg	89.97	96.00 cde	3.84	İyi
55°C sıcak su 15 dakika	3.58 abcd	95.73	94.83 def	5.01	İyi
55°C sıcak su 20 dakika	1.29 abc	98.46	92.83 f	7.01	Orta
60°C sıcak su 10 dakika	4.37 bcde	94.78	94.33 ef	5.51	Orta
60°C sıcak su 15 dakika	1.86 abc	97.78	98.67 ab	1.17	Orta
60°C sıcak su 20 dakika	0.70 ab	99.16	95.83 cde	4.01	Orta
65°C sıcak su 10 dakika	Çimlenme yok				
65°C sıcak su 15 dakika	Çimlenme yok				
65°C sıcak su 20 dakika	Çimlenme yok				
%1.8'lik HCl 5 dakika	8.03 efg	90.42	98.83 ab	1.00	Çok iyi
%0.525'lik NaOCl 20 dak	6.02 defg	92.81	99.67 a	0.17	Orta
%1.8'lik HCl + %0.525'lik NaOCl 15 dak	3.25 abcd	96.12	95.83 cde	4.01	İyi
%2'lik laktik asit 10 dak	1.88 abc	97.76	97.83 abc	2.00	İyi
%2'lik laktik asit 15 dak	1.19 ab	98.57	98.17 abc	1.67	İyi
%2'lik laktik asit 20 dak	0.17 a	99.80	98.00 abc	1.84	İyi

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Karpuzun en önemli bakteriyel hastalıklarından biri olan *Acidovorax citrulli*'nin neden olduğu bakteriyel meyve leke hastalığının karpuz tohumlarında aranması ve farklı tohum uygulamalarının hastalık çıkışı üzerine etkisinin araştırılmasını hedefleyen bu çalışmada elde edilen sonuçlar aşağıdaki gibi özetlenmiştir.

1. Karpuzda bakteriyel meyve leke hastalığına neden olan *Acidovorax citrulli* izolatlarını toplamak amacıyla Adana, Antalya ve Osmaniye illerindeki karpuz dikim alanları ve fideliklerdeki şüpheli bitki örneklerinden 84 adet *Acidovorax citrulli* izolatı elde edilmiştir. Bu izolaltlar içinden seçilen 16 izolatla tanı çalışmaları yapılmıştır. İzolatların tanısı morfolojik ve biyokimyasal özelliklerine göre yapılmıştır. Ayrıca ELISA ve PCR analizleri ile klasik tanı desteklenmiştir. DAS-ELISA testi ile izolatların 405 nm'de absorbans değerleri 1.696-3.432 arasında olduğu belirlenmiştir. Tüm izolatlar negatif kontrolün iki katı ve daha fazla değer vererek pozitif sonuç göstermişlerdir. PCR çalışmasında tüm izolatların 360 bp büyüklüğünde spesifik bant oluşturduğu ve *Acidovorax citrulli* olduğu desteklenmiştir.

2. Ülkemize 2009-2012 yılları arasında 16 farklı ülkeden ithal edilen 48 çeşide ait 217 adet karpuz ve karpuz anacı tohum lotları, 6968 sayılı Zirai Karantina Numune Alma ve Analiz Yönetmeliği'ne göre yarı seçici özellikteki bufferda tohumların çalkalanması, yarı seçici besi yerine ekim, IF boyama yöntemi, DAS-ELISA, floresan pigmentasyon, gram reaksiyon, oksidaz, tütünde aşırı duyarlılık ve patojenite testlerine göre *Acidovorax citrulli* bulaşıklığı yönünden incelenmiş ve tohum lotlarının hiç birinde bu patojene rastlanmamıştır.

3. Tohum üretici firma veya fide üreticilerinin kullanabileceği, tohum kökenli bu hastalığın primer inokulum kaynaklarının yok edilmesi veya azaltılmasında farklı fiziksel ve kimyasal tohum uygulamalarının etkinliği araştırılmıştır. Ayrıca bu yöntemlerin tohum çimlenmesine ve fide gelişimine olan etkileri de araştırılmıştır. *Acidovorax citrulli*'nin neden olduğu karpuzda bakteriyel fide yanıklığı hastalığını engelleme oranı, tohumların çimlenme yeteneği ve fidelerin gelişme durumu göz

önüne alındığında en etkili tohum uygulaması olarak %2'lik laktik asidin 15 ve 20 dakika daldırma, 55°C'deki sıcak suya 20 dakika ve 60°C'deki sıcak suya 20 dakika daldırma şeklinde yapılan tohum uygulamaları başarılı bulunmuştur. Bu hastalıkla mücadelede sağlıklı tohum kullanımının önemi açıktır. Tohum uygulamaları konusunda daha önce yapılan pek çok çalışmada olduğu gibi bizim çalışmamızda da tamamen başarı gösteren bir tohum uygulaması saptanamamıştır. Karpuz tohumlarının kabuğunun kalın ve sert oluşu, patojenin tohum kabuğu yanında embriyoya yerleşebilme durumu tohum kökenli inokulumla mücadeleyi zorlaştırmaktadır. Farklı fiziksel ve kimyasal uygulamaların hastalık çıkışını engelleme de gösterdikleri etkinliklerin yanı sıra uygulama görmüş tohumların çimlenme kapasiteleri ve çimlendikten sonra gözlenen bitki gelişim durumları göz önüne alındığında tohum uygulaması olarak önerilebilecek ilk 4 uygulama sırasıyla; %2'lik laktik asidin 15 ve 20 dakika daldırma, 55°C'deki sıcak suya 20 dakika ve 60°C'deki sıcak suya 20 dakika daldırma yöntemleri olduğu yapılan istatistiksel analizlere göre önerilmektedir. Bu veriler bundan sonraki çalışmalarda karpuz tohumlarının çimlenmesine ve *Acidovorax citrulli* etmenine karşı yapılacak tohum uygulamaları çalışmalarına ışık tutacaktır.

KAYNAKLAR

AKTEPE., B.P. 2012. Yenidünya çeşitlerinin ateş yanıklığı hastalığına duyarlılıklarının belirlenmesi. Ç.Ü. Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi.

ALVES, A.O., XAVIER, A.S., VIANA, I.O., MARIANO, R.L.R. AND SILVEIRA, E.B., 2009. Colonization dynamics of *Acidovorax citrulli* in melon. Tropical Plant Pathology, 35(6):368-372.

ANONİM, 2011. www.fidebirlik.org.tr

ANONİM, 2012. www.fidebirlik.org.tr

ANONİM, 2013. Türkiye İstatistik Kurumu(TUİK) 2013 verileri.www.tuik.gov.tr

ANONİM, 2014.Tarla sera dergisi, Mayıs 2014.

ANONYMOUS, 2007. Cucurbitaceae Gourd family, Diseases of Vegetable Crops: A color handbook page:220.

ANONYMOUS, 2011. FAO'nun 2011 verileri. www.fao.org

ANONYMOUS, 2014. European and Mediterranean Plant Production Organization (EPPO). www.eppo.org

ASSIS, S.M.P., MARIANO, R.L.R., SILVA-HANLIN, D.M.W. AND DUARTE, V., 1999. Bacterial fruit blotch caused by *Acidovorax avenae* subsp *citrulli* in melon in the state of Rio Grande do Norte, Brazil. Fitopatologia Brasileira, 24(2):191.

ASSOULINE, I., MILSHTEIN, H., MIZRAHI, M., LEVY, E., AND BEN-ZE EV, I.S., 1997. *Acidovorax avenae* subsp *citrulli* transmitted by Solanaceous seeds. Phytoparasitica 25(2):117-118.

AYSAN, Y., ÜLKE, G. VE ÇINAR, Ö., 2002. Domates tohumlarında *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*'ya karşı tohum uygulamaları. Türkiye I. Tohumculuk Kongresi. 167-171. 11-13 Eylül, İzmir.

AYSAN, Y., HORUZ, S., ÇETİNKAYA YILDIZ, R., MİRİK, M., VE SAYGILI, H., 2011. Karpuz üretim alanlarında *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*'nin yayılmasında tohum kökenli bulaşmaların önemi. IV. Tohumculuk Kongresi, 14-17 Haziran 2011, Samsun.

BAHAR, O., EFRAT, M., HADAR, E., DUTTA, B., WALCOTT, R.R., AND BURDMAN, S., 2008. New subspecies-specific polymerase chain reaction-based assay for the detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli.* Plant Pathology, 57:754-763.

BAHAR, O., KRITZMAN, G. AND BURDMAN, S., 2009. Bacterial fruit blotch of melon: screens for disease tolerance and role of seed transmission in pathogenicity. Europen Journal of Plant Pathology 123 (1) 71-83.

BAHAR, O. AND BURDMAN, S., 2010. Bacterial fruit blotch: a threat to the cucurbit industry. Israel Journal of Plant Sciences 58 (1) 19-31.

BASIM, E. VE BASIM, H., 2014. *Acidovorax citrullii* strainlerine karşı gül (*Rosa damascena* L.) yağının antibakteriyel aktivitesi ve tohum koruyucu olarak kullanımı. Türkiye V. Bitki Koruma Kongresi, 3-5 Şubat 2014 Antalya, sayfa:224.

BLOCK, C.C. AND SHEPHERD, L.M., 2008. Long-term survival and seed transmission of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in melon and watermelon seed. Online, Plant Health Progress, DOİ: 10.1094/PHP-2008-1219-01-BR.

BURDMAN, S., KOTS, N. AND KRIZTMAN, G., 2004. Characterization of *Acidovorax avenae* subsp *citrulli* strains isolated from watermelon and melon fields in Israel. Phytopathology, 94(6):12.

BURDMAN, S. AND WALCOTT, R.R., 2012. *Acidovorax citrulli*: generating basic and applied knowledge to tackle a global threat to the cucurbit industry. Molecular Plant Pathology, 13(8):805-815.

CHARLERMROJ, R., HIMANANTO, O., SEEPIBAN, C., KUMPOOSIRI, M., WARIN, N., OPLATOWSKA, M., GAJANANDANA, O., GRANT, I.R., KAROONUTHAISIRI, N. AND ELLIOTT, C.T., 2013. Multiplex detection of plant pathogens using a microsphere ımmunoassay technology. Plos one, 8(4).

CLARK, M.F. AND ADAMS, A.N., 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme linked immuno sorbent assay fort he detection of plant viruses. J. Gen. Virol. 3(3):475-483.

CRALL, J.M. AND SCHENCK, N.C. 1969. Bacterial fruit rot of watermelon in Florida. Plant Dis. Rep. 53:74-75.

DE BOER, S.H. AND WARD, L.J., 1990. DNA probe specific for serologically diverse strains Erwinia carotovora. Phytopathology 80:665-669.

DEMIR, G., 1996. A new bacterial disease of watermelon in Turkiye: bacterial fruit blotch of watermelon (*Acidovorax avenae* subsp *citrulli* (Shaad et al.) Willems et al.). Journal of Turkish Phytopathology, 25(1/2):43-49.

DEMİR, İ., BALKAYA, A., YILMAZ, K., ONUS, A.N., UYANIK, M., KAYCIOĞLU, M. VE BOZKURT, B., 2010. Sebzelerde Tohumluk ve Fide Üretimi.

DENG, W.L., HUANG, T.C. AND TSAI, Y.C., 2010. First report of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* as the causal agent of bacterial leaf blight of betelvine in Taiwan. Plant Dis., 94(8):1065.

DUTTA, B., VERNAIZ, M. A. C., CASTRO-SPARKS, A. C., SCHERM, H. AND WALCOTT, R. R., 2012a. Location of *Acidovorax citrulli* in watermelon seeds affects efficiency of pathogen detection by seed health testing. Seed Science and Technology 40 (3) 309-319.

DUTTA, B., SCHERM, H., GITAITIS, R. D. AND WALCOTT, R. R. 2012b. *Acidovorax citrulli* seed inoculum load affects seedling transmission and spread of bacterial fruit blotch of watermelon under greenhouse conditions. Plant Dis. 96:705-711.

DUTTA, B., AVCI, U., HAHN, M. G. AND WALCOTT, R. R. 2012c. Location of *Acidovorax citrulli* in infested watermelon seeds is influenced by the pathway of bacterial invasion. Phytopathology 102:461-468.

DUTTA, B., BLOCK, C. C., STEVENSON, K. L., SANDERS, F. H., WALCOTT, R. R. AND GITAITIS, R. D., 2013. Distribution of phytopathogenic bacteria in infested seeds. Seed Science and Technology 41 (3) 383-397.

ELIZALDE JIMÉNEZ, N. A., HERNÁNDEZ MORALES, J., LEYVA MIR, S. G., NAVA DÍAZ, C., SEQUEIRA, R. A., FOWLER, G. AND MAGAREY, R., 2011. Risk assessment of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* associated to

watermelon seed imported to Mexico. Revista Mexicana de Fitopatología 29 (2) 133-145.

ERFEN, S., 2011. *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*'nin farklı populasyonunun kültürde gelişimi ve karpuz fidelerinde aranmasında uygun besi yerlerinin araştırılması. Ç.Ü. Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi.

ERFEN, S., HORUZ, S. VE AYSAN, Y., 2014. *Acidovorax citrulli*'nin farklı populasyonlarının kültürde gelişimi ve karpuz fidelerinde aranmasında uygun besi yerlerinin araştırılması. V. Bitki Koruma Kongresi, 3-5 Şubat Antalya, sayfa:213.

FARİMAZ, A., 2013. Çeşitli bitki aktivatörleri ve ticari gübrelerin tohum uygulaması olarak karpuz bakteriyel meyve lekesi hastalığına etkisi. Ç.Ü. Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Ana Bilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi.

FARİMAZ, A., HORUZ, S. VE AYSAN, Y., 2014. Çeşitli bitki aktivatörleri ve ticari gübrelerin karpuz bakteriyel meyve lekesi hastalığına etkisi. Türkiye V. Bitki Koruma Kongresi, 3-5 Şubat 2014 Antalya, sayfa:366.

FENG, J.J., CHEN, K.J., KIM, J.Y., XU, Y., ZHOU, X.Y. AND LI, J.Q., 2007. Effect of seed priming on seedling growth and disinfection to *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in triploid watermelon seeds. Acta Phytopathologica Sinica 37 (5) 528-534.

FENG, J.J., LI, J.Q.,RANDHAWA, P., BONDE, M. AND SCHAAD, N. W., 2009. Evaluation of seed treatments for the eradication of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* from melon and watermelon seeds. Canadian Journal of Plant Pathology Vol. 31 No. 2 pp. 180-185.

FENG, J.J., Lİ, J.Q., WALCOTT, R.R., ZHANG, G.M., LUO, L.X., KANG, L., ZHENG, Y. AND SCHAAD, N.W., 2013. Advences in detection of *Acidovorax citrulli*, the causal agent of bacterial fruit blotch of cucurbits. *Seed Sci. & Technol*., 41, 1-15.

FESSEHAIE, A. AND WALCOTT, R. R., 2005. Biological control to protect watermelon blossoms and seed from infection by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. Phytopathology, 95(4) 413-419.

GITAITIS, R. AND WALCOTT, R., 2007. The epidemiyology and management of seedborne bacterial diseases. *Annual Review of Phytopathology*, 45:371-397.

HA, Y., FESSEHAIE, A., LING, K. S., WECHTER, W. P., KEINATH, A. P. AND WALCOTT, R. R., 2009. Simultaneous detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* and *Didymella bryoniae* in cucurbit seedlots using magnetic capture hybridization and real-time polymerase chain reaction. Phytopathology 99 (6) 666-678.

HAMM, P.B., SPING, D.S., CLOUGH, G.H. AND MOHAN, K.S., 1997. First report of bacterial fruit blotch of watermelon in Oregon. Plant Dis. 81(1):113.

HARIGHI, B., 2007. Bacterial leaf spot of christ's thorn, a new disease caused by *Acidovorax avenae* subsp *citrulli* in Iran. Journal of Plant Pathology, 89(2):283-285.

HIMANANTO, O., THUMMABENJAPONE, P., LUXANANIL, P., KUMPOOSIRI, M., HONGPRAYOON, R., KOSITRATANA, W. AND GAJANANDANA, O., 2011. Novel and highly specific monoclonal antibody to *Acidovorax citrulli* and development of ELISA-based detection in cucurbit leaves and seed. Plant Disease 95 (9) 1172-1178.

HOLEVA, M.C., KARAFLA, C.D., GLYNOS, P.E. AND ALIVIZATOS, A.S., 2009. First report of natural infection of watermelon plants and fruits by the phytopathogenic bacterium *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in Greece. *Phytopathologia Mediterranea* 48**(**2):316.

HOPKINS, D.L., CUCUZZA, J.D. AND WATTERSON, J.C., 1996. Wet seed treatments for the control of bacterial fruit blotch of watermelon. Plant Dis. 80:529-532.

HOPKINS, D.L. AND THOMPSON, C.M., 2002a. Seed transmission of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* on cucurbits. HortScience, 37(6):924-926.

HOPKINS, D. L. AND THOMPSON, C. M. 2002b. Evaluation of Citrullus sp. germ plasm for resistance to *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli.* Plant Dis. 86:61-64.

HOPKINS, D.L., THOMPSON, C.M., HILGREN, J. AND LOVIC, B., 2003. Wet seed treatment with peroxyacetic acid for the control of bacterial fruit blotch

and other seedborne diseases of watermelon. Plant Disease, 87(12):1495-1499.

HOPKINS, D. L. AND THOMPSON, C. M., 2006. Treatments to prevent seed transmission of bacterial fruit blotch of watermelon. Cucurbitaceae 2006, Asheville, North Carolina, USA, 17-21 September 2006 pp. 436-443.

HOPKINS, D. L., THOMPSON, C. M. AND LOVIC, B., 2009. Management of transplant house spread of Acidovorax avenae subsp citrulli on cucurbits with bactericidal chemicals in irrigation water. Plant Health Progress 2009 No. January pp. PHP-2009-0129-01-RS.

HORUZ, S., ÖZMEN, Ö., GÜL, H. VE AYSAN,Y., 2011. Farklı doz klor uygulamalarının *Acidovorax avenae* subsp *citrulli*'ye etkisi. IV. Bitki Koruma Kongresi, 28-30 Haziran 2011 Kahramanmaraş, sayfa:320.

HORUZ, S. VE AYSAN, Y., 2014. Tohum uygulaması olarak farklı antagonistlerin karpuz bakteriyel meyve lekesi hastalığına etkisi. Türkiye V. Bitki Koruma Kongresi, 3-5 Şubat 2014 Antalya, sayfa:312.

HORUZ, S., ÇETİNKAYA-YILDIZ, R., MİRİK, M. VE AYSAN, Y. 2014. Occurrence, isolation and identification of Acidovorax citrulli from melon in Turkey. Plant Protection Science (In press).

ISAKEIT, T., BLACK, M.C., BARNES, L.W., AND JONES, J.B., 1997. First report of infection of Honeydew with *Acidovorax avenae* subsp *citrulli*. Plant Dis. 81(6):694.

ISAKEIT, T., BLACK, M.C. AND JONES, J.B., 1998. Natural infection of citronmelon with *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*.Plant Dis., 82(3):351.

JOHNSON, K. L., MINSAVAGE, G. V., LE, T., JONES, J. B. AND WALCOTT, R. R., 2011. Efficacy of a nonpathogenic *Acidovorax citrulli* strain as a biocontrol seed treatment for bacterial fruit blotch of cucurbits. Plant Disease 95 (6) 697-704.

JOHNSON, K. L. AND WALCOTT, R. R., 2013. Quorum sensing contributes to seed-to-seedling transmission of *Acidovorax citrulli* on watermelon. Journal of Phytopathology 161 (7/8) 562-573.

KARATAŞ, A., GÖK GÜLER, P. VE KARAMUSTAFAOĞLU, İ., 2012. Çukurova Bölgesi Karpuz Üretim Alanlarında *Acidovorax avenae* subsp. *citruli*'nin Durumu ve Yaygınlığının Belirlenmesi. Cucurbitaceae 2012.

KING, E. O., WARD, M. K. AND RANEY, D. E. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocianin and floresin. J.Lab. Clin. Med. 44:301-307.

KUBOTA, M., HAGIWARA, N. AND SHIRAKAWA, T., 2011. A method to evaluate percentage of cucurbit seeds infested with *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, pathogen of bacterial fruit blotch. Journal of General Plant Pathology 77 (2) 112-115.

KUBOTA, M., HAGIWARA, N. AND SHIRAKAWA, T., 2012. Disinfection of seeds of cucurbit crops infested with *Acidovorax citrulli* with dry heat treatment. Journal of Phytopathology 160 (7/8) 364-368.

KUBOTA, M., HARA, K., HAGIWARA, N. AND SHIRAKAWA, T., 2013. Combined treatment with chemicals and dry heat to disinfest cucurbit seeds after infestation with *Acidovorax citrulli*. Japanese Journal of Phytopathology 79 (2) 92-98.

LANGSTON, D.B., WALCOTT, R.D., GITAITIS, R.D. AND SANDERS, F.H., 1999. First report of fruit rot of pumpkin caused by *Acidovorax avenae* subsp *citrulli* in Georgia. Plant Dis. 83(2):199.

LATIN, R.X. AND RANE, K.K., 1990. Bacterial fruit blotch of watermelon in Indiana. Plant Disease, 74:331.

LATIN, R.X. AND HOPKINS, D.L., 1995. Bacterial fruit blotch of watermelon, the hypothetical exam question becomes reality. Plant Dis. August, sayfa:761-765.

LATIN, R., TIKHONOVA, I. AND RANE, K., 1995. Factors affecting the survival and spread of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in watermelon transplant production facilities. Phytopathology 85 (11) 1413-1417.

LATIN, R. X. 1996. Bacterial fruit blotch. In: Zitter, T. A., D. L. Hopkins and C. E., Thomas (eds), Compendium of Cucurbit Diseases, pp. 34–35. APS Press, St Paul, USA.

LELLIOTT, R.A. AND STEAD, D.E., 1987. Methods for the Diagnosis of Bacterial Diseases of Plants. Blackwell Scientific Publications, 216s.

LESSL, J.T., FESSEHAIE, A. AND WALCOTT, R.R., 2007. Colonization of female watermelon blossoms by *Acidovorax avenae* ssp. *citrulli* and the relationship between blossom inoculum dosage and seed infestation. J. Phytopathology, 155:114–121.

LI, B.,SHI, Y.,SHAN, C.L.,ZHOU, Q.,IBRAHIM, M., WANG, Y.L.,WU, G.X.,LI, H.Y.,XIE, G.L. AND SUN, G.C., 2013. Effect of chitosan solution on the inhibition of *Acidovorax citrulli* causing bacterial fruit blotch of watermelon. Journal of the Science of Food and Agriculture 93 (5) 1010-1015.

LOVIC, B. R. AND HOPKINS, D. L., 2003. Production steps to reduce seed contamination by pathogens of cucurbits. Hort Technology 13 (1) 50-54.

MARTIN, H.L., O'BRIEN, R.G. AND ABBOTT, D.V., 1999. First report of *Acidovorax avenae* subsp *citrulli* as a pathogen of cucumber. Plant Dis. 83(10):965.

MARTIN, H.L. AND HORLOCK, C.M., 2002. First report of *Acidovorax avenae* subsp *citrulli* as a pathogen of gramma in Australia. Plant Dis. 86(12):1406.

MCLAUGHELIN, R.J. AND CHEN, T.A., 1990. ELISA methods for plant pathogenic prokaryotes 197-204. In: Serological Methods for Detection and Identification of Viral and Bacterial Plant Pathogens. 389 p.

MENGÜLLUOĞLU, M. 2012. Bitki uçucu yağ ve önemli bileşenlerinin karpuz bakteriyel meyve lekesi hastalık etmeni (Acidovorax citrulli) üzerine olan antibakteriyel etkinliklerinin in vitro koşullarda araştırılması. MKÜ. Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Anabilim Dalı, Yükseklisans Tezi.

MENGULLUOGLU, M. VE SOYLU, S., 2012. Antibacterial activities of essential oils extracted from medicinal plants against seed-borne bacterial disease agent, *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli.* Research on Crops 13 (2) 641-646.

MİRİK, M., AYSAN, Y., KARATAŞ, A. VE ÇINAR, Ö.,, 2005. Fiziksel ve kimyasal uygulaması görmüş biber tohumlarında *Xanthomonas axanopodis* pv *vesicatoria*'nın aranması. Türkiye 2. Tohumculuk Kongresi, 361 (özet), 9-11 Kasım 2005, Adana.

MIRIK, M., AYSAN, Y. AND SAHIN, F., 2006. Occurence of bacterial fruit blotch of watermelon caused by *Acidovorax avenae* subsp *citrulli* in the Eastern Mediterranean Region of Turkey. Plant Disease, 90(6):829.

MORRISON, R.H. 1999. Sampling in seed health testing. Phytopathology, 89:1084-1087.

MUNOZ, M. AND MONTERROSO, D., 2002. Identification of *Acidovorax avenae citrulli* in watermelon seeds in Nicaragua. Manejo Integrado de Plagas y Agroecología 66: 101-104.

NASCIMENTO, A.R.P., MARIANO, R.L.R. AND SILVA, E.I., 2004. Alternative hosts of *Acidovorax avenae* subsp *citrulli*. Hortic. Bras. 22(3).

NOMURA, T. AND SHIRAKAWA, T., 2001. Efficacy of hot water and bactericide treatments of watermelon seeds infested by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. Proceedings of the Kansai Plant Protection Society 43: 1-6.

OLIVEIRA, A. DE; SANTOS, M. H. M. DOS; SILVEIRA, E. B. DA; GOMES, A. M. A.; MARIANO, R. AND DE L. R., 2006. Biological control of bacterial blotch of melon by seed treatment with epiphytic and endophytic bacteria. Horticultura Brasileira 24 (3) 373-377.

ÖZAKTAN, H., 1991.Domates bakteriyel solgunluğu (*Clavibacter michiganenis* subsp. *michiganensis*) ile savaşım olanakları üzerinde çalışmalar. Doktora Tezi, sayfa:98, Bornova, İzmir, 1991.

ÖZMEN, S., 2009. Çukurova koşullarında aşılı ve aşısız karpuzlardafarklı su düzeylerinin bitki gelişmesi, verim ve kaliteüzerine etkileri. Ç.Ü. Ziraat Fakültesi, Tarımsal Yapılar ve Sulama Anabilim Dalı Doktora Tezi.

PALKOVICS, L., PETROCZY, M., KERTESZ, B., BARSONY, C., MIKE, Z. AND HEVESI, M., 2008. First report of bacterial fruit blotch of watermelon caused by *Acidovorax avenae* subsp *citrulli* in Hungary. Plant Dis. 92(5):834.

RANDHAWA, P.S., PANNUS, S.S. AND SCHAAD, N.W., 2001. Improved Bio-PCR test for detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in watermelon and cantaloupe seeds. Aps/Msa/Son Joint Meeting, August, 25-29.

RANE, K.K. AND LATIN, R.X., 1992. Bacterial fruit blotch of watermelon: Association of the pathogen with seed. Plant Dis. 76:509-512.

REN, Y.Z.,LI, H.,LI, G.Y.,WANG, X.D.,WAN, G. AND FANG, L., 2004. Detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in melon seed using the polymerase chain reaction. Xinjiang Agricultural Sciences 41 (5) 329-332.

REN, Y. Z., LI, H., LI, G.Y., WANG, Q.Y. AND LI, J.Q., 2006. First report of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* infecting edible seed watermelon (*Citrullus lanatus* var. *lanatus*) in China. Plant Disease 90 (8) 1112.

ROBINSON, R.W. AND DECKER-WALTERS, 1997. Cucurbits. Crop Production Science in Horticulture Ser. 6:240.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. AND MANIATIS, T., 1989. Molecular cloning: A laboratory manuel. Cold spring harbor, NY, USA: Cold spring harbor laboratory press.

SCHAAD, N.W., SOWELL, G., Jr., GOTH, R.W., COLWELL, R.R. AND WEBB, R.E., 1978. *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli* subsp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 28:117-125.

SCHAAD, N.W., JONES, J.B. AND LACY, G.H., 2001. Gram negative bacteria, *Acidovorax*. In laboratory guide for ıdentification of plant pathogenic bacteria (Third Edition) Edts: Schaad, N.W., Jones, J.B., Chun, W., APS Press. St. Paul, Minnesota. 121-125.

SCHAAD, N.W., POSTNIKOVA, E., SECHLER, A., CLAFLIN, L.E., VIDAVER, A.K., JONES, J.B., AGARKOVA, I., IGNATOV, A., DICKSTEIN, E. AND RAMUNDO, B.A., 2008. Reclassification of subspecies of *Acidovorax avena* as *A. avenae* (Manns 1905) emend., *A. cattleyae* (Pavarino, 1911) comb. nov., *A. citrulli* (Schaad *et al*., 1978) comb. nov., and proposal of *A. oryzae* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology* 31(6/8):434-446.

SEO, S.T., PARK, J.H., LEE, J.S., HAN, K.S. AND CHEONG, S.R., 2006. Bacterial fruit blotch of melon caused by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. *Research in Plant Disease* 12(3):185-188.

SILVA NETO, E.B., SILVEIRA, E.B., MARIANO, R.L.R., NOGUEIRA, N.L., ROSSI, M.L. AND SANTOS, L.A., 2006. Penetration and colonization of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* on leaves, fruits and seeds of yellow melon. Phytopathology, 31:84-88.

SOLMAZ, I. VE SARI, N., 2009. Characterization of Watermelon (*Citrullus lanatus*) Accessions Collected from Turkey for Morphological Traits. Genet. Resour. Crop Evol., 56(2): 173-188.

SOLMAZ, İ., 2010. Bazı karpuz genotiplerinin SSR ve SRAP markörleri ilekarakterizasyonu ve Fusarıum solgunluğu (*Fusarium oxysporum* f.sp. *niveum*)'na dayanımlarının klasik ve moleküleryöntemlerle araştırılması. Ç.Ü. Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Doktora Tezi.

SOMODI, G.C., JONES, J.B., HOPKINS, D.L., STALL, R.E., KUCHAREK, T.A., HODGE, N.C. AND WATTERSON, J.C., 1991. Occurence of a bacterial watermelon fruit blotch in Florida. Plant Dis. 75:1053-1056.

SONG, S.H., WU, P.,MENG, S.C.,GONG, G.Y. AND XIN, B.T., 2013. Efficiency of seed treatments on controlling watermelon bacterial fruit blotch. China Cucurbits and Vegetables 26 (3) 5-9.

SOWELL, G., JR. AND SCHAAD, N.W., 1979. *Pseudomonas pseodoalcaligenes* subsp *citrulli* on watermelon. Seed transmission and resistance of plant introductions. Plant Dis. Rep. 63:437-441.

SUNDSTROM, F. J., GUZMAN, P. AND STEWART, R. F., 2003. California Crop Improvement Association Disease Inspection Program: production practices for clean seed.Hort Technology 13 (1) 48-49.

TAKASHI, S., SHIGEMIKATO, K., ABIKO, T. AND AKIRA, K., 2000. Occurence of watermelon bacterial fruit blotch in Japan. Annals of the Phytopathological Society of Japan, 66(3):223-231.

THAITRONG, N., CHARLERMROJ, R., HIMANANTO, O., SEEPIBAN, C. AND KAROONUTHAISIRI, N., 2013. Implementation of microfluidic sandwich ELISA for superior detection of plant pathogens. Plos one 8(12)

TIAN, Y.L.,ZHAO, Y.Q., HU, B.S. AND LIU, F.Q., 2013a. First report of seedling blight of watermelon caused by *Acidovorax citrulli* transmitted from rootstock of pumpkin in China. Plant Dis.97(3):420.

TIAN, Y.L.,ZHAO, Y.Q.,BAI, S.,WALCOTT, R. R., HU, B.S. AND LIU, F.Q., 2013b. Reliable and sensitive detection of *Acidovorax citrulli* in cucurbit seed using a padlock-probe-based assay. Plant Disease 97 (7) 961-966.

TİRENG-KARUT, Ş., 2011. Organik tarımda domates bakteriyel solgunluk hastalığı etmenine (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) karşı kullanılabilecek tohum uygulamaları. Ç. Ü. Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü – Yüksek Lisans Tezi

TOKGÖNÜL, S., 1998. Ticari domates tohumlarında bakteriyel solgunluk etmeni (*Clavibacter michiganenis* subsp. *michiganensis*)'nin saptanması ve etmene karşı mücadele olanakları üzerinde araştırmalar. Doktora Tezi, sayfa:93, Ç.Ü. Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Anabilin Dalı.

TOKGÖZ, H., GÖLÜKCÜ, M. VE TOKER, M., 2012. Karpuzun (Citrullus lanatus) bazı fiziksel, kimyasal ve duyusal özellikleri üzerine aşılı fide kullanımının etkileri. Gıda Yem program adlı, BATEM Projesi.

TZENG, K.C. AND HSU, S.T., 2007. Bacterial Diseases of Cucurbits in Taiwan. Symposium of International Workshop on the Cucurbit Diseases and Resistance Breeding, 43-48.

WALCOTT, R.R. AND GITAITIS, R.D., 2000. Detection of *Acidovorax avenae* subsp *citrulli* in watermelon seed using immunomagnetig seperation and the polymerase chain reaction. Plant Dis. 84:470-474.

WALCOTT, R. R., LANGSTON, JR., D. B., SANDERS, JR., F. H. AND GITAITIS, R. D. 2000. Investigating intraspecific variation of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* using DNA fingerprinting and whole cell fatty acid analysis. Phytopathology, 90:191-196.

WALCOTT, R. R., GITAITIS, R. D. AND CASTRO, A. C., 2003. Role of blossoms in watermelon seed infestation by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. Phytopathology, 93(5):528-534.

WALCOTT, R.R., FESSEHAIE, A. AND CASTRO, A.C., 2004. Differences in pathogenicity between two genetically distinct groups of *Acidovorax avenae* subsp *citrulli* on cucurbits hosts. J. Phytopathology 152:277-285.

WALCOTT, R. R., CASTRO, A. C., FESSEHAIE, A. AND LING, K., 2006. Progress towards a commercial PCR-based seed assay for *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. Seed Science and Technology, 34(1):101-116.

WALCOTT, R.R., 2008. Integrated pest management of bacterial fruit blotch of cucurbits. Integrated Management of Diseases Caused by Fungi, Phytoplasma and Bacteria, 191-209.

WALL, G.C. AND SANTOS, V.M., 1988. A new bacterial disease on watermelon in the Mariana Islands. Phytopathology, 78:1605.

WALL, G.C., 1989. Control of watermelon fruit blotch by seed heat-treatments. Phytopathology, 79:1191.

WANG, J.,LIU, Q.,CHEN, N.L.,LIU, J.Z. AND BI, Y., 2011. Comparison of pathogen enrichment methods for detecting *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* from watermelon seeds. African Journal of Microbiology Research 5 (30) 5444-5452.

WEBB, R.E. AND GOTH, R.W. 1965. A seedborne bacterium isolated from watermelon. Plant Dis. Rep. 49:818-821.

WILLEMS, GOOR, THIELEMANS, GILLIS, KERSTERS AND DE LEY, 1992. *Acidovorax avenae* subsp *citrulli*. International Journal of Systematic Bacteriology, 42:107-119.

WOLF VAN DER, J.M., BIRNBAUN, Y., ZOUWEN VAN DER, P.S. AND GROOT, S.P.C., 2008. Disinfection of vegetable seed by treatment with essential oils, organic acids and plant extracts. Seed Science and Technology, 36:76-88.

XU, F.S., WANG, X., XIE, G.L., SU, T. AND YU, S.H., 2008. Detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* from seeds of watermelon by Immuno-capture PCR. Journal of Fruit Science 25 (2): 215-218.

ZHANG, G. Y., ZHANG, F., JIANG, L. G., ZHAI, W. B. AND LI, H. Z., 2012. Detection of bacterial fruit blotch in *Cucurbita pepo* seeds and seed disinfection. Cucurbitaceae 2012, Proceedings of the Xth EUCARPIA Meeting on Genetics and Breeding of Cucurbitaceae, Antalya, Turkey, 15-18 October, 2012 pp. 197-201.

ZHAO, T.C., SUN, F.Z., WANG, J.R. AND XIE, Y.J., 2003. Treatment of muskmelon seeds with fungicides for the control of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. Plant Protection 29 (4) 50-53.

ZHAO, L.H., WANG, X., XIE, G.L., XU, F.S. AND XIE, G.X., 2006. Detection of the pathogen associated with bacterial fruit blotch of watermelon by immuno-capture PCR. Journal of Agricultural Biotechnology 14 (6) 946-951.

ZHAO, T., FENG, J., SECHLER, A., RANDHAWA, P., LI, J. AND SCHAAD, N. W., 2009. An improved assay for detection of *Acidovorax citrulli* in watermelon and melon seed. Seed Science and Technology 37 (2) 337-349.

ZHAO, W.J., LU, J.,MA, W.W.,XU, C.L.,KUANG, H. AND ZHU, S.F., 2011. Rapid on-site detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* by gold-labeled DNA strip sensor. Biosensors & Bioelectronics 26 (10) 4241-4244.

ZITTER, A.T., HOPKINS, D.L. AND THOMAS, C.E., 1996. Compedium of cucurbit diseases. APS Press The American Phytopathological Society, page:34.

ÖZGEÇMİŞ

19/08/1979 yılında Dörtyol'da doğdu. İlköğretim ve lise öğrenimini Adana'da tamamladı. 1998 yılında başladığı Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü'nden 2003 yılında mezun oldu. Aynı yıl Bitki Koruma Bölümü Fitopatoloji Anabilim Dalı Bakteriyoloji Laboratuarında yüksek lisansa başladı ve'Farklı Begonya Çeşitlerinin *Xanthomonas axonopodis* pv. *begoniae*'ya Karşi Reaksiyonu' adlı yüksek lisans tezini 2006 yılında tamamladı. Aynı yıl bu bölümde doktora eğitimine kayıt oldu. 2007 yılında Antalya Zirai Karantina Müdürlüğü'nde tohum testlerinde bakteriyoloji uzmanı olarak göreve başladı. Halen bu kurumda görev yapmaktadır. Evli ve Eren adında bir oğlu bulunmaktadır.

EKLER

EK 1
***Acidovorax citrullii* İzolasyonu ve Karakterizasyonu Çalışmalarında Kullanılan Besi Yerleri**

Nutrient Agar (NA) Besi Yeri (Lelliot ve Stead, 1987)

Nutrient Agar	13,0 g
Distile Su	1000 ml

121°C'de 15 dakika otoklav edilmiştir.

King B Besi Yeri (King ve ark 1954)

Proteose Peptone	20 g
Gliserin	10 ml
K_2HPO_4	1,5 g
$MgSO_47H_2O$	1,5 g
Agar	15 g
Distile Su	1000 ml

121°C'de 15 dakika otoklav edilmiştir.

P-278 Besi Yeri (Randhawa ve ark., 2001)

$MgSO_4.7H_2O$	1,5 g
K_2HPO_4	1,5 g
Glycerol	1,5 ml
Proteose peptone (No:3)	20 g
Brothymol blue	1,5 ml (10 mg/ml destile su)
Methyl violet	100 µl (10 mg/ml destile su)
Agar	15 g
Distile Su	1000 ml

121°C'de 15 dakika otoklav işleminden sonra soğuk steril edilen aşağida verilen kimyasallar eklenir

Cycloheximide	1 ml (100 mg/ml metanol)
Vancomycin	1 ml (1 mg/ml destile su)
Ampicillin-Na	1 ml (1 mg/ml destile su)
Gentamycin	100 µl (10 mg/ml destile su)
5-Flourosil	1 ml (10 mg/ml destile su)
Cefaclor	1 ml (10 mg/ml destile su)

EK 2

ELISA Çalışmalarında Kullanılan Çözeltiler

PBS

NaCl	8 g
$Na_2HPO_4.12H_2O$	2,9 g
KH_2PO_4	0,2 g
KCl	0,2 g
NaN_3	0,2 g
Destile Su	1000 ml
pH	7,4

PBST=Washing Buffer

PBS	1000 ml
Tween 20	0,5 ml
Ph	7,4

Coating Buffer

Na_2CO_3	1,59 g
$NaHCO_3$	2,93 g
NaN_3	0,2 g
Bromocresol purple	5 mg
Destile Su	1000 ml
pH	9,6

Conjugate Buffer 1X

PBST 1X	1000 ml
BSA	2 g
Congo Red	40 mg
pH	7,4

Substrate (pNPP) Buffer

Diethanolamine	97 ml
NaN_3	0,2 g
Destile Su	1000 ml
pH	9,8

EK 3

PCR Çalışmalarında Kullanılan Çözeltiler

Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) (%1)

TAE Buffer	1000 ml
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	10 g

Sıcak su bulunan büyük bir beher içerisine içinde TAE bulunan beher konur ve içine SDS ilave edilerek iyice eriyene kadar karıştırılır.

7,5 M Amonyum Asetat

57,75 g amonyum asetat 100 ml saf su içerisinde çözülmüştür.

TAE Buffer (10 Mm Tris, 1 mM EDTA, pH: 8,3)

Tris-HCl	0, 24 g
EDTA	0,074 g
Saf Su	200 ml

6,5X Loading Buffer

Bromofenol mavisi	30,0 mg
5XTBE	4,25 ml
Gliserin	5,75 ml

TBE Buffer

Tris	107,89 g
Borik Asit	55,0 g
Na2EDTA	7,44 g
Saf Su	1000 ml
pH	8,3

EK 4

Immunofloresan (IF) Çalışmasında Kullanılan Çözeltiler

Ekstraksiyon Buffer (50 mM phosphate buffer, pH:7.0)

Bu buffer bitki dokusundan homojenizasyon yoluyla bakterinin ekstraksiyonu için kullanılır.

Na_2HPO_4	4,26 g
KH_2PO_4	2,72 g
Destile Su	1000 ml

Pellet Buffer (10 mM phosphate buffer, pH:7,2)

Bu buffer bakteri ekstraksiyonunun santrifüjünden sonra elde edilen pelletin seyreltmelerinde kullanılır.

Na_2HPO_4.12H2O	2,7 g
NaH2PO4.2H2O	0,4 g
Destile Su	1000 ml

IF-Buffer (10 mM phosphate buffersaline (PBS), pH:7,2)

Bu buffer antibodylerin seyreltmesinde kullanılır.

EK 5

İstatistiki Analizler

FİZİKSEL VE KİMYASAL TOHUM UYGULAMALARININ BAKTERİYEL FİDE YANIKLIĞI HASTALIĞINA ETKİSİ (ÖN DENEME)

ONE WAY ANOVA COMPLETELY RANDOMIZED

Variable:

Source	SS	df	MS	F	P
Main Effects	12411.8336	6	2068.6389333	3717.5807075	.0000 ***
Error	7.7902666667	14	0.556447619		
Total	12419.623867	20			

Duncan's Multiple Range Test
Factor:
Error mean square = 0.556447619
Degrees of freedom = 14
Significance level = 5%
LSD .05 = 1.3063231406

Rank	Trt#	Mean	n	Non-significant ranges
1	POZİTİF KONTROL	81.74	3	a
2	%0.525’lik NaOCl 20 dakika	66.086666667	3	b
3	%1.8’lik HCl + %0.525’lik NaOCl 15 dak	26.73	3	c
4	%30’luk laktik asit 20 dakika	24.663333333	3	d
5	%30’luk laktik asit 30 dakika	21.713333333	3	e
6	%30’luk laktik asit 15 dakika	21.63	3	e
7	%1.8’lik HCl 5 dakika	13.263333333	3	f

FİZİKSEL VE KİMYASAL TOHUM UYGULAMALARININ BAKTERİYEL FİDE YANIKLIĞI HASTALIĞINA ETKİSİ (BİRİNCİ DENEME)

ONE WAY ANOVA COMPLETELY RANDOMIZED
Jul 3, 2014 4:26:40 pm
Using: D:\MASAST~1\ANOVAA~1\COSTAT\HAT1.DT
Variable:

Source	SS	df	MS	F	P
Main Effects	10939.230733	15	729.28204889	47.688551949	.0000 ***
Error	489.36326667	32	15.292602083		
Total	11428.594	47			

Duncan's Multiple Range Test
Factor:
Error mean square = 15.292602083
Degrees of freedom = 32
Significance level = 5%
LSD .05 = 6.5038704498

Rank	Trt#	Mean	n	Non-significant ranges
1	POZİTİF KONTROL	67.753333333	3	a
2	%1.8'lik HCl 5 dk	21.746666667	3	b
3	55 ^{o}C'de 10 dk	20.5	3	bc
4	50 ^{o}C'de 10 dk	20.443333333	3	bc
5	50 ^{o}C'de 15 dk	14.836666667	3	bcd
6	%0.525'lik NaOCl 20 dk	13.953333333	3	cde
7	55 ^{o}C'de 15 dk	12.97	3	de
8	60 C'de 10 dk	11.62	3	de
9	%2'lik laktik asit 10 dk	8.33	3	def
10	60 ^{o}C'de 15 dk	7.95	3	def
11	%2'lik laktik asit 15 dk	7.8133333333	3	def
12	50 ^{o}C'de 20 dk	6.7066666667	3	ef
13	%1.8'lik HCl + %0.525'lik NaOCl 15 dk	6.67	3	ef
14	60 ^{o}C'de 20 dk	3.8266666667	3	f
15	55 ^{o}C'de 20 dk	2.0066666667	3	f
16	%2'lik laktik asit 20 dk	1.9133333333	3	f

FİZİKSEL VE KİMYASAL TOHUM UYGULAMALARININ BAKTERİYEL FİDE YANIKLIĞI HASTALIĞINA ETKİSİ (İKİNCİ DENEME)

ONE WAY ANOVA COMPLETELY RANDOMIZED
Jul 3, 2014 4:51:53 pm
Using: D:\MASAST~1\ANOVAA~1\COSTAT\HAT2.DT
Variable:

Source	SS	df	MS	F	P
Main Effects	9942.1812583	15	662.81208389	40.744504997	.0000 ***
Error	520.56066667	32	16.267520833		
Total	10462.741925	47			

Duncan's Multiple Range Test
Factor:
Error mean square = 16.267520833
Degrees of freedom = 32
Significance level = 5%
LSD .05 = 6.7079817699

Rank	Trt#	Mean	n	Non-significant ranges
1	POZİTİF KONTROL	65.653333333	3	a
2	%0.525'lik NaOCl 20 dk	14.183333333	3	b
3	50 ^{o}C'de 10 dk	13.546666667	3	b
4	55 ^{o}C'de 10 dk	11.44	3	bc
5	60 C'de 10 dk	11.43	3	bc
6	50 ^{o}C'de 15 dk	11.323333333	3	bc
7	%1.8'lik HCl + %0.525'lik NaOCl 15 dk	11.296666667	3	bc
8	55 ^{o}C'de 20 dk	8.34	3	bcd
9	55 ^{o}C'de 15 dk	8.13	3	bcd
10	50 ^{o}C'de 20 dk	7.91	3	bcd
11	60 ^{o}C'de 15 dk	7.3333333333	3	bcde
12	%2'lik laktik asit 10 dk	7.3333333333	3	bcde
13	%1.8'lik HCl 5 dk	6.6533333333	3	bcde
14	60 ^{o}C'de 20 dk	4.0133333333	3	cde
15	%2'lik laktik asit 15 dk	1.9133333333	3	de
16	%2'lik laktik asit 20 dk	0	3	e

FİZİKSEL VE KİMYASAL TOHUM UYGULAMALARININ BAKTERİYEL FİDE YANIKLIĞI HASTALIĞINA ETKİSİ (TOPLAM DENEME)

ONE WAY ANOVA COMPLETELY RANDOMIZED
Jul 3, 2014 5:06:38 pm
Using: D:\MASAST~1\ANOVAA~1\COSTAT\TOPLU1.DT
Variable:

Source	SS	df	MS	F	P
Main Effects	20269.808462	15	1351.3205642	61.396546362	.0000 ***
Error	1760.7773	80	22.00971625		
Total	22030.585762	95			

Duncan's Multiple Range Test
Factor:
Error mean square = 22.00971625
Degrees of freedom = 80
Significance level = 5%
LSD .05 = 5.390307135

Rank	Trt#	Mean	n	Non-significant ranges
1	POZİTİF KONTROL	66.703333333	6	a
2	50 ^{o}C'de 10 dk	16.995	6	b
3	55 ^{o}C'de 10 dk	15.97	6	bc
4	%1.8'lik HCl 5 dk	14.2	6	bcd
5	%0.525'lik NaOCl 20 dk	14.068333333	6	bcd
6	50 ^{o}C'de 15 dk	13.08	6	bcde
7	60 C'de 10 dk	11.525	6	bcde
8	55 ^{o}C'de 15 dk	10.55	6	cdef
9	%1.8'lik HCl + %0.525'lik NaOCl 15 dk	8.9833333333	6	defg
10	%2'lik laktik asit 10 dk)	7.8316666667	6	efg
11	60 ^{o}C'de 15 dk	7.6416666667	6	efg
12	50 ^{o}C'de 20 dk	7.3083333333	6	efg
13	55 ^{o}C'de 20 dk	5.1733333333	6	fgh
14	%2'lik laktik asit 15 dk	4.8633333333	6	fgh
15	60 ^{o}C'de 20 dk	3.92	6	gh
16	%2'lik laktik asit 20 dk)	0.9566666667	6	h

FİZİKSEL VE KİMYASAL TOHUM UYGULAMALARININ KARPUZ TOHUMLARININ ÇİMLENMESİNE ETKİSİ (ÖN DENEME)

ONE WAY ANOVA COMPLETELY RANDOMIZED
Jul 4, 2014 10:00:24 am
Using: H:\ANOVAA~1\COSTAT\ONDENEME.DT
Variable:

Source	SS	df	MS	F	P
Main Effects	13325.129657	6	2220.8549429	1062.9805742	.0000 ***
Error	29.2498	14	2.0892714286		
Total	13354.379457	20			

Press any key ->

Duncan's Multiple Range Test
Factor:
Error mean square = 2.0892714286
Degrees of freedom = 14
Significance level = 5%
LSD .05 = 2.5312550588

Rank	Trt#	Mean	n	Non-significant ranges
1	STERİL SU	83.91	3	a
2	%1.8’lik HCl 5dk	77.093333333	3	b
3	%0.525’lik NaOCl 20 dk	73.713333333	3	c
4	%0.525’lik NaOCl+%1.8’lik HCl 15 dk	70.45	3	d
5	%30’luk laktik asit 15 dk	41.543333333	3	e
6	%30’luk laktik asit 20 dk	27.26	3	f
7	%30’luk laktik asit 30 dk	15.24	3	g

FİZİKSEL VE KİMYASAL TOHUM UYGULAMALARININ KARPUZ TOHUMLARININ ÇİMLENMESİNE ETKİSİ (BİRİNCİ DENEME)

ONE WAY ANOVA COMPLETELY RANDOMIZED
Jul 4, 2014 10:14:39 am
Using: H:\ANOVAA~1\COSTAT\1.DT
Variable:

Source	SS	df	MS	F	P
Main Effects	53673.161656	18	2981.8423142	103.0957548	.0000 ***
Error	1099.0754	38	28.923036842		
Total	54772.237056	56			

Press any key ->
Duncan's Multiple Range Test
Factor:
Error mean square = 28.923036842
Degrees of freedom = 38
Significance level = 5%
LSD .05 = 8.8893783794

Rank	Trt#	Mean	n	Non-significant ranges
1	STERİL SU	94.086666667	3	a
2	%1.8'lik HCl 5dk	94.086666667	3	a
3	60°C'de 15 dk	89.173333333	3	ab
4	%0.525'lik NaOCl 20 dk	89.173333333	3	ab
5	50°C'de 20 dk	86.443333333	3	abc
6	%2'lik laktik asit 20 dk	86.14	3	abc
7	55°C'de 10 dk	82.05	3	bcd
8	60°C'de 20 dk	81.433333333	3	bcd
9	%2'lik laktik asit 15 dk	79.853333333	3	bcd
10	50°C'de 10 dk	79.126666667	3	bcd
11	55°C'de 20 dk	78.94	3	bcd
12	%2'lik laktik asit 10 dk	78.486666667	3	cd
13	%0.525'lik NaOCl+%1.8'lik HCl 15 dk	78.256666667	3	cd
14	60°C'de 10 dk	76.833333333	3	cd
15	50°C'de 15 dk	76.47	3	cd
16	55°C'de 15 dk	71.673333333	3	d
17	65°C'de 15 dk	0	3	e
18	65°C'de 10 dk	0	3	e
19	65°C'de 20 dk	0	3	e

FİZİKSEL VE KİMYASAL TOHUM UYGULAMALARININ KARPUZ TOHUMLARININ ÇİMLENMESİNE ETKİSİ (İKİNCİ DENEME)

ONE WAY ANOVA COMPLETELY RANDOMIZED
Jul 4, 2014 8:19:18 am
Using: H:\ANOVAA~1\COSTAT\2CIM.DT
Variable:

Source	SS	df	MS	F	P
Main Effects	4027.1129333	15	268.47419556	8.8398831928	.0000 ***
Error	971.86513333	32	30.370785417		
Total	4998.9780667	47			

Press any key ->

Duncan's Multiple Range Test
Factor:
Error mean square = 30.370785417
Degrees of freedom = 32
Significance level = 5%
LSD .05 = 9.1655641105

Rank	Trt#	Mean	n	Non-significant ranges
1	STERİL SU	99	3	a
2	%2'lik laktik asit 10 dk	99	3	a
3	50°C'de 15 dk	94.086666667	3	a
4	55°C'de 15 dk	94.086666667	3	a
5	%0.525'lik NaOCl 20 dk	94.086666667	3	a
6	%2'lik laktik asit 15 dk	94.086666667	3	a
7	%2'lik laktik asit 20 dk	94.086666667	3	a
8	%1.8'lik HCl 5dk	82.326666667	3	b
9	60°C'de 15 dk	82.05	3	bc
10	50°C'de 10 dk	82.05	3	bc
11	%0.525'lik NaOCl+%1.8'lik HCl 15 dk	79.053333333	3	bc
12	60°C'de 20 dk	76.79	3	bc
13	60°C'de 10 dk	76.526666667	3	bc
14	50°C'de 20 dk	75.926666667	3	bc
15	55°C'de 10 dk	75.853333333	3	bc
16	55°C'de 20 dk	71.603333333	3	c