ÖZ

DOKTORA TEZİ

DOĞU AKDENİZ BÖLGESİ'NDE PATLICANDA FUSARİUM SOLGUNLUĞU HASTALIĞI (*Fusarium oxysporum* Schlecht. f. sp. *melongenae* Matuo and Ishigami)'NIN YAYGINLIĞI, ETMENİN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU ve BİTKİDE HASTALIĞA KARŞI DAYANIKLILIĞIN UYARILMASI

Hacer Handan ALTINOK

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

Danışman: Yard. Doç. Dr. Muharrem A. KAMBEROĞLU
Yıl: 2006, Sayfa: 141
Jüri: Yard. Doç. Dr. Muharrem A. KAMBEROĞLU
Prof. Dr. Ali ERKILIÇ
Prof. Dr. Abuzer SAĞIR
Prof. Dr. Saadettin BALOĞLU
Doç. Dr. Mehmet E. GÜLDÜR

Doğu Akdeniz Bölgesi'nde Fusarium solgunluk hastalığı (*Fusarium oxysporum* Schlecht. f. sp. *melongenae* Matuo and Ishigami), patlıcan yetiştiriciliği yapılan alanlarda ekonomik kayıplara neden olan en önemli patojenlerden biridir. Bu çalışmada, Mersin ve Adana ili ve yörelerinde 2002 yılı Nisan-Eylül ayları arasında, Fusarium solgunluk hastalığına neden olan patojenin yaygınlık oranı ve hastalık şiddeti araştırılmıştır. Mersin ilinde sera ve tünellerde hastalık yaygınlığı ve şiddeti sırasıyla % 42.1 ve % 18.5, açık alanlarda ise, % 33.5 ve % 15.1 olarak saptanmıştır. Açıkta yetiştiriciliğin yaygın olduğu Adana ilinde ise hastalık yaygınlık oranı ve hastalık şiddeti sırasıyla % 33.2 ve % 16.4 olarak saptanmıştır.

Patlıcanda Fusarium solgunluğuna karşı dayanıklılığın uyarılması çalışmalarında ise, Acibenzolar-S-methyl (ASM) ve patlıcanda patojen olmayan *Fusarium* türünün (FOM) hastalık gelişimine etkinlikleri saksı denemeleriyle belirlenmiştir. FOM uygulandıktan 72 saat sonra patojen uygulamasının, kontrole göre hastalık oluşumunu önlemede % 75.47, ASM uygulamasının ise, % 67.60 oranında etki gösterdiği saptanmıştır. ASM ve FOM uygulanan bu bitkilerde, lignifikasyonun yoğunluğunda ve dağılımında da farklılıklar belirlenmiştir. Patojene karşı bitki hücre duvarını güçlendiren lignin, Hipersensitif Reaksiyon (HR) göstererek ölmüş hücreler ile bu hücrelerin etrafında bulunan ksilem demetlerinde karakteristik olarak gözlenmiştir. Arazi denemelerinde, FOM uygulaması hastalığın önlenmesinde % 50.61, ASM uygulaması ise % 37.65 oranında etkili olmuştur. FOM uygulamasının hastalığın baskılanmasında ASM uygulamasından daha etkin olduğu, hem saksı hem de arazi denemeleriyle belirlenmiştir.

Fusarium oxysporum f. sp. *melongenae* izolatlarının genetik yakınlıkları, RAPD-PCR yöntemi ile belirlenmiştir. Amplifikasyon ürünleri agaroz jelde toplam 168 bant pozisyonu vermiş ve bunlardan 14 bandın polimorfik olduğu gözlenmiştir. Popogene (versiyon 1.32) populasyon genetik analiz programıyla oluşturulan dendrogramda 4 farklı RAPD grubu saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Survey, Fusarium Solgunluğu, Dayanıklılığın Uyarılması, RAPD-PCR

ABSTRACT

PhD THESIS

ABUNDANCE OF EGGPLANT WILT (*Fusarium oxysporum* Schlecht. f. sp. *melongenae* Matuo and Ishigami) IN EASTERN MEDITERRANEAN REGION, MOLECULAR CHARACTERIZATION OF AGENT AND INDUCED RESISTANCE OF PLANT AGAINST THE DISEASE

Hacer Handan ALTINOK

DEPARTMENT OF PLANT PROTECTION
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
UNIVERSITY OF ÇUKUROVA

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Muharrem A. KAMBEROĞLU
Year: 2006, Page: 141
Jury: Assist. Prof. Dr. Muharrem A. KAMBEROĞLU
Prof. Dr. Ali ERKILIÇ
Prof. Dr. Abuzer SAĞIR
Prof. Dr. Saadettin BALOĞLU
Assoc. Prof. Dr. Mehmet E. GÜLDÜR

Fusarium Wilt disease (*Fusarium oxysporum* Schlecht. f. sp. *melongenae* Matuo and Ishigami) is one of the major pathogens causing economical losses in eggplant production fields in Eastern Mediterranean region of Turkey. In this study, disease prevalence and severity of the pathogen have been investigated in Adana and Mersin provinces, between April-September 2002. Disease prevalence and severity in Mersin were determined as 42.1 % and 18.5 % in greenhouses; 33.5 % and 15.1 % in field, respectively. In Adana where field production is more common, disease prevalence and severity were determined as 33.2 % and 16.4 %, respectively.

The effect of Acibenzolar-S-methyl (ASM) and non-pathogenic *Fusarium* species (FOM) on disease development were determined with pot experiments in order to induce resistance against Fusarium wilt on eggplants. FOM and ASM applications after 72 hours of pathogen inoculation were found effective on prevention of disease occurrence at a rate of 75.47 % and 67.60 % respectively, compared to control plants. Differences were determined also in density and distribution of lignification, on the plants treated with ASM and FOM. Characteristic lignin formations which strengthen the cell wall against pathogens were observed in the cells die from hypersensitive reactions (HR), and xylem bundles around these cells. FOM applications have shown an effect of 50.61 % and ASM 37.65 %, in field experiments. FOM applications were found more effective than ASM on suppression of the disease in both pot and field experiments.

Genetic distances of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melongenae* isolates were determined with RAPD-PCR method. Amplification products have given a total of 168 band positions in agarose gel, and 14 of these bands were found polymorphic. Four different RAPD groups were determined by dendrogram analysis created with Popgene (version 1.32) software.

Key Words: Survey, Fusarium Wilt, Induced Resistance, RAPD-PCR

ÖNSÖZ

Ülkemiz sahip olduğu ekolojik özellikleri nedeniyle, özellikle sebze üretiminde dünyadaki önemli ülkelerden biri durumundadır. Ülkemizde en önemli sektörlerden biri tarım sektörü olup, bu sektörde sebze üretimi büyük bir paya sahiptir. Sebze üretiminde ilk sıralarda yer alan Doğu Akdeniz Bölgesinde, ekonomik anlamda yetiştiriciliği yapılan sebzelerden biri de patlıcan bitkisidir. Bu üründe görülen fungal hastalıklardan en önemlisi solgunluk hastalığı olup, büyük oranda verim kayıplarına neden olmaktadır. Patlıcanda Fusarium solgunluk hastalığı etmeni olan *F. oxysporum* f. sp. *melongenae*'nın varlığı 1958 yılından bu yana bilinmektedir. Ülkemizde de 1982 yılında, Akdeniz ve Ege Bölgesi'nde patlıcanda *Fusarium* sp. bildirilmiştir.

Toprakta uzun süre canlı kalabilen bu etmen için kimyasal kontrol tek başına başarısız olmaktadır. Dünyada ve ülkemizde metil bromid kullanımına getirilen sınırlamalar göz önünde bulundurulduğunda, toprak kökenli patojenlerle savaşımda kimyasal savaşa alternatif kontrol yöntemlerinin araştırılması kaçınılmaz görülmektedir. Bu düşünce ışığı altında planlanan bu doktora tezinde, öncelikle Doğu Akdeniz Bölgesi'nde Fusarium solgunluk hastalığının % hastalık oranı ve şiddeti saptanmıştır. Survey çalışmaları sonucunda, Adana ve Mersin illeri ve çevresinde patlıcan tarımının yapıldığı alanlarda Fusarium solgunluk hastalığının yaygın olduğu ve ekonomik kayıplara neden olduğu ortaya konulmuştur. Çalışmanın sonraki aşamalarında, surveyler sırasında elde edilen, 47 adet *Fusarium oxysporum* f. sp. *melongenae* izolatının patojenitesi belirlenmiştir. Bitkide dayanıklılık uyarıcı abiyotik (Acibenzolar-S-methyl; ASM) ve biyotik (patojen olmayan *Fusarium*) iki faktörün Fusarium solgunluk hastalığının gelişimine olan etkisi araştırılmış ve her iki dayanıklılık uyarıcının da hastalığın baskılanmasında etkin olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, genetik karakterizasyonu henüz yapılmamış bu etmenin, bölge izolatları arasındaki genetik varyasyon, RAPD-PCR (Randomly Amplified Polymorphic DNA-PCR) yöntemiyle belirlenmiş ve 4 farklı RAPD grubu saptanmıştır.

Benzer konularda çalışan kişilere ve gelecekte yapılacak çalışmalara, bu tezden elde edilen bulguların yararlı olmasını dilerim.

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimime başladığım andan itibaren, başta tez konumun belirlenmesi ve çalışmanın yönlendirilmesi olmak üzere, her konuda desteğini esirgemeyen ve 2002 yılında aramızdan ayrılan Sayın Hocam Doç. Dr. Yeter CANIHOŞ'u sevgi ve saygıyla anıyorum.

Çalışmalarım süresince büyük emeği geçen ve her konuda destek olan Sayın Hocam Yard. Doç. Dr. Muharrem A. KAMBEROĞLU'na teşekkürlerimi sunarım. Çalışmalarım sırasında bana yardımcı olan ve laboratuvarlarını kullanma fırsatı veren Sayın Hocalarım Prof. Dr. Ali ERKILIÇ, Prof. Dr. Mehmet A. YILMAZ ve Prof. Dr. Saadettin BALOĞLU'na teşekkür ederim. Sayın Prof. Dr. İsmail KARACA ve Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü yetkililerine desteklerinden dolayı teşekkür ederim. Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölüm Başkanlığı'na teşekkür ederim. Çalışmalarım sırasında emeği geçen Yüksek Lisans öğrencisi Ayşe KARAMANLI, Mikoloji ve Viroloji laboratuvar arkadaşlarım ile bölüm arazisinde çalışan personele teşekkür ederim. Arazi çalışmalarımda yardımcı olan Adana Zirai Mücadele Araştırma Enstitüsü yöneticilerine ve değerli çalışanlarına teşekkür ederim. Dayanıklılığın uyarılması çalışmalarında yardımcı olan, M.K.Ü. Bitki Koruma Bölümü'nde Sayın Yard. Doç. Dr. Soner SOYLU'ya teşekkür edrim. Tezimin agaroz jel elektroforez işlemlerinde yardımcı olan, Ç. Ü. Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı teknik elemanı Sayın Erdal ÖZDOLAP ve diğer çalışanlarına teşekkür ederim. İzolatlarımın genetik karakterizasyonunda, ODTÜ Kimya Bölümünde analizlerin yapılması sırasında olanak sağlayan ve yardımlarını esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Mahinur AKKAYA ve Araş. Gör. Figen YILDIRIM'a teşekkür ederim. Tarsus'ta sürdürdüğüm arazi çalışmalarıma yardımcı olan Sayın KANAL ailesine teşekkür ederim.

Doktora tez projeme maddi destek veren Çukurova ve Süleyman Demirel Üniversiteleri Bilimsel Araştırma Proje Birimlerine teşekkür ederim.

Maddi ve manevi her konuda desteklerini esirgemeyen, MİMTAŞ ve ALTINOK ailelerine teşekkürlerimi sunuyorum.

Yaşantımın her aşamasında, manevi desteğini sürekli hissettiğim sevgili eşim Alper'e ve her zaman içten gülümsemesi ile sıcacık sarılan, özellikle Almanya'da kaldığım sürede sabır ve özlemle annesine kavuşacağı günleri bekleyen biricik kızım Buse'ye de teşekkür ediyorum.

İÇİNDEKİLER **SAYFA**

ÖZ I
ABSTRACT II
ÖNSÖZ III
TEŞEKKÜR IV
İÇİNDEKİLER V
ÇİZELGELER DİZİNİ VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ X
SİMGELER ve KISALTMALAR XII
1. GİRİŞ 1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 14
2.1. Patlıcanda Fusarium Solgunluk Hastalığı Etmeni ve Yaygınlığı ile İlgili Çalışmalar 14
2.2. Bitki Fungal Hastalıklarına Karşı Dayanıklılığın Uyarılmasına Yönelik Çalışmalar 16
2.2.1. Abiyotik Uyarıcılarla İlgili Yapılan Çalışmalar 16
2.2.2. Biyotik Uyarıcılarla İlgili Yapılan Çalışmalar 21
2.3. *Fusarium* Türlerinin Moleküler Karakterizasyonuna Yönelik Çalışmalar 28
3. MATERYAL VE METOD 33
3.1. Materyal 33
3.2. Metod 35
3.2.1. Patlıcan Ekim Alanlarında Fusarium Solgunluk Hastalığı Surveyi 35
3.2.2. Patojenin İzolasyonu ve Patojenite Çalışmaları 37
3.2.3. Fom İzolatlarının Makroskobik ve Mikroskobik Tanısı 39
3.2.4. Acibenzolar-S-Methyl (ASM)'nin Fom'un Miseliyal Gelişimine Etkisi 40
3.2.5. Farklı Patlıcan Çeşitlerinin Fusarium Solgunluk Hastalığına Reaksiyonu 41
3.2.6. Patlıcanda Fusarium Solgunluğuna Karşı Dayanıklılığın Uyarılması Çalışmaları 41
3.2.6.1. Dayanıklılığın Uyarıldığı Bitkilerden Elde Edilen Ekstraktların Fom'un Konidi Çimlenmesi Üzerine Etkisi 42
3.2.6.2. Histokimyasal Boyamalarla Lignin Sentezinin Belirlenmesi 43

3.2.7. Arazi Denemeleri 44
3.2.8. Fom İzolatlarının Moleküler Karakterizasyonu 46
3.2.8.1. Fom İzolatlarından DNA İzolasyonu 46
3.2.8.2. Fom İzolatlarının DNA Konsantrasyonu ve Saflık Derecesinin Ölçülmesi 48
3.2.8.3. Primer Seçimi 49
3.2.8.4. Amplifikasyon Sırasında Reaksiyona Girecek Bileşenlerin Optimum Konsantrasyonlarının Belirlenmesi 50
3.2.8.5. Amplifikasyon için Thermal Cycler Cihazının Programlanması 51
3.2.8.6. Agaroz Jel Elektroforez Çalışmaları ve DNA Bantlarının Analizi ... 52
4. BULGULAR ve TARTIŞMA 54
4.1. Patlıcan Ekim Alanlarında Fusarium Solgunluk Hastalığı Surveyi 54
4.2. Patojenin İzolasyonu ve Patojenite Çalışmaları 68
4.3. Fom İzolatlarının Makroskobik ve Mikroskobik Tanılanması 71
4.4. Acibenzolar-S-Methyl (ASM)'in Fom'un Miseliyal Gelişimine Etkisi 73
4.5. Farklı Patlıcan Çeşitlerinin Fusarium Solgunluk Hastalığına Reaksiyonu 74
4.6. Patlıcanda Fusarium Solgunluk Hastalığına Karşı Dayanıklılığın Uyarılması Çalışmaları 77
4.6.1. ASM ve FOM Uygulamasından 72 Saat Sonra Patojen İnokulasyonu ile Dayanıklılığın Uyarılması 81
4.6.1.1. Dayanıklılığın Uyarıldığı Bitkilerden Elde Edilen Ekstraktların Fom'un Konidi Çimlenmesi Üzerine Etkisi 84
4.6.1.2. Histokimyasal Boyamalarla Lignin Sentezinin Belirlenmesi 86
4.7. Arazi Denemeleri 88
4.7.1. Üretici Yüksek Tünelinde Arazi Denemesi 88
4.7.2. Açık Alanda Arazi Denemesi 91
4.8. Fom İzolatlarının Moleküler Karakterizasyonu 95
4.8.1. DNA Konsantrasyonu ve Saflık Derecesinin Ölçülmesi 96
4.8.2. RAPD-PCR Yöntemi ile DNA'ların Amplifikasyonu 97
4.8.3. RAPD-PCR Çalışmaları Sonucunda Elde Edilen DNA Bantlarının Analizi 97

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 109
KAYNAKLAR 115
ÖZGEÇMİŞ 133
EKLER 134

ÇİZELGELER DİZİNİ **SAYFA**

Çizelge 3.1. Şaşırtmayı izleyen haftalara göre alana atılması gereken ASM miktarı 44
Çizelge 3.2. RAPD-PCR analizleri için sentezlenen primerlerin nükleotid dizilimleri ve bağlanma sıcaklıkları 50
Çizelge 3.3. Amplifikasyonda bir örnek için reaksiyon bileşenlerinin oranları 51
Çizelge 3.4. Amplifikasyona girecek primerlerin gerçek *T*m'lerine göre belirlenen bağlanma sıcaklıkları 51
Çizelge 4.1. Mersin ili sera ve tünellerde, patlıcanda Fusarium solgunluk hastalığının 2002 yılı survey sonuçları 56
Çizelge 4.2. Mersin ili sera ve tünellerde, patlıcanda Fusarium solgunluk hastalığının 2002 yılı hastalık oranı ve şiddeti (%) 57
Çizelge 4.3. Adana ili sera ve tünellerde, patlıcanda Fusarium solgunluk hastalığının 2002 yılı survey sonuçları 60
Çizelge 4.4. Mersin ili açık alanlarda, patlıcanda Fusarium solgunluk hastalığının 2002 yılı survey sonuçları 61
Çizelge 4.5. Mersin ili açık alanlarda, patlıcanda Fusarium solgunluk hastalığının 2002 yılı hastalık oranı ve şiddeti (%) 62
Çizelge 4.6. Adana ili açık alanlarda, patlıcanda Fusarium solgunluk hastalığının 2002 yılı survey sonuçları 64
Çizelge 4.7. Adana ili açık alanlarda, patlıcanda Fusarium solgunluk hastalığının 2002 yılı hastalık oranı ve şiddeti (%) 65
Çizelge 4.8. Farklı bölge izolatlarının yaprak ve vasküler renklenme simptomlarına göre virulenslik değerleri ve dahil oldukları RAPD grupları 70
Çizelge 4.9. Farklı ASM dozlarının Fom'un koloni gelişimine ve miseliyal kuru ağırlığı üzerine etkisi 74
Çizelge 4.10. Yaprak ve vasküler renklenme simptomlarına göre farklı patlıcan çeşitlerinde Fusarium solgunluk hastalığının gelişimi 75
Çizelge 4.11. Fom ile inokule edilen patlıcan çeşitlerinde Fusarium solgunluk hastalığının infeksiyon gelişimi (cm) 75
Çizelge 4.12. ASM ve FOM uygulamasından 72 saat sonra patojen inokule edilen bitkilerde vasküler renklenme simptomlarına göre hastalık değerlendirmesi 82
Çizelge 4.13. Bitki ekstraktlarının Fom'un konidi çimlenmesine olan etkileri (%) 85

Çizelge 4.14. Üretici yüksek tünelinde ASM ve FOM uygulamasının patojenin infeksiyon hızı üzerine etkisi (cm) 89
Çizelge 4.15. Üretici yüksek tünelinde ASM ve FOM uygulamasının Fusarium solgunluk hastalığının gelişimine ve bitki boyuna etkisi 91
Çizelge 4.16. Açık alanda ASM ve FOM uygulamasının patojenin infeksiyon hızına etkisi (cm) 92
Çizelge 4.17. Açık alanda ASM ve FOM uygulamasının Fusarium solgunluk hastalığının gelişimine ve bitki boyuna etkisi 94
Çizelge 4.18. Fom izolatlarının 260 ve 280 nm dalga boyundaki absorbans değerleri 96
Çizelge 4.19. RAPD çalışmasında kullanılan primerler ve Fom izolatlarının oluşturdukları amplifiye ve polimorfik DNA fragmentleri 98
Çizelge 4.20. *F. oxysporum* f. sp. *melongenae* izolatlarının (Fom) genetik yakınlıkları 107

ŞEKİLLER DİZİNİ **SAYFA**

Şekil 4.1. Mersin ilinde survey yapılan patlıcan tarla alanının toplam tarla alanına oranı (%) 54
Şekil 4.2. Adana ilinde survey yapılan patlıcan tarla alanının toplam tarla alanına oranı (%) 54
Şekil 4.3. Patlıcanda Fusarium solgunluk hastalığının genel bitki (a), yaprak (b) ve vasküler renklenme (c) simptomları 55
Şekil 4.4. Mersin ili sera ve tünellerde, patlıcanda Fusarium solgunluk hastalığının 2002 yılı hastalık oranı ve şiddeti (%) 59
Şekil 4.5. Adana ili sera ve tünellerde, patlıcanda Fusarium solgunluk hastalığının 2002 yılı hastalık oranı ve şiddeti (%) 60
Şekil 4.6. Mersin ili açık alanlarda, patlıcanda Fusarium solgunluk hastalığının 2002 yılı hastalık oranı ve şiddeti (%) 63
Şekil 4.7. Adana ili açık alanlarda, patlıcanda Fusarium solgunluk hastalığının 2002 yılı hastalık oranı ve şiddeti (%) 66
Şekil 4.8. "Pala" patlıcan çeşidinde (*Solanum melongena* L.) patojenite denemesi (a: Kontrol, b: İnfekteli) 71
Şekil 4.9. Fom izolatlarının farklı sıcaklıklarda koloni gelişimleri 71
Şekil 4.10. *Fusarium oxysporum* f. sp. *melongenae*'nın koloni gelişimi 73
Şekil 4.11. Patlıcan bitkisinden izole edilen *Fusarium oxysporum* f. sp. *melongenae*'nın makrokonidi ve mikrokonidi şekilleri (Bar 40 μm) 73
Şekil 4.12. **"**Kemer ve Pala" patlıcan çeşitlerinin Fusarium solgunluk hastalığına gösterdikleri reaksiyon 76
Şekil 4.13. "Adana Topağı, Faselis F_1 ve İrena F_1" patlıcan çeşitlerinin Fusarium solgunluk hastalığına gösterdikleri reaksiyon 76
Şekil 4.14. Acibenzolar-S-methyl (ASM) uygulandıktan 24, 48, 72 ve 96 saat sonra patojen inokulasyonu sonucu Fusarium solgunluk hastalığının gelişimi 77
Şekil 4.15. Acibenzolar-S-methyl (ASM) uygulandıktan 24, 48, 72 ve 96 saat sonra patojen inokulasyonu sonucunda Fusarium solgunluk hastalığına patlıcan bitkilerinin gösterdikleri reaksiyon (a:24h; b:48h; c:72h; d:96h) 78
Şekil 4.16. *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* (FOM) uygulandıktan 24, 48, 72 ve 96 saat sonra patojen inokulasyonu sonucu patlıcan bitkisinde Fusarium solgunluk hastalığının gelişimi 79

Şekil 4.17. *F. oxysporum* f. sp. *melonis* (FOM) uygulandıktan 24, 48, 72 ve 96 saat sonra patojen inokulasyonu sonucunda Fusarium solgunluk hastalığına patlıcan bitkilerinin gösterdikleri reaksiyon (a:24h; b:48h; c:72h; d:96h) 80
Şekil 4.18. ASM ve FOM uygulamasından 72 saat sonra patojen inokulasyonu sonucu patlıcanda Fusarium solgunluk hastalığının gelişimi 81
Şekil 4.19. ASM ve FOM uygulanan bitkilerin köklerinde infeksiyon ve reaksiyon yerlerinde ligninlenmiş dokular (a: ASM; b: FOM; c: Kontrol) 87
Şekil 4.20. ASM ve FOM uygulanan bitkilerin gövdelerinde infeksiyon ve reaksiyon yerlerinde ligninlenmiş dokular (a: ASM; b: FOM; c: Kontrol) 87
Şekil 4.21. Üretici yüksek tünelinde ASM ve FOM uygulamalarının patlıcanda Fusarium solgunluk hastalığının gelişimine etkisi 90
Şekil 4.22. Açık alanda ASM ve FOM uygulamalarının patlıcanda Fusarium solgunluk hastalığının gelişimine etkisi 93
Şekil 4.23. OPB-01 primeriyle ile elde edilen RAPD-PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü 98
Şekil 4.24. OPB-14 primeriyle ile elde edilen RAPD-PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü 99
Şekil 4.25. OPB-03 primeriyle ile elde edilen RAPD-PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü 100
Şekil 4.26. OPB-08 primeriyle ile elde edilen RAPD-PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü 100
Şekil 4.27. OPB-07 primeriyle ile elde edilen RAPD-PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü 101
Şekil 4.28. OPF-05 primeriyle ile elde edilen RAPD-PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü 102
Şekil 4.29. OPF-10 primeriyle ile elde edilen RAPD-PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü 102
Şekil 4.30. *F. oxysporum* f. sp. *meolongenae* (Fom) izolatlarının RAPD-PCR çalışması sonucunda genetik yakınlıklarını gösteren dendrogram 104

SİMGELER ve KISALTMALAR

A : Adenin

ai : Aktif madde (active ingredient)

ASM : Acibenzolar-S-Methyl

β : Beta

BABA : DL-β-amino-n-butiric-asit

BTH : Benzothiadiazole

C : Sitozin

CDA : Czapek Dox Agar

cfu : Koloni oluşturan birim (colony forming unit)

cm : Santimetre

da : Dekar

dak : Dakika

dATP : Deoksiadenozintrifosfat

dCTP : Deoksisitidintrifosfat

dGTP : Deoksiguanozintrifosfat

dH_2O : Distile Su

DNA : Deoksiribo Nükleik Asit

dNTP : Deoksinükleotidtrifosfat

dTTP : Deoksitimidintrifosfat

EDTA : Etilen Daimin Tetra Asetik Asit

ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

f. sp. : Formae speciales

Fom : *Fusarium oxysporum* f. sp. *melongenae*

FOM : *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*

FOM-0 : *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* ırk 0

g : Gram

G : Guanin

h : Saat

ha : Hektar

HPLC : Yüksek Basınçlı Sıvı Kromotografi (High Pressure Liquid Chromatography)
HR : Aşırı Duyarlılık (Hypersensitive Reaction)
HRGP : Aminoasit Hidroksi Polince Zengin Glikoproteinler
IAA : İndol Asetik Asit
IGS : Intergenic Spacer
IR : Uyarılmış Dayanıklılık (Induced Resistance)
ITS : Internal Transcribed Spacer
Kb : Kilo baz (kilo base)
kg : Kilogram
L : Litre
LAR : Lokalize Kazandırılmış Dayanıklılık (Localized Acquired Resistance)
µg : Mikrogram (1/1000 mg)
µl : Mikrolitre
µm : Mikrometre
mg : Miligram ((1/100 gr)
ml : Mililitre
mm : Milimetre
ng : Nanogram (1/1000 µg)
nm : Nanometre
OD : Optik Yoğunluk (Optical Density)
PCR : Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
PD : Patates Dekstroz
PDA : Patates Dekstroz Agar
PEG : Polietilen Glikol
Pmol : Pikomol
PR : Patogenesisle ilişkili proteinler (Pathogenesis Related)
Pv. : Patovar
R : Dayanıklılık Geni
RAPD : Randomly Amplified Polymorphic DNA
RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism

RNA	:	Ribo Nükleik Asit
rDNA	:	Ribozomal DNA
rpm	:	Dakikada devir sayısı
SA	:	Salisilik Asit
SAR	:	Sistemik Kazandırılmış Dayanıklılık (Systemic Acquired Resistance)
SDS	:	Sodyum Dodesil Sülfat
sp.	:	Türleri
ssDNA	:	Tek İplikçikli DNA (Single Stranded DNA)
subsp.	:	Subspecies
T	:	Timin
Taq	:	Termo Stabil Polimeraz Enzimi
TBE	:	Tris-Borik Asit-EDTA
TE	:	Tris-EDTA
*T*m	:	Termal melting
TMV	:	Tütün Mozayik Virüsü
UV	:	Mor Ötesi (Ultra Viyole)
var	:	Varyete
v	:	Versiyon
V	:	Volt
VCG	:	Vejetatif Uyum Grubu (Vegetative Compatibility Group)
WG	:	Suda Dağılabilir Granül (Water Dispersable Granule)
w/v	:	Ağırlık/Hacim

1. GİRİŞ

Türkiye sahip olduğu ekolojik özellikleri nedeniyle, tarımsal üretim açısından dünyadaki önemli ülkelerden biri durumundadır. Ülkemizde tahıllar 63.000.000 tonluk üretimle en fazla üretimi yapılan tarım ürünlerini oluşturmaktadır. Tahıllardan sonra ikinci sırada yer alan sebze üretimi ise, yaklaşık 800.000 ha alanda yapılmakta olup, bu alandan toplam 22.000.0000 ton üretim elde edilmektedir (Anonymous, 2001).

Üretim açısından patlıcan (*Solanum melongenae* L.) Solanaceae familyası içerisinde patates ve domatesten sonra dünyada üçüncü sırada yer alan önemli bir sebzedir (Anonymous, 2000). Patlıcan bitkisi, ilk olarak eski dünya ülkelerinden Çin, Hindistan ve Tayland'da kültüre alınmıştır. Dünya patlıcan üretimi yaklaşık 30 milyon ton olup, Türkiye yıllık ortalama 970.000 ton patlıcan üretimiyle Çin ve Hindistan'dan sonra üçüncü sırada yer almaktadır (Anonymous, 2000). Bu üretimin yaklaşık 200.000 tonu Doğu Akdeniz Bölgesi'nden elde edilmektedir (Anonymous, 2001). Bu Bölgede, Mersin ilinde yaklaşık 1.800 ha alanda 58.000 ton üretim, Adana ilinde ise, yaklaşık 600 ha alanda 11.000 ton üretim gerçekleştirilmektedir. Yaygın olarak bölgede yetiştiriciliği yapılan çeşitler örtü altında Faselis F_1, Avan F_1 ve Karatay, açıkta ise Adana Topağı ve Pala çeşitleridir.

Patlıcan yetiştiriciliğini sınırlayan en önemli fungal hastalıklar arasında Solgunluk hastalığı, Sclerotinia çürüklüğü ve ileri dönemde Külleme gelmektedir. Patlıcanda solgunluk hastalığına *Fusarium oxysporum* Schlecht. f. sp. *melongenae* Matuo and Ishigami ve *Verticillium dahliae* Kleb. fungusları neden olmaktadır (Booth 1971; Nelson ve ark., 1983; Melouk, 1992; Windels, 1992; Haris ve ark., 1993; Summerel ve ark., 2001; Pegg ve Brady, 2002). Her iki etmen tarafından neden olunan solgunluk hastalığı simptomları oldukça benzer olup, etmenler bazen aynı alanda ve hatta aynı bitkide birlikte bulunabilmektedir (Snyder ve Smith, 1981). Fusarium ve Verticillium solgunluk hastalıklarının her ikisi de ilk olarak bitkide genel bir solgunluk sergilemekte ve şiddetli infeksiyonlar hastalığın ilerleyen dönemlerinde bitkiyi öldürebilmektedir. Bu iki patojen için iletim demeti simptomları daha karakteristiktir. İnfekteli bitki dallarından enine kesit alındığında

ksilemde gözlenen kahverengileşme, Fusarium solgunluğunda floem dokusuna kadar ulaşabilirken, Verticillium solgunluğunda ise ksilem dokusuyla sınırlı kalmaktadır. Ayrıca, *Fusarium oxysporum* f. sp. *melongenae*'nın neden olduğu şiddetli infeksiyonlar bitkinin sürgün uçlarının veya bazı dallarının tamamen kurumasına neden olabilmektedir (Snyder ve Smith, 1981; Hillocks, 1992). Bu durumdaki bitkilerin vejetatif aksamı, bir tarafı solmuş, kurumuş, bir tarafı sağlıklı bir görünüm sergilemektedir. Bitkide lokal dal kurumalarından dolayı bölge üreticisi Fusarium solgunluk hastalığını "yarım dal" olarak isimlendirmiştir. Bu şekilde lokal dal kurumaları Verticillium solgunluğunda görülmemektedir. Fusarium Solgunluğu dünyada ilk kez Matuo and Ishigami (1958) tarafından rapor edilmiştir (Snyder ve Smith, 1981; Nelson ve ark., 1983; Alexopoulos ve ark., 1996).

Snyder ve Hansen tarafından 1940 yılında yapılan taksonomik gruplandırmalarda *Fusarium* türleri, eşeyli üreme dönemleri bilinmeyen fungusların yer aldığı Deuteromycotina alt bölümüne ait Deuteromycetes sınıfına dahil edilmekteydi (Nelson ve ark., 1983). Ancak daha sonra, *Fusarium* cinsine bağlı birçok türünün eşeyli üreme dönemlerinin bulunmasıyla birlikte bu funguslar, Ascomycota şubesine bağlı Pyrenomycetes altsınıfı Hypocreales takımına dahil edilmişlerdir (Booth, 1971; Nelson ve ark., 1983; Alexopoulos ve ark., 1996; Agrios, 1997; Summerel ve ark, 2001).

Fusarium türleri, dünyada Antartika kıtası hariç tundra, çöl, tropik ve subtropik iklime adapte olabilen çok geniş bir dağılıma sahiptirler (Stoner, 1981). *Fusarium* türleri birçok kültür bitkisinde patojenik olabildiği gibi fillosfer ve rizosferde de saprofitik yaşam sürdürebilmektedirler. Toprakta saprofit olarak çok fazla sayıda *Fusarium* türünün yaşadığı bildirilmiştir (Gordon ve Martyn, 1997).

Fusarium oxysporum'lar toprakta bulunan lignin ve karbonhidratı parçalayarak saprofit olarak yaşama yeteneğine sahip olan yaygın toprak habitantlarıdır (Kistler, 2001). Bunlar bitki köklerine kolonize olarak endofitik bir yaşam sürmektedirler. Bu şekilde bir yaşamın bitkiyi hastalıklara karşı koruduğu da düşünülmektedir. Bunların büyük bir çoğunluğu faydalı bitki endofiti veya toprak saprofiti olmasına karşın, birçok türü de bitkilere patojenik özellikte olabilmektedir. *F. oxysporum*'ların patojenik türleri 100 yıldan fazla zamandır çalışılmaktadır. Bu

fungusların çok geniş konukçu spektrumuna sahip olduğu (hayvanlar, böcekler, insanlar ve bitkiler), ancak bitkilerde hastalığa sebep olan türlerinin, genellikle dar bir konukçu dizisini hastalandırabildiği belirtilmiş ve bu gözlemlerin sonucunda, *F. oxysporum*'ların konukçuya özelleştiği ("special form" veya "formae speciales") bildirilmiştir. Bitki paraziti fungusların özel konukçularında hastalık oluşturma yeteneği, morfolojik bir bakış açısından çok fizyolojik bir bakış açısı olarak karakterize edilmektedir (Booth, 1971; Nelson ve ark., 1994; Kistler, 2001).

Patojenik olan türler bitkide, kök, gövde ve meyve çürüklüklerine veya vasküler solgunluğa neden olmakta ve şiddetli infeksiyonlar önemli verim kayıpları ile sonuçlanmaktadır. Bunlar, direkt zararlarının yanı sıra ürettikleri sekonder metabolitlerle de insan, hayvan ve bitkilere toksik etkide bulunabilmektedirler. Primer metabolizma faaliyetleri ortaya çıkan ürünlerin karşılıklı etkileşimleri sonucu oluşan sekonder metabolitler, genellikle organizma için gerekli olmayan metabolik ürünler olarak tanımlanır. Bunlar pigmentler, antibiyotikler, toksinler, uçucu bileşikler, enzim içeren ekstrasellüler proteinler gibi birçok grubu içermektedir. Özellikle antibiyotik ve mikotoksinlerin mikroorganizmalar lehinde rekabet avantajı sağladığı ve giberellin gibi bazı metabolitlerin bitkide faydalı büyüme düzenleyiciler olarak rol aldığı bildirilmiştir (Isaac, 1992; Hawksworth ve ark., 1995; Thrane, 2001). *F. oxysporum*'ların ise, fusarik asit, moniliformin, naphtharazin, sambotoksin ve çok az fumonisin ürettikleri bildirilmiştir (Desjardins ve Proctor, 2001).

Fusarium türlerinin tanısı mikroskobik ve moleküler yöntemler kullanılarak yapılabilmektedir. Mikroskobik yöntemlerle tanılamada, fungus tek bir konididen veya hif ucundan saf olarak çoğaltılmakta ve spesifik besi ortamlarında kültüre alınmaktadır. *Fusarium* türleri pH'ı 6.5-7'ye ayarlanmış kültür ortamında, optimum 22-25 °C'de 7-10 gün sürede inkübasyon peryodunu tamamlayabilmektedir. Gelişen kolonilerin sporulasyonu UV ışığı veya normal fluoresan lamba ile teşvik edilebilmektedir. Kültür ortamında gelişen *Fusarium* türlerinin tanısı, koloni rengi, sporodochium yapıları, makro ve mikrokonidi şekli, boyutları ve bölmeleri, makrokonidilerde bazal hücrenin yapısı, klamidospor şekli ve yoğunluğu, fialid özellikleri gibi morfolojik karakterizasyonuna göre yapılmaktadır (Booth, 1971; Nelson ve ark., 1983; Windels, 1992; Summerel ve ark., 2001).

Günümüzde ELISA ve PCR gibi birçok serolojik ve moleküler teknik, pratik ve güvenilir yöntemler olarak tanıda tercih edilmektedir. Bu teknikler arasında en çok kullanılan, PCR yöntemidir (Sambrook ve ark., 1989; Darling ve Brickell, 1994; Summerel ve ark., 2001; Öğüş, 2002). PCR, *in vitro*'da spesifik bir DNA parçasının kopyalarının, kısa zincirli oligonükleotid primerlerle enzimatik olarak sentezlenmesi olarak tanımlanmaktadır (Arda, 1995; Arı, 1999; Kayrın ve ark., 2003).

Bir fungus türünün veya ırkının birbirine olan genetik yakınlığı Vejetatif uyum grubu (Vegetative Compatibility Group; VCG), Randomly Amplified Polymorfic DNA (RAPD), Restriction Fragment Lenght Polymorphism (RFLP), Amplified Fragment Lenght Polymorphism (AFLP), izo-enzim analizleri, DNA Fingerprinting (DAF) gibi moleküler tekniklerle araştırılabilmektedir (Sambrook ve ark., 1989; Arda, 1995; Katan, 1997; Nelson ve ark., 1997). 1990 yılında, PCR'a dayalı RAPD markerlarının geliştirilmesiyle moleküler çalışmalarda önemli ilerlemeler kaydedilmiştir (Williams ve ark., 1990). Ayrıca fungusların ürettikleri sekonder metabolitleri tanımlamada; İnce Tabaka Kromatografi (Thin Layer Chromatography; TLC), Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografi (High Pressure Liquid Chromatography; HPLC), Gaz Kromotografi Kütle Spektroskopi (Gas Chromotography Mass Spectroscopy; GSMS) ve ELISA yöntemleri kullanılmaktadır (Nicholson, 2001; Thrane, 2001).

Farklı populasyonlardan izole edilen *Fusarium* türlerinin moleküler karakterizasyonunda hızlı ve güvenilir bir yöntem olarak RAPD-PCR yöntemi, birçok araştırıcı tarafından rapor edilmiştir (Assigbetse ve ark., 1994; Kelly ve ark., 1994; Woo ve ark., 1996; Achenbach ve ark., 1996; Chiocchetti ve ark., 1999). RAPD-PCR tekniğinin avantajları arasında türler arasındaki polimorfizmi belirlemede, tesadüfi 10 bazlık oligonükleotid primerler kullanılarak çok sayıda fragmentin hızlı bir şekilde amplifiye edilebilmesi ve tanımlanacak türe yönelik herhangi bir genetik bilgi gerektirmemesi sayılabilir. Ancak bu yöntemde amplifikasyon ürünlerinin tanımlanmasındaki bilgi yetersizliği en büyük dezavantajı oluşturmaktadır. Her bir lokusta amplifikasyonun varlığı veya yokluğu, bantlar skor edilerek tanımlanmakta ve populasyon genetik analiz programı ile değerlendirilerek, oluşturulan soyağacında (dendrogramda) türlerin genetik yakınlıkları

belirlenebilmektedir (Nei, 1978; Yeh ve ark., 1999; Açık, 2002). Amplifiye olan bantlar, türlerin genetik yakınlıklarını gösteren bir dendrogram oluşturulduğu zaman anlam kazanmaktadır. Diğer yandan RAPD tekniği kadar dezavantaj içermeyen, RFLP kadar güvenilir olan PCR'a dayalı AFLP tekniğinin geliştirilmesi bu alanda yapılan çalışmalara büyük ivme kazandırmıştır (Vos ve ark., 1995).

Fitopatoloji'de toprak kökenli bitki hastalıkları içerisinde *Fusarium* türleri oldukça önemli bir yer tutmaktadır. Diğer toprak kökenli hastalık etmenlerinde olduğu gibi Fusarium solgunluğuna karşı da etkili bir mücadele yöntemi bulunmamaktadır. Toprak kökenli fungal hastalıkların mücadelesinde toprak fumigasyonu ve ekim nöbeti önerilmektedir. Ancak, toprak fumigasyonunun ekonomik olmaması ve topraktaki yararlı mikroflorayı da olumsuz etkilemesi nedeniyle kullanımı sınırlıdır. Montreal protokolü gereği MeBr kullanımının 2015 yılında tamamen yasaklanacağı, ülkemizde ise 2000 yılında Dünya Bankası destekli başlatılan MeBr'e Alternatif Gelişme Projesi ile 2008 yılına kadar kaldırılacağı bildirilmiştir (Yücel ve ark., 2001). Son dönemde yapılan araştırmalarda, geleneksel bitki ıslah yöntemlerinin yerini, hastalıklara toleranslı ve kaliteli meyve üretimi esasına dayalı genetik çalışmaların aldığı görülmektedir. Swarup (1995), patlıcan ıslahında en önemli hedeflerden birinin Fusarium solgunluğu, Verticillium solgunluğu ve bakteriyel solgunluk (*Pseudomonas solanacearum*) gibi hastalıklara dayanıklılık olduğunu bildirmiştir.

Günümüzde kimyasal mücadeleye alternatif olabilecek kontrol yöntemleri üzerinde çalışmalar yoğunlaşmıştır. Özellikle bitkilerde hastalıklara karşı dayanıklılığın uyarılması (Induced Resistance) konusunda çok sayıda araştırma yapılmıştır. Uyarılmış dayanıklılıkta amaç, bitkilerin savunma mekanizmalarını önceden aktive ederek patojen saldırısına karşı hazır hale getirmektir. Uyarılmış dayanıklılıkta etmen bitkinin nekroz bölgesinin etrafında lokalize olmuşsa lokal kazandırılmış dayanıklılık (LAR; Localized Acquired Resistance), dayanıklılık sistemik olarak bitkinin uygulama görmemiş kısımlarına yayılırsa sistemik kazandırılmış dayanıklılık (SAR; Systemic Acquired Resistance) olarak adlandırılır (Ramussen ve ark., 1991; Hammerschmidt ve Smith-Becker, 1999). Dayanıklılığın uyarılmasına (IR) yönelik olarak günümüze kadar olan çalışmalarda, patojen

olmayan fungus, bakteri inokulasyonu, fungus veya mayaların hücre duvarından ekstrakte edilen oligosakkaritler gibi biyotik uyarıcılar, acibenzolar-S-methyl (ASM), UV, herbisitler, β amino butyric asit (BABA) ve Salisilik Asit (SA) gibi abiyotik uyarıcılar kullanılmıştır. Özellikle bitkilerde gelişmeyi düzenleyici rhizobakterilerin (PGPR) tohum veya toprağa uygulamasıyla bitkilerde SAR mekanizmasının aktive edildiği ve patojen infeksiyonlarına karşı önemli oranda koruma sağlandığı bildirilmiştir (Tüzün ve ark., 1986; Weller, 1988; Tüzün ve Kloepper, 1995; van Loan ve ark., 1998; Hammerschmidt ve Smith-Becker, 1999; Tüzün ve Bent, 1999). Ayrıca patojenik olmayan mikroorganizmaların da bitkilerde dayanıklılığı uyardığı ve özellikle vasküler solgunluk patojenlerinin kontrolünde patojen olmayan *Fusarium* türlerinin SAR mekanizmasını uyarmada oldukça başarılı olduğu birçok araştırıcı tarafından bildirilmiştir (Gordon ve ark., 1989; Tüzün ve Kloepper, 1995; Fuchs ve ark., 1997). Biyotik bir elisitör olan mikorizal fungus *Glomus mosseae* ile domates bitkilerinin inokulasyonu sonucunda, domateste Fusarium solgunluk hastalığının gelişiminin önemli oranda sınırlandırıldığı belirtilmiştir (Ozeretskovskaya, 1995).

Bitkiler milyonlarca yıldır, çevrelerinde bulunan mikroorganizmalarla birlikte yaşayarak hayatlarını devam ettirmişlerdir. Bitkilerin birçoğu mikrobiyal saldırılara karşı doğal bir dayanıklılığa sahiptir. Hayvanlardaki bağışıklık sisteminden yapı ve işleyiş bakımından farklı olsalar da, bitkiler hastalık etmeni mikroorganizmalara karşı dayanıklılıkta rol oynayan çeşitli mekanizmalara sahiptir. Bitki hastalıklarıyla etkili bir şekilde mücadele edebilmek için hastalıklara dayanıklılığın mekanizmasının iyi bilinmesi gerekmektedir. Patojen mikroorganizmanın konukçusu olmama (non-host) durumu dayanıklılığın esasını oluşturmaktadır. Günümüzde dayanıklılığın uyarılmasına yönelik çalışmalarda patojen olmayan türler kullanılmakta ve başarılı sonuçlar elde edilmektedir. Ancak, konukçuya özelleşmenin (race-specific) genetiği günümüzde henüz tam olarak açıklanamayan konular arasındadır.

Flor tarafından 1942 yılında keten pası'na karşı başlatılan genetik çalışmalar, "gen için gen" hipotezinin gelişimine önderlik etmiş ve yapılan çalışmalar sonucunda konukçuda bulunan dayanıklılık genlerinin (*R*) komplementeri olarak patojende avirulens (*avr*) genlerinin bulunduğu açıklanmıştır. Bu hipoteze göre *avr* genlerine

karşılık gelen *R* genleri arasında direkt veya indirekt bir tanışma söz konusudur. Bitkinin patojeni tanıması, özel bir bitki molekülünün patojen elisitörleri ile reaksiyona girmesi sonucu ortaya çıkmaktadır. Patojen bitki tarafından tanınmadığında konukçu olmama, (non-host) şeklindeki bir dayanıklılık söz konusu olmaktadır. Bitki ve patojenlerin tanınmasında rol alan yapı veya moleküllerin oligosakkarit, polisakkarit, protein ve glikoproteinlerin değişik formları olduğu düşünülmektedir. Mikroorganizmaların konukçu spesifiteleri genellikle sınırlı olup, çoğu zaman tek bir konukçu bitki türüne özelleşmiştir. Çok azı bitkileri infekte ederek kolonize olabilme yeteneğindedir (Dickinson ve Lucas, 1982; Buell, 1999).

İnfekteli bitkilerde gerçekleşen biyokimyasal değişiklerin en önemlilerinden biri fenilalanin'den sinnamik asit, benzoik asit (BTH) ve en son salisilik asit (SA) fenolik bileşiklerinin biyosentezidir (Nicholson ve Hammerschmidt, 1992). Fenolik bir bileşik olan ve bitkide doğal olarak bulunan SA, bitki savunma mekanizmasında SAR mekanizmasını uyarmada önemli bir sinyal molekülü olarak görev yapmaktadır. (Ramussen ve ark., 1991; Raskin, 1992; Klessig ve Malamy, 1994; Hammerschmidt ve Smith-Becker, 1999). Günümüzde bitki savunma aktivatörü olarak adlandırılan bazı sentetik bileşiklerin ticari preparatları hazırlanmış ve pratikte kullanıma sunulmuştur. Örneğin ticari bir preparat olan Actigard 50WG'nin (acibenzolar-S-methyl; ASM), (Benzo (1,2,3) thiabendazole-7-carbothioic asit 5-methyl ester; Novartis Crop Protection, Inc., Basel Switzerland) birçok hastalık etmenine karşı sistemik dayanıklılığı teşvik eden gen aktivasyonunda rol oynadığı bildirilmiştir (Kessmann ve ark., 1994; Görlach ve ark., 1996; Tally ve ark., 1999; Louws ve ark., 2001). Yapı olarak SA'ya benzemeyen bu sentetik bileşiğin, bitki savunma mekanizmasında SA gibi görev yaptığı bildirilmiştir (Friedrich ve ark., 1996; Görlach ve ark., 1996; Lawton ve ark., 1996). Daha sonra bu preparatın % 50 metalaxy içeren formu "Bion" ismi ile piyasaya sunulmuştur.

Konukçu-patojen interaksiyonu sonucunda yapısal ve biyokimyasal oldukça kompleks mekanizmalar aktive olmaktadır. Bitkilerde dayanıklılığın doğasını anlamaya yönelik ilk histolojik araştırmalar, normal ışık mikroskobu kullanılarak hıyarda *Colletotrichum lagenarium*'a karşı yapılmıştır (Richmond ve ark., 1979). Günümüzde ise bitkilerdeki immunusitokimyasal reaksiyonlar, faz kontrast

mikroskobu veya elektron mikroskobu yardımıyla daha kolay incelenebilmektedir. Bitkiler patojenlere karşı kendilerini hem pasif hem de aktif olarak savunmaktadırlar. Bitkilerde gözlenen bu dayanıklılık, önceden var olan dayanıklılık (pasif) ve infeksiyonun teşvik ettiği dayanıklılık (aktif) olarak iki gruba ayrılmaktadır (Dickinson ve Lucas, 1982).

İnfeksiyon öncesi bulunan yapısal (pasif) dayanıklılıkta, bitkinin morfolojik ve kimyasal özellikleri önemli rol oynamaktadır. Fiziksel bariyerler olarak yapısal karakterler, patojenin girişine engel olmaktadır. Patojen ve konukçu bitki arasındaki ilk ilişki, çoğu zaman kutikula tabakasında sınırlanmaktadır. Epidermal hücre duvarlarını örten bu mumsu tabaka, belirli patojenlere karşı bitkinin dayanıklılığında önemli bir faktördür.

Bitki hücre duvarı, hücrenin şeklini koruyarak patojen saldırısına karşı mekanik bir engel olarak görev yapmaktadır. Örneğin epidermal hücrelerin kalınlık ve sertliği, doğal açıklıklar olan stoma, hydatod ve lentisellerin yapısı patojenlere karşı dayanıklılıkta önemlidir. Stomaları uzun ve kapalı buğday çeşitlerinin, stomalardan giriş yapan karapas üretiosporlarına karşı girişi engellediği bilinmektedir.

Bir çok konukçuda yapısal bir dayanıklılık olmasa da, patojenlere karşı farklı bir mekanizma dayanıklılığı sağlamaktadır. İnfeksiyonun gelişebilmesi için bütün koşullar uygun olmasına rağmen yavaşlaması hatta durması, patojene karşı bitkide biyokimyasal bir dayanıklılık olduğunu göstermektedir. İnfeksiyondan önce bitki hücrelerinde bulunan toksik bileşikler, enzim inaktivatörleri, bazı besin elementleri, pH gibi birçok faktör, inhibitör olarak dayanıklıkta rol oynamaktadır (Dickinson ve Lucas, 1982). Bazı bitkilerin yapraklarındaki fungitoksik eksudatlar fungusların spor çimlenmesini inhibe edecek konsantrasyonda bulunabilmektedir. Pasif savunmadaki kimyasal faktörler arasında fenoller, saponinler, alkoloidler, glukosinolatlar ve doymamış laktonlar sıralanabilir. Kırmızı soğan kabuğunda fenolik bir bileşik olan catechol, domateste tomatin, yulafta avenacin, lale soğanında tulipozid örnek verilebilir (Isaac, 1992; Bennett ve Wallsgrove, 1994).

Dayanıklılık uyarıcılara bitkilerin gösterdikleri reaksiyonlar, uyumlu reaksiyon (duyarlılık), uyumsuz reaksiyon (dayanıklılık) ve kısmi uyumsuz

reaksiyon (orta derecede duyarlılık) olarak adlandırılmaktadır (Dickinson ve Lucas, 1982). Dayanıklılığın oluşmasında ilk aşama, patojenin hissedilmesi ve konukçu bitki ve patojen arasında bazı sinyalizasyon olaylarının başlamasıdır. İnfeksiyonun teşvik ettiği (active veya induced) dayanıklılıkta infeksiyona karşıt bir reaksiyon olarak histolojik korunma yapıları aktive olmaktadır. Patojenin salgıladığı bazı maddelerin hücreleri uyarması sonucunda infeksiyon noktasının hemen önünde birkaç kat mantar tabakası (Kalloz) oluşmaktadır. Bu tabaka sağlıklı dokulardan infekteli dokulara su ve gıda maddelerinin taşınmasını engelleyerek patojenin gelişimini engellemektedir. Ayrıca, patojenin salgıladığı toksik maddelerin sağlıklı dokulara geçişini de önlemektedir. *Venturia inaequalis* enfeksiyonu bu şekilde bir savunmaya karakteristik bir örnektir (Hahlbrock ve Scheel, 1987). Ayrıca sert çekirdekli meyve ağaçlarında infeksiyon noktasını saran iki sıra hücreden oluşan absisyon tabakası oluşumları da, histolojik korunma yapıları arasında yer almaktadır. Lignituber oluşumları da hücresel bir korunma reaksiyonuna örnek verilebilir; bu olay, patojenin penetrasyonu sırasında hücre duvarını geçmekte olan hifi, hücre duvarının uzayarak sarması şeklinde olmaktadır. Bunlara ilaveten, birçok bitki zamk üreterek infeksiyon noktası etrafındaki hücreler arası boşlukları doldurup penetre edilemeyen bir bariyer oluşturmakta ve patojeni hapsetmektedir. (Dickinson ve Lucas, 1982; Isaac, 1992).

Patojen savunma yapılarını penetre ettikten kısa bir süre sonra bitki hücre stoplazmasında, stoplazmik savunma reaksiyonu başlamaktadır. Stoplazma granüler hale geçerek yoğunlaşmakta ve patojenin miselyumunu parçalayarak infeksiyonu durdurmaktadır. Bu tip hücreler, fungal hifin büyümesini engelleyerek fungal saldırıyı durdurmaktadır. Bazı bitki çeşitleri iletim demetlerinde tylosisler oluşarak, patojenin köklerden yukarı doğru ilerlemesini durdurmaktadır. Tylosisler, parankimatik hücrelerin yakınındaki kloroplastların aşırı büyüyerek ksilem borusunun öne doğru çıkıntı yapması sonucu oluşmaktadır. Bunlar çoğunlukla vasküler patojenlerin etkisi sonucunda oluşan engellerdir (Dickinson ve Lucas, 1982).

İnfeksiyonun teşvik ettiği dayanıklılıkta, biyokimyasal savunma reaksiyonları oluşarak savunma mekanizması harekete geçirilmektedir. Bunlar; lokalize hücre

ölümü (HR; Hypersensitive Reaction), lignifikasyon ve papilla oluşumu, patogeneze bağlı proteinlerin (PR) sentezi ve fitoaleksin sentez ve birikimi olarak sıralanabilir. Patojene karşı bir duyarlılık tepkimesi olan nekrotik korunma reaksiyonu (HR, Hypersensitive Reaction), birçok araştırıcı tarafından yıllar önce konukçu bitki hücrelerinde gözlenmiş ve patojen infeksiyonu sonucu patojenin girdiği noktadan itibaren konukçu bitki hücrelerinin hızla ölerek nekrotik bir durum alması olarak ifade edilmiştir (Dickinson ve Lucas, 1982; Hahlbrock ve Scheel, 1987; Isaac, 1992). Bu olay konukçu bitkinin patojeni tanımasının ardından patojen ve konukçu bitki arasında uyumsuz bir ilişki (Dayanıklılık)'nin sonucunda oluşmaktadır. Hücre membranlarının geri dönüşümsüz zararlanmasının sonucu olarak, hücrelerin ölerek kahverengileştiği ve bu nekrotik dokulardan patojenin izole edilebildiği, ancak nekrotize dokulardan sağlıklı dokulara patojenin yayılmadığı bildirilmiştir (Hahlbrock ve Scheel, 1987; Mansfield, 1990). Bu hızlı hücre ölümleri patojenin infeksiyon noktasında durdurulmasında çok etkili olduğu için patojen saldırısından sonra hücre ölümü ne kadar hızlı olursa bitki o kadar çok infeksiyona dayanıklı olmaktadır (Dixon, 1986; Dixon ve Harison, 1990; Deverall ve Dann, 1995).

Konukçu bitkilerde bulunan dayanıklılık mekanizmasını harekete geçiren uyarıcılara elisitör adı verilmektedir. Abiyotik ve biyotik uyarıcılarla patojen ve konukçu bitkideki reseptör etkileşimi aktif hale geçirilmekte ve bunun sonucunda, konukçuda bulunan ve dayanıklılığı yöneten dayanıklılık genleri harekete geçmektedir (Hahlbrock ve Scheel, 1987; Isaac, 1992; Ebel ve Cosio 1994). SA en başta olmak üzere, isonicotinik asit (INA), hidrojen peroksit, jasmonoik asit (JA), β-amino butric acid (BABA) ve indol asetik asit (IAA) gibi dış kaynaklı birçok elisitör, bitki dayanıklılığında SAR'ı teşvik eden sinyal bileşikler olarak rol oynamaktadırlar (Niki ve ark., 1998; Staswick ve Lehman, 1999). Birçok konukçu-patojen interaksiyonunda patojen saldırısına karşı konukçu hücre duvarlarında dayanıklılığı güçlendirici savunmaya bağlı bileşikler üretilir ve depolanır. Bitkilerin avirülent fungal patojenler veya elisitörler ile uygulanmaları sonucu reaksiyon noktalarında kalloz, lignin ve suberin içeren fenolik bileşikler fenolik ve lignin benzeri materyaller, aminoasit hidroksi prolince zengin glikoproteinler (HRGP) ve kalsiyum gibi mineral elementlerin biriktiği birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (Vance

ve ark, 1980; Hornby ve Fitt, 1981; Aist, 1983; Stoltzenburg ve ark., 1984a; Biggs ve Miles, 1988; Nicholson ve Hammerschmidt, 1992). Elisitörler reseptörleri uyardığında, hücreler arası alan hızla alkalize olmakta ve hücre içinde bulunan K^+ ve Cl^- iyonları hücre içinden dışarıya sızmakta, bunların yerine Ca^{+2} ve H^+ iyonları hücre içine girmektedir. Hücre stoplazmasında Ca^{+2} iyonları oldukça düşük konsantrasyonda bulunurken, hücrelerin biyotik ve abiyotik faktörler tarafından uyarılması sonucu hücrede Ca^{+2} iyonlarında artış olmaktadır. İyon değişiminin ardından, sekonder reseptörler hücre içindeki iyonları genlerin bulunduğu bölgeye kanalize ederek dayanıklılıktan sorumlu genlerin uyarılmasını sağlamaktadır. Sekonder reseptörlerin uyarılmasına neden olan Ca^{+2} konsantrasyonundaki artışın, hücre içindeki biyokimyasal reaksiyonları tetikleyerek, savunma ile ilişkili genlerin aktivasyonu, hücre duvarında lokalize olan kalloz enzimini harekete geçirerek kalloz oluşumlarının teşvik edilmesi ve antimikrobiyal fitoaleksinlerin sentezlenmesi gibi biyokimyasal olaylarda rol aldığı bildirilmiştir (Ebel ve Cosio, 1994; Dietrich ve ark., 1994).

İmmunositokimyasal çalışmalar sonucunda, kallozun (β-1.3 glukan) bitki hücre duvarlarının iç yüzeylerinde patojenlere karşı duvar benzeri bir yapı olarak bilinen papillaların içerisinde oluştuğu belirlenmiştir. Arpada, külleme hastalığına karşı bir reaksiyon olarak hücre duvarında biriktikleri bildirilmiştir (Stoltzenburg ve ark., 1984b). Kalloz, patojenin yayılışını geciktirerek, bitki hücresinin kendisini toparlamasına yardımcı olup dayanıklılık mekanizmasının harekete geçmesine zaman tanımaktadır (Hornby ve Fitt, 1981). Lignifikasyon ve suberinasyon, biotrofik ve nekrotrofik türlerin her ikisiyle de teşvik edilebilmektedir. Lignifikasyon ve fenolikler, fungal penetrasyonlar ve fungus tarafından üretilen hücre duvarını yıkan enzimlere karşı bitki hücre duvarını güçlendirmekte ve sonraki infeksiyonlara karşı dayanıklılık kazandırmaktadır. Lignifikasyon, patojenden konukçu hücreye toksin ve enzimlerin geçini engellemekte, ayrıca fungal hifin elastikiyetini bozarak yapısını sertleştirmekte ve bitki içerisinde yayılmasını engellemektedir (Isaac, 1992).

Çoğu konukçu-patojen interaksiyonlarında kısa sürede gerçekleşen olaylardan biri de, saldırıya uğramış konukçu bitki hücrelerinde hızlı ve geçici olarak aktive edilen ve HR'da rol oynayan aktif oksijen türlerinin (AOS, Active Oxygen Species)

üretimidir. Konukçu-patojen interaksiyonunda Superoxide anion O_2, hydroxyl radical OH ve hidrojen peroksit (H_2O_2) yaygın olarak gözlenmiştir (Kauss ve ark., 1993; Goodmann ve Novacky, 1994; Shirasu ve ark., 1997). Aktif oksijen türlerinden H_2O_2'nin, bitkide PR proteinlerinin sentezine ve fitoaleksin üretimine neden olarak SAR mekanizmasını tetiklediği bildirilmiştir. SAR mekanizmasının anahtar bir bileşiği olan SA, hücrede katalaz enzimini inhibe ederek ortamda H_2O_2 oluşumunu arttırmaktadır (Raskin, 1992; Chen ve ark., 1993; Low ve Merida, 1996).

PR proteinleri, patojene toksik olan bitki proteinleri olarak tanımlanmaktadır. Bunlar, sağlıklı bir bitkide normal koşullarda çok düşük konsantrasyonlarda bulunurken, patojen saldırısı veya herhangi bir stres faktörü sonucunda PR protenlerini kodlayan genler harekete geçerek büyük konsantrasyonlara ulaşmaktadır (Tüzün ve ark., 1989; Stermer, 1995). En çok bilinen hidrolitik enzimler β-1.3 glukanaz (PR2) ve kitinaz (PR3)'dır. PR proteinleri (PR4 proteinleri, thoumatin ve osmotin benzeri proteinler, proteinazlar ve peroksidazlar) bitkide farklı yerlerde sentezlenmekte ve farklı mekanizmalarda görev almaktadır (Benhamou, 1992; Lawrence ve ark., 1996; Tüzün ve ark., 1997). Bunların bir kısmı spor çimlenmesini inhibe edici özellik gösterirken, diğerleri hücre duvarının güçlenmesinde rol alabilmektedir (Niki ve ark., 1998). PR proteinlerinin sentezinden sorumlu en önemli bileşikler olarak SA ve JA verilebilir (Raskin, 1992; Hammerschmidt ve Kuc, 1995).

Fitoaleksinler bitkilerde patojen infeksiyonu veya kimyasal ve mekanik zararlanmalardan hemen sonra üretilen düşük molekül ağırlıklı patojene toksik özellik gösteren sekonder bileşiklerdir (Ebel, 1986). Fitoaleksinler uyumsuz reaksiyonlarda, HR gösteren hücrelerin yakınındaki sağlıklı hücrelerde patojen infeksiyonuna bir tepki olarak üretilmektedir (Dixon ve Harison, 1990; Isaac, 1992). Farklı familyalara ait bitkilerin ürettikleri fitolaleksinlerin kimyasal yapıları birbirine oldukça benzerlikler göstermektedir. Günümüzde en çok araştırılan fitoaleksinler fasülyede phaseolin, bezelyede pisitin, soya ve yoncada glyseolin, patateste risitin, pamukta gossypol ve biberde kapsidol'dur (Ingham, 1981; Isaac, 1992). Ancak, fitoaleksin elisitörlerinin mekanizması, dayanıklılık ve duyarlılık genlerini aktive etmedeki rolleri günümüz araştırma konuları arasındadır.

Toprak kökenli hastalık etmeni *F. oxysporum* f. sp. *melongenae* ile mücadele etmek zordur. Ülkemizde yoğun sebze yetiştiriciliğinin yapıldığı Doğu Akdeniz Bölgesi'nde solgunluk hastalığına neden olan patojenlerin belirlenmesi, morfolojik ve moleküler tanılarının yapılması (Moleküler Karakterizasyon) ve izolatların ırk düzeyinde yakınlık veya uzaklıklarının saptanması, alınacak olan önlemlerin ve alternatif mücadele yöntemlerinin belirlenmesi açısından oldukça önemlidir.

Bu çalışmada, Adana ve Mersin illeri ve çevresinde patlıcan yetiştiriciliğinin yapıldığı açık alan, sera ve yüksek tünellerde, solgunluk hastalığına neden olan fungal hastalık etmeni (*Fusarium oxysporum* f. sp. *melongenae*)'nin % hastalık oranı ve şiddeti ortaya konulmuştur.

Patlıcanda Fusarium solgunluğuna karşı dayanıklılığın uyarılmasına yönelik, uyarıcı abiyotik bir faktör olarak sentetik bir uyarıcı olan Acibenzolar-S-methyl (ASM) ve biyotik bir faktör olarak patojen olmayan Fusarium inokulasyonunun (FOM)'nun Fusarium solgunluk hastalığının gelişimine etkisi araştırılmıştır.

Ayrıca bu çalışmada, genetik karakterizasyonu henüz yapılmamış bu etmenin, bölge izolatları arasındaki genetik yakınlık, RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) yöntemi ile belirlenmiştir.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Patlıcanda Fusarium Solgunluk Hastalığı Etmeni ve Yaygınlığı ile İlgili Çalışmalar

Patlıcanda Fusarium solgunluk hastalığına yönelik dünyada, birçok araştırma bulunmaktadır. Bu konuda yapılan bazı araştırmalar aşağıda özetlenmiştir.

Hollanda'nın Westland bölgesinde patlıcan yetiştiriciliği yapılan cam seralarda gözlenen solgunluğa, çoğunlukla *Verticillium* sp.'nin neden olduğu ancak bazı bitkilerin ksileminden *Fusarium* sp.'nin de izole edildiği bildirilmiştir (Steekelenburg, 1976).

Patlıcanda Fusarium solgunluğunun İtalya, İsrail, Japonya ve Hollanda gibi birçok ülkede var olduğu ve önemli kayıplara neden olduğu rapor edilmiştir. Farklı patlıcan çeşitlerinin Fusarium ve Verticillium solgunluklarına reaksiyonlarının denendiği bir çalışmada, Verticillium solgunluğuna dayanıklı çeşit olmadığı belirtilirken, bazı patlıcan çeşitlerinin Fusarium solgunluğuna toleranslı olduğu belirtilmiştir (Goth ve Webb, 1981).

Fusarium solgunluk hastalığının genellikle ortalama günlük sıcaklığın 23 ºC'nin üzerinde, Verticillium solgunluk hastalığının ise 23 ºC'nin altında daha yaygın olarak görüldüğü bildirilmiştir (Hillocks, 1992).

İtalya'da patlıcan solgunluğu üzerinde yapılan çalışmada, hastalıklı bitkilerden çoğunlukla *Fusarium oxysporum* f. sp. *melongenae* izole edilmiştir. Sera koşullarında, 28 farklı patlıcan çeşidi ve bazı sebze türlerinden yapılan patojenite denemelerinde bütün patlıcan çeşitleri duyarlı bulunurken, diğer sebze türleri tamamen dayanıklı bulunmuştur (Capelli ve ark., 1993).

İtalya'da yapılan benzer bir araştırmada, cam sera ve açık alan patlıcan yetiştiriciliğinde, solgunluk hastalığına neden olan etmenin *Fusarium oxysporum* f. sp. *melongenae* olduğu saptanmıştır. Yetiştiricilikte tercih edilen en önemli ticari çeşitlerin Fusarium solgunluğuna duyarlı olduğu ve bu hastalığın kontrolünde en etkili yolun dayanıklı çeşit kullanımı olduğu belirtilmiştir (Capelli ve ark., 1995).

Mochizuki ve ark. (1997), *Fusarium oxysporum* f. sp. *melongenae*'nın toprak kökenli patlıcan hastalıkları içerisinde en önemli patojen olduğunu bildirmişler ve ıslah denemeleri sonucunda, dayanıklılığın tek dominant genle yönetildiğini belirtmişlerdir. Bu araştırıcılar, Fusarium solgunluğuna dayanıklı LS174 hattını elde etmiş ve bu hattın japon meyve tipinde ve pazar talebine uygun olduğunu belirtmişlerdir.

Katan ve Di Primo (1999), 34 adet *F. oxysporum* izolatının vejetatif uyum gruplarını belirlemişler ve *F. oxysporum* f. sp. *melongenae*'ye yönelik bir VCG grubu (0320) saptamışlardır.

Patlıcanda Fusarium solgunluğuna karşı 12 yabani patlıcan türünün reaksiyonu araştırılmıştır. Bu türler arasında, *Solanum incanum*, *S. linneanum* yüksek derecede duyarlılık göstermiş, buna karşın *S. sisymbrifolium, S. torvum* ve *S. aethiopicum* dayanıklı bulunmuştur (Stravato ve Capelli, 2000).

Diğer bir çalışmada, yabani bir tür olan *Solanum aethiopicum* ile kültür patlıcanı (*Solanum melongena*) arasında yapılan somatik melezlemelerden elde edilen somatik hibritlerin Fusarium solgunluğuna dayanıklı olduğu bildirilmiştir (Rizza ve ark., 2002).

Kashyab ve ark. (2003), patlıcanda Fusarium solgunluğuna yönelik olarak günümüze kadar yapılan biyoteknolojik çalışmaları incelemişler ve Fusarium solgunluğuna dayanıklı yabani türlerin *Solanum indicum, S. integrifolium* ve *S. incanum* olduğunu bildirmişlerdir.

Ülkemizde de bu konuda bazı çalışmalar bulunmaktadır. Yücel (1989), Fusarium ve Verticillium hastalıklarının neden olduğu vasküler solgunluğun gelişebilmesi için 27-28 ºC toprak sıcaklığı, düşük toprak nemi, kısa gün uzunluğu, azot ve fosforca düşük potasyumca zengin düşük pH'lı topraklar olduğunu bildirmiştir.

Özer ve Soran (1991), ülkemizde bugüne kadar *Fusarium* türleri ile yapılan çalışmaları incelemişler ve Ege Bölgesi'nde patlıcanda *Fusarium,* diğer sebzelerde ise *Fusarium solani, F. heterosporium, F. culmorum, F. acuminatum, F. proliferatum, F. equiseti*'nin saptandığını bildirmişlerdir. Ayrıca, Akdeniz ve Ege

Bölgesi'nde patlıcanda Fusarium solgunluğunun varlığı saptanmıştır (Delen ve Yıldız 1982; Yücel, 1994).

Yücel (1994), tarafından yapılan başka bir çalışmada, Adana, Mersin ve Antalya yörelerinde patlıcanda solgunluk hastalığına *Fusarium* sp.'nin neden olunduğu, Hatay yöresinde ise etmenin büyük oranda *Verticillium* sp. olduğu ortaya konulmuştur.

Doğu Akdeniz Bölgesi'nde patlıcan yetiştirilen seralarda, *Fusarium* sp.'nin önemli toprak kökenli patojenlerden biri olduğu belirtilmektedir (Yücel ve ark., 2001).

2.2. Bitki Fungal Hastalıklarına Karşı Dayanıklılığın Uyarılmasına Yönelik Çalışmalar

Günümüze kadar olan çalışmalarda, dayanıklılığın uyarılması (IR)'na yönelik olarak patojen olmayan fungus, bakteri inokulasyonu, fungus veya mayaların hücre duvarından ekstrakte edilen oligosakkaritler gibi biyotik uyarıcılar veya UV, herbisitler, β-amino butyric asit (BABA) ve salisilik asit (SA) gibi abiyotik elicitör olarak isimlendirilen uyarıcılar kullanılmıştır. Biyotik ve abiyotik uyarıcı uygulaması ile bitki patojen infeksiyonu varmış gibi tepki göstererek dayanıklılığı sonuçlayan savunma mekanizmalarını aktive ettiği bildirilmiştir (Kuc, 1987).

2.2.1. Abiyotik Uyarıcılarla İlgili Yapılan Çalışmalar

Abiyotik bir uyarıcı olarak herbisitler 1960'lı yılların başından beri dayanıklılığın uyarılması çalışmalarında kullanılmış ve bu çalışmaların çoğunda herbisitlerin bitki dayanıklılığını uyardığı, özellikle toprak kökenli bitki patojenlerinin oluşturduğu hastalıkları azalttıkları veya arttırdıkları bildirilmiştir (El-Khadem ve Papavizas 1984).

Herbisitlerin bitki bünyesinde antimikrobiyal bileşiklerinin sentezini arttırdığı veya bitkinin fizyolojik işlevlerinde bir takım değişiklikler yaparak biyokimyasal savunma sistemlerini tetikledikleri bildirilmiştir. Ayrıca herbisitlerin, patojen üzerine direkt etkilerinin yanı sıra konukçu-patojen interaksiyonu sonucu

oluşan antimikrobiyal bir bileşik olan fitoaleksinlerin sentez ve birikimini artırdıkları bildirilmiştir (Cohen ve ark., 1986).

EPTC ve linuron herbisitlerinin uygulanmasının sonucunda, pamukta *Rhizoctonia solani*'nin neden olduğu çökerten ve *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*'un neden olduğu solgunluk hastalıklarına karşı bitkinin önemli ölçüde dayanıklılık dayanıklılık kazandığı bildirilmiştir (El-Khadem ve Papavizas, 1984).

Cohen ve ark. (1986), dinitroaniline grubu herbisitlerin, kavun ve domateste Fusarium solgunluk hastalıklarına karşı dayanıklılığı uyardığı ve hastalık oluşumunu % 100'lere varan oranlarda azalttığını saptamışlardır. Bu grup herbisitlerin, bitkilerde IAA mekanizmasını tetikleyerek, bitkiyi predispozisyon durumuna getiren etilen biyosentezini engellediklerini ve aminoethoxyvinyglycine, animooxasetik asit ve gümüş thiosülfat'ın sentez ve birikimine neden olarak, bitkide solgunluk çıkışını azalttıklarını bildirmişlerdir.

Acetochlor etkili maddeye sahip herbisitin, kavunda Fusarium solgunluk hastalığının çıkışına ve bitkideki şeker içeriğine etkisi araştırılmıştır. Acetochlor'un 1 μg/g uygulama dozunun bitkide hastalık simptomlarını kontrole oranla % 25 oranında azalttığı saptanmıştır. Ayrıca bu herbisit uygulamasının bitkilerde glikoz, fruktoz ve sakkaroz oranını da arttırdığı belirtilmiştir (Cohen ve ark., 1996).

Pamukta yabancı ot kontrolünde yoğun olarak kullanılan prometryn, linuron ve haloxyfob'un pamukta *Verticillium dahliae*'nın neden olduğu solgunluk hastalığı üzerine etkisi araştırılmıştır. Herbisit uygulanan alanda bitkilerde simptom oluşmadığı fakat patojenin geriye izole edildiği bildirilmiştir. Bu verilerden, bitkide simptom oluşmamasının yani patojenin inhibisyonunun, herbisit uygulaması sonucu bitkide fitoaleksin sentez ve birikimi sonucunda olduğu bildirilmiştir (Canıhoş, 1997).

Kavunda Fusarium solgunluğuna karşı acetochlor ve trifluralin herbisitlerinin etkinliklerinin araştırıldığı bir çalışmada, saksı ve arazi denemelerinde her iki herbisitin hastalık oranını % 50-80 oranında azalttığı bildirilmiştir (Akgül ve Canıhoş, 2004).

Salisilik Asit (SA) bitkide doğal olarak bulunan fenolik bir bileşiktir. SA bitkide büyüme ve gelişmeyi düzenlemenin yanı sıra bir çok hastalık ve zararlıya

karşı stimulant olarak görev yapmaktadır (Raskin, 1992). Salisilik Asit (SA)'in bitkide büyüme ve gelişmeyi düzenlemenin yanı sıra hastalık ve zararlılara karşı bitkinin savunma mekanizmasında sinyal görevi gördüğü ve dayanıklılığı teşvik ettiği belirtilmiştir. Dayanıklı bitkilerin, patojen saldırısına maruz kaldıklarında duyarlı bitkilere oranla daha yüksek oranda SA sentezledikleri belirtilmiştir.

Gaffney ve ark. (1993), SA'nın sistemik dayanıklılıktaki rolünü araştırmak için tütün bitkilerine SA'yı katekol'a dönüştüren salisilat hidroksilaz enzimini kodlayan geni transfer etmişlerdir. Katekol'un dayanıklılığı teşvik etmediği ve SA biriken bu bitkilerde TMV'ye karşı sistemik dayanıklılığın oluşmadığını bulmuşlardır. Sonuçta SA'nın sistemik dayanıklılığın gelişimi için mutlaka gerekli olduğu sonucuna varılmıştır.

Erzurum ve Maden (1995)'in yaptığı çalışmada, kavunda Fusarium solgunluğuna (*F. oxysporum* f. sp. *melonis*) karşı trifluralin ve patojen olmayan *Fusarium*'lar kullanarak dayanıklılığı teşvik edilmeye çalışılmıştır. Trifluralin'in ve *F. oxysporum*'un patojen olmayan iki izolatının dayanıklılığı yüksek oranda teşvik ederek hastalık çıkışını sırasıyla % 46.0, % 46.3 ve % 39.2 oranında azalttığını saptamışlardır.

DL-β-amino-n-butyric-acid (BABA) domates bitkilerine püskürtme şeklinde 2000 ppm dozda uygulandığında, *Phytophthora infestans* infeksiyonuna karşı bitkide lokal ve sistemik dayanıklılığı uyardığı ve bunun sonucunda da % 95 oranında koruma sağladığı belirtilmiştir. BABA'nın 175 ppm'lik dozunun ise, hastalığın kontrolünde % 50 başarı sağladığı bildirilmiştir. DL-4-amino-n-butanoic-acid'in hastalığın kontrolünde etkinlik göstermediği, DL-2-amino-n-butanoic-acid'in ise DL-3-amino-n-butanoic-acid'in yarısı kadar etkinlik gösterdiği belirtilmiştir (Cohen, 1994).

Görlach ve ark. (1996), benzo (1,2,3) thiadiazole –7- carbothioic acid 5-methyl ester (BTH)'ın 35 g/ha dozunda, buğday bitkilerinin 2 nodyumlu olduğu dönemde bitkilere püskürtülmesiyle, *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici* tarafından neden olunan külleme hastalığına karşı bitkilerin tüm sezon boyunca korunduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca BTH'ın, *Puccinia recondita, Septoria* sp. funguslarının neden olduğu pas ve yaprak leke hastalıklarının simptomlarını % 35 düzeyinde

azalttığı saptanmıştır. Bu çalışmada ayrıca, BTH'ın bitki dokularında papilla oluşumunu artırdığı, fungusların houstorium oluşumlarını önemli ölçüde azalttığı belirtilmiştir.

Phytophthora capsici infeksiyonlarına karşı DL-β-amino-n-butyric-acid (BABA)'in dayanıklılığı uyardığı bildirilmiştir. BABA 1000 μg/ml gibi yüksek konsantrasyonlarda uygulandığında, *Phytophthora capsici*'ye karşı *in vitro*'da antifungal etki göstermediği belirtilmiştir. Biber bitkilerine BABA uygulamasından 24 saat sonra patojen inokulasyonunun, dayanıklılığın uyarılması için yeterli olduğu saptanmıştır. Yeşil aksama spreyleme şeklinde BABA uygulamasının, biber bitkilerinin gövdelerinde *Phytophthora* infeksiyonunun gelişimini yavaşlattığı bildirilmiştir. Ayrıca, bitkinin kök bölgesine BABA uygulamasının da, *P. capsici* infeksiyonlarına karşı koruma sağladığı belirtilmiştir (Sunwoo ve ark., 1996).

DL-β-amino-n-butyric-acid (BABA)'in biber bitkilerine 1000 μg/ml dozda püskürtüldüğünde, bitkide *Phytophthora capsici* infeksiyonlarına karşı % 75 oranında koruma sağlandığı bildirilmiştir. BABA uygulamasının bitkilerde dayanıklılıkta rol alan, β-1,3-glukanaz, kitinaz ve salisilik asit birikiminde artışa neden olduğu ve bunun sonucunda da bitkilerde hastalık oluşumunun azaldığı belirtilmiştir. Bu uygulamanın kontrolle karşılaştırıldığında, bitkilerdeki glukanaz aktivitesini 3.5 kat, kitinaz aktivitesini ise yaklaşık olarak 6 kat artırdığı bildirilmiştir (Hwang ve ark., 1997).

Ishii ve ark. (1999), acibenzolar-S-methyl'in 100 mg/ml dozdaki uygulamalarının hıyar bitkisinde antraknoz hastalığının (*Colletotrichum lagenarium*) gelişimini % 100'lere varan seviyelerde kontrol ettiği ancak bu uygulamanın, Fusarium solgunluğunu kontrol edemediğini belirtmişlerdir. Ayrıca, Acibenzolar-S-methyl aynı dozda armut ağaçlarına uygulandığında, *Gymnosporangium asiaticum* fungusunun neden olduğu pas hastalığını, % 75.9 oranında engellediği, *Venturia* sp.'nin neden olduğu karaleke hastalığını ise % 50 oranında kontrol ettiği saptanmıştır. *In vitro* çalışmalarda, Acibenzolar-S-Methyl'in bu organizmaların miseliyal gelişimlerine önemli etki göstermediği ve bunun sonucunda da bu kimyasalların bitkilerde dayanıklılığı uyardığı bildirilmiştir.

Acibenzolar-S-methyl, (Benzothiadiazole; BTH) uygulamasının tütün bitkilerinde bakteriyel ve fungal hastalıklara karşı SAR genlerini aktive ettiği bildirilmiştir. Acibenzolar-S-methyl'in 10 haftalık tütün fidelerinin yeşil aksamına spreyleme şeklinde uygulanmasından bir hafta sonra patojen inokulasyonunun, SAR mekanizmasının aktive olmasında yeterli olduğu belirtilmiş ve bu uygulama sonucunda, *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*'nin nekrotik lezyonlarında önemli oranda azalma gözlenmiştir. Ayrıca, acibenzolar-S-methyl (30 g ha^{-1}) ve bakır oksiklorür birlikte üç kez spreylendiğinde, *Rhizoctonia* ve *Cercospora* funguslarının neden olduğu infeksiyonlarda azalmalar gözlenmiştir (Cole, 1999).

DL-β-amino-n-butyric-acid (BABA) uygulamasının biber bitkilerinde, *Phytophthora capsici* infeksiyonlarına karşı koruma sağladığı belirtilmiştir. Ultrastrüktürel incelemeler sonucunda, BABA uygulamasından sonra *P. capsici* ve bitki arasında oluşan uyumsuz reaksiyonun fungusun hifsel gelişimini ve sporangium oluşumunu azalttığı gözlenmiştir. Ayrıca bu uygulamanın, fungusun mitokondrilerinde dejenerasyona neden olduğu ve houstorium oluşumunu engelleyerek bitki dokularının penetrasyon şansını azalttığı bildirilmiştir (Lee ve ark., 2000).

Depolanmadan önce UV uygulamasının, havuç köklerinde, *Botrytis cinerea* infeksiyonuna etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, UV ışınları ile uygulama gören dokularda, antimikrobiyal bir bileşik olan 6-methoxymellein sentezinin arttığı ve havuç köklerinin *B. cinerea*'ya karşı dayanıklılık kazandığı belirtilmiştir. Ancak UV ışını uygulaması sonucu ortaya çıkan bu dayanıklılığın sistemik olmadığı, yalnızca UV ışığına temas eden dokularda dayanıklılığın oluştuğu bildirilmiştir (Mercier ve ark., 2000).

Benzothiadazole (BTH) ve acetylsalicylic acid (ASA)'in, tarla ve cam serada yetiştirilen patateslere spreyleme şeklinde uygulandığında, patateste erken yanıklık (*Alternaria solani*) ve külleme (*Erysiphe cichoracearum*) yaprak hastalıklarının kontrolüne etkinlikleri araştırılmıştır. BTH (50 mg L^{-1}) ve ASA (400 mg a.i.L^{-1})'ın, tarla koşullarında erken yanıklık hastalığı sonucu oluşan lekelerin şiddetini azalttığı gözlenmiştir. Sera koşullarında ise bu uygulamalardan hemen sonra bitkilere bu iki patojen inokule edilmiş ve her iki patojenin infeksiyonuna

karşı bitkilerin tamamen kontrol edilebildiği belirtilmiştir. Bu uygulamaların ayrıca, hasat sonrası Fusarium kuru kök çürüklüğü hastalığının şiddetini azalttığı bildirilmiştir. BTH uygulamasının bitkinin kök bölgesi hariç, yaprak, gövde, yumru ve stolonda β-1,3 glukanaz aktivitesini artırdığı belirtilmiştir (Bokshi ve ark., 2003).

Baysal ve ark. (2003), domateste bakteriyel kansere neden olan *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'e karşı bitki savunma aktivatörü acibenzolar-S-methyl (ASM)'in etkinliğini araştırmışlardır. ASM uygulandıktan 24, 48, 72 ve 96 saat sonra bakteriyel inokulasyon yapmışlar ve inokulasyondan sonraki 4, 7, 11 ve 14. günlerde hastalık simptomlarını değerlendirmişlerdir. En düşük hastalık oranı, 72 saat sonra yapılan inokulasyonlar sonucunda elde edilmiş ve bu oran % 76.3 olarak saptanmıştır. Ayrıca ASM uygulaması yapılan bitkilerde oluşan dayanıklılığın, peroksidaz ve kitinaz aktivitelerindeki önemli artışlarla ilişkili olduğu bildirilmiştir.

2.2.2. Biyotik Uyarıcılarla İlgili Yapılan Çalışmalar

Hıyarda Fusarium solgunluğuna neden olan *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*'a karşı uyarıcı olarak hıyarda patojen olmayan *Fusarium* türleri (*F. oxysporum* f. sp. *melonis*, *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans* ve *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*) inokule edilmiştir. Solgunluk hastalığına bağlı ölüm oranı kontrol bitkilerinde % 71 olarak belirlenirken, patojen olmayan *Fusarium* türlerinin inokulasyonu ile ortaya çıkan ölüm oranı sırasıyla % 58, % 63 ve % 63 olarak saptanmıştır (Gessler ve Kuc, 1982).

Domateste *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*'ye karşı vesiküler arbuskular mikorizal fungus (VAM) *Glomus intraradices*'in uyarıcı olarak uygulandığı bir çalışmada, *G. intraradices* ile inokule edilen bitkilerde *Fusarium* konidilerinin ve kök nekrozlarının önemli oranda azaldığı bildirilmiştir (Caron ve ark., 1986).

Biles ve Martyn (1989), Fusarium solgunluğuna karşı farklı tolerans seviyelerine sahip karpuz çeşitlerini, *F. oxysporum* f. sp. c*ucumerinum* ve *F. oxysporum* f. sp. *niveum*'un avirulent ırklarıyla inokule etmişler ve 24 veya 72 saat

sonra virulent *F. oxysporum niveum* ırkını inokule ederek karpuzda dayanıklılığı teşvik edip etmediğini araştırmışlardır. Hem karpuzda patojen olmayan *F. oxysporum* f. sp. c*ucumerinum,* hem de *F. oxysporum* f. sp. *niveum*'un avirulent patojen ırkının, dayanıklılığı teşvik ederek solgunluk simptomlarını önemli oranda azalttığını ve avirulent ırkın daha etkili bir uyarıcı olduğunu belirtmişlerdir.

Karpuzda yapılan başka bir çalışmada, *F. oxysporum niveum*'un 0 ve 1 no'lu ırkları ile karpuzda patojen olmayan *F. oxysporum cucumerinum,* tüm karpuz çeşitlerinde şiddetli hastalık yapan *F. oxysporum niveum*'un 2 nolu ırkına karşı uygulanmıştır. Tarla koşullarında patojen seviyesi normal bulaşıklık düzeyinde (750 cfu/g toprak) olduğunda, ırk 1 inokule edilen bitkilerde hastalık çıkışı 2 hafta geç olmuş, ayrıca ölüm oranında % 35 azalma gözlenmiştir. *F. oxysporum cucumerinum* inokule edildiğinde ise, solgunluk simptom çıkışı 2 hafta gecikmiş, ancak sezon sonunda hastalık şiddeti kontrolle aynı olmuştur. Toprakta patojen populasyonu 5 kat (4000 cfu/g toprak) artırıldığında, ırk 1 hastalık çıkışında gecikmeyi sağlamış ancak sezon sonunda hastalık şiddeti azalmamıştır. Patojen, bitkinin kök ve kök boğazı kısımlarından izole edildiği için, bitkide dayanıklılığın uyarıldığı ancak patojenin başlangıç penetrasyonunu engellemediği sonucuna varılmıştır (Martyn ve ark., 1991).

Fungal hücre duvarından ekstrakte edilen β-glukan, kitin ve kitosan fragmentlerinin veya bitki hücre duvarının pektik kısımlarının, bitkide lokal ve sistemik savunma mekanizmalarında rol alan genleri aktive edebildiği bildirilmiştir. *Phytophthora megasperma*'nın miselyal hücre duvarından izole edilen β-1,3- ve β-1,6-glukan'ın uyarıcı olarak kullanıldığı bir çalışmada, soya bitkisinde bu uyarıcıların etkisi ile fitoaleksin üretiminde bir artış olduğu ve *P. megasperma*'ya karşı bir dayanıklılığın oluştuğu bulunmuştur (Waltmüller ve ark., 1993). Yine bu fungustan saflaştırılan ekstrasellüler glikoprotein, maydanoz hücre ve protoplast kültürlerine uygulandığında bitkinin savunma mekanizmasında rol alan genleri aktive ettiği ortaya çıkarılmıştır (Sacks ve ark., 1993).

Erzurum ve Maden (1995), kavunda Fusarium solgunluğuna (*F. oxysporum* f. sp. *melonis*) karşı trifluralin ve patojen olmayan *Fusarium*'lar kullanarak dayanıklılığı teşvik etmeye çalışmışlardır. Trifluralin'in ve *F. oxysporum*'un

patojen olmayan iki izolatının dayanıklılığı yüksek oranda teşvik ederek hastalık çıkışını sırasıyla % 46.0 % 46.3 ve % 39.2 oranında azalttığını saptamışlardır.

Bitki gelişimini düzenleyici rhizobakterilerden (Plant Growth Promoting Rhizobacteria; PGPR), *Pseudomonas putida*'nın 89B-27 no'lu ırkı ve *Serratia marcessens*'in 90-166 no'lu ırkı hıyarda Fusarium solgunluk hastalığı etmeni *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*'a karşı dayanıklılık uyarıcı olarak kullanılmıştır. Bu bakterilerle hıyar bitkilerinin kökleri inokule edilmiş ve hemen sonrasında bu köklere patojen inokulumu verilmiştir. Denemenin sonucunda kontrol bitkilere oranla hastalığın çıkışında bir gecikme gözlenmiş ve kontrol bitkilerinde toplam lezyon alanı 132.7 mm^2 olarak saptanırken *P. putida* inokule edilen bitkilerde 62.1 mm^2 ve *S. marcessens* inokule edilen bitkilerde ise 57.1 mm^2 olarak saptanmıştır (Liu ve ark., 1995).

Marul mildiyösü hastalık etmeni *Bremia lactucae*'ya karşı bakteriyel β-1,3-glukanaz'ı kodlayan gen, marul bitkilerine aktarılmıştır. Gen transferi yapılan bitkilerin mildiyö hastalığına karşı önemli oranda dayanıklılık kazandığı bildirilmiştir (Canıhoş ve Beynon, 1996).

Larkin ve ark. (1996), karpuzda Fusarium solgunluğuna karşı, topraktan izole ettikleri bakteri, fungus ve actinomycetes'lerden oluşan 400 mikroorganizma izolatının dayanıklılıktaki rollerini araştırmışlardır. Bunlardan, sadece patojenik olmayan *F. oxysporum*'ların hastalık oluşumunu azalttığını belirtmişlerdir. Bu durumun antagonistik etkiden çok, bitkinin dayanıklılık mekanizmasının aktive edilmesinden kaynaklandığını ortaya koymuşlardır.

Subtropik bir bezelye türünde *Fusarium udum* tarafından neden olunan Fusarium solgunluğuna karşı kök ur nematodları (*Meloidogyne javanica* ve *M. incognita*)'nın dayanıklılık uyarıcı olarak etkileri araştırılmıştır. Fusarium solgunluğuna karşı her iki nematod toprağa birlikte uygulandıklarında ve fungus ile nematodlar ayrı zamanlarda uygulandıklarında hastalığın baskılanmasında etkili oldukları belirtilmiştir. Kök ur nematodlarının fungal infeksiyon sonucu konukçu bitki reaksiyonunda bazı değişikliklere neden olduğu ve bunun sonucunda da bitkide sistemik dayanıklılığın oluşturulduğu bildirilmiştir (Marley ve Hillocks, 1996).

Domateste Fusarium solgunluğuna karşı patojen olmayan *Fusarium* türünün (Fo47) uyarıcı olarak patojenden önce inokule edilmesinin hastalık gelişimine etkisi araştırılmıştır. Fo47 inokule edilen bitkilerde hastalık oluşmadığını, bu bitkilerde dayanıklılığın sistemik olarak uyarıldığını bildirmişlerdir. Ayrıca Fo47 ile inokulasyonun bitkideki kitinaz, β 1-4-glukosidaz seviyesini arttığını, bunun da dayanıklılığı desteklediği belirtilmiştir (Fuchs ve ark., 1997).

Arabidopsis thaliana üzerinde, mildiyö hastalık etmeni *Peronospora parasitica*'nın infeksiyon gelişimine farklı R genleri taşıyan dayanıklı ekotipler üzerinde gözlenen fenotipik farklılıklar ve konukçu hücrelerde gözlenen ultrayapısal değişiklikler ışık ve elektron mikroskobu (EM) altında incelenmiştir. Mikroskobik incelemelerde uyumsuz ilişki tipik olarak aşırı duyarlılık reaksiyonu (HR) ile karakterize edilmiştir. HR gösteren hücrelerde stoplazmik çöküntü gözlenmiştir. HR ile hücre duvarlarında oluşturulan Kalloz, lignin ve H_2O_2 birikimleri arasında yakın ilişki tespit edilmiştir (Soylu, 1999).

Fuchs ve ark. (1999), domateste Fusarium solgunluk etmeni *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*'ye (Fo18; ırk 0) etkili bulunan patojen olmayan *Fusarium* türü (Fo47)'nün, tarla koşullarında da etkinliğini denemişlerdir. Patojenin yapay olarak inokulasyonundan önce bitkiler Fo47 (10^5 konidi/ml) ile inokule edilmiştir. Fo47'nin solgunluk hastalığına karşı koruyucu etkisinin tarla koşullarında da gözlendiği bildirilmiştir. Bu çalışmaların sonucunda Fo47'nin domateste Fusarium solgunluğunun kontrolünde etkin bir biyotik faktör olduğunu ve ticari koşullarda fungal inokulumun preparasyonu yönünde çalışmalar yapılması gerektiğini belirtmişlerdir.

Elekçioğlu ve ark. (2000), ölü *Verticillium* kültürü, salisilik asit ve trifluralin'in patlıcanda Verticillium solgunluk hastalığı (*Verticillium dahliae*)'na etkilerini araştırmışlardır. Ölü *Verticillium* kültürü, Trifluralin ve SA uygulamalarının belirlenen konsantrasyonlarda hastalığın oluşumunda önemli oranda azalmaya neden olduğu belirtilmiştir. Uygulamaların yüzde etkinliği karşılaştırıldığında, SA'nın 1mM konsantrasyonunun % 100 etkinlik sağladığı ve hastalığın baskılanmasında en etkin uygulama olduğu belirtilmiştir. Önerilen dozun

iki katı konsantrasyonda Trifluralin ve ölü *Verticillium* kültürü uygulamasının hastalığın önlenmesinde sırasıyla % 70 ve % 60'lık bir etki gösterdiği saptanmıştır.

Bacillus pumilus'un INR7, *Curtobacterium flaccumfaciens*'in ME1 ve *Bacillus subtilis*'in GBO3 streynleri ayrı ayrı hıyar tohumlarına uygulandığında *Psedomonas syringae* pv. *lachrymans* ve *Colletotrichum orbicular* tarafından neden olunan köşeli yaprak leke ve antraknoz hastalıklarının şiddetini önemli oranda azaltmıştır. Bu bakteriler karıştırılarak tohum uygulaması yapıldığında ise ayrı verilmelerine oranla çok daha yüksek bir koruma sağlamıştır (Raupach ve Kloepper, 2000).

Bezelyede *Mycosphaerella pinodes* infeksiyonlarına karşı, *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*'nin avirulent bir türünün ve benzothiadiazole (BTH; 20 ve 100 μg/ml)'ün etkinlikleri araştırılmıştır. Uygulamaların *M. pinodes*'e duyarlılığı azaltmada etkin olduğu belirtilmiştir. Ayrıca bu uygulamaların, *Uromyces viciae-fabae* ve virulent *P. syringae* pv. p*isi*'ye karşı da benzer etkide bulunduğu bildirilmiştir. İnokulasyondan sonra 6. günde bitkinin uygulama görmemiş en üst yapraklarında, β-1,3 glukanaz ve kitinaz enzimlerinin aktivitesinde artış saptanırken, peroksidaz aktivitesinde herhangi bir artış saptanmamıştır. BTH ve *avirulent* ırkın, *M. pinodes*'i inaktive eden doğal sinyalizasyon olaylarını uyarmada yüksek aktivite gösterdiği sonucuna varılmıştır (Dann ve Deverall, 2000).

Fusarium culmorum tarafından infektelenen dayanıklı ve duyarlı buğday çeşitlerinde patojen gelişimi ve konukçu reaksiyonları, elektron mikroskobu ve immünogold etiketleme tekniği ile incelenmiştir. Bu çalışmada, duyarlı ve dayanıklı çeşitler arasında patojenin infeksiyon gelişimindeki farklılıklar ortaya konulmuştur. Dayanıklı çeşitlerde patojenin gelişiminin duyarlı çeşitlere oranla daha yavaş olduğu belirtilmiştir. Hücre duvarının kalınlaşması, papilla oluşumu gibi yapısal savunma reaksiyonları duyarlı çeşitlerin infekteli dokularında daha fazla gözlenmiştir. İmmünogold etiketlemede kontrol bitkilere oranla, duyarlı çeşitlerin infekteli dokularında hücre duvarlarında lignin oluşumunun yoğunluğunun fazla olduğu bildirilmiştir. *Fusarium* toksininin (DON) dayanıklı çeşitlerde düşük oranda üretildiği bildirilmiştir (Kang ve Buchenauer, 2000).

Domateste Fusarium solgunluğu (Fol; *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*)'na karşı Fluoresent Pseudomonas (G309, W34 ve CW2)'lar, acibenzolar-S-methyl (ASM) ve bunların kombinasyonlarının etkinliği elektron mikroskop çalışmaları yapılarak araştırılmıştır. *Pseudomonas fluorescens*'in, Fol'un miseliyal gelişimini *in vitro*'da inhibe edemediği ancak, ürettiği enzimlerle Fol'un kolonizasyonunu önlediği ve sonrasında hiflerini lyze ettiği belirtilmiştir. Fluorescent Pseudomonas'lar ASM ile kombine edildiklerinde, domates bitkisinin köklerinde ksilem dokusunda mikrokoloniler lokalize ederek, Fol'un çim tüpü penetrasyonunu engelledikleri ve Fol hiflerinde morfolojik bozulmalara neden oldukları gözlenmiştir. ASM uygulamasının ise, Fol'un sporlarının çim tüpü uzamasını engellediği ve penetrasyonu tamamen durdurduğu bildirilmiştir (Kang ve Buchenauer, 2001).

Penicillium chrysogenum'un asidik (DME) ve nötralize (NDME) kuru miselyum ekstraktı *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* inokulasyonundan önce kavun bitkilerinin köklerine uygulanmıştır. Bu uygulamaların, kavunda Fusarium solgunluğuna karşı koruma sağladığı belirtilmiştir. İnokulasyondan 72 saat önce, % 2-5'lik DME uygulamasının hastalığın kotrolünde etkin olduğu bildirilmiştir. DME ve NDME (% 0.5-5)'nin her ikisinin de *in vitro*'da fungal gelişime herhangi bir inhibitör etki göstermediği belirtilmiş ve bunun sonucunda bu uygulamaların bitkilerde dayanıklılığı uyardığı sonucuna varılmıştır. Ayrıca DME ve NDME uygulamalarının bitkide peroksidaz aktivitesini de artırdığı belirtilmiştir (Dong ve Cohen, 2001).

Nohutta Fusarium solgunluğuna neden olan *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*'in şiddetli virulent ırkına karşı (Foc ırk 5) uyumsuz ırk, Foc ırk 0 ve patojen olmayan *Fusarium oxysporum*'un uyarıcı olarak kullanıldığı bir çalışmada, bitkilere önce uyarıcılar kök daldırma yöntemi ile inokule edilmiş ve üç gün sonra aynı yöntemle Foc'un 5 no'lu ırkı inokule edilmiştir. Hastalığın baskılanmasında kullanılan uyarıcılardan, patojen olmayan *Fusarium oxysporum*'un, Foc ırk 0'dan hastalığın baskılanmasında daha etkin olduğu belirtilmiştir. Bu uyarıcılarla inokulasyon, maackiain ve medicarpin fitoaleksinlerinin sentezinde artışa neden

olmuştur. Ayrıca bu uyarıcılar bitki köklerinde kitinaz, β-1,3-glukanaz ve peroksidaz enzimlerinde birikime neden olmuştur (Cachinero ve ark., 2002).

Erysiphe (*Blumeria*) *graminis* f. sp. *hordei*'nin neden olduğu arpada külleme hastalığına karşı *Bipolaris oryzae*, *Pythium ultimum* ve *Rhizopus stolonifer*'in sıvı kültür ortamında hazırlanan miselyal ekstraktlarının etkinliği araştırılmıştır. Patojene karşı oluşan korunma mekanizmaları histopatolojik ve moleküler analizlerle incelenmiştir. Miseliyal ekstrakt uygulamaları *B. graminis*'in çimlenme ve appressorium oluşturma yeteneğini azalttığı ve bitkide dayanıklılıkla ilgili yapılardan biri olan papilla oluşumlarına neden olduğu belirtilmiştir. Miseliyal ekstraktların direkt antifungal etki göstererek, bitkide dayanıklılığı uyardığı görüşü bildirilmiştir (Haugaard ve ark., 2002).

Arpa yapraklarından hücre duvarına bağlı thioninlere karşı poliklonal bir antiserum ve mısır bitkisinden HRGP'lere karşı da monoklonal antiserum elde edilmiştir. *Fusarium culmorum*'la infekteli başaklarda thioninlerin ve HRGP'nin hücre altı lokalizasyonunun araştırılmasına yönelik bu çalışmada, immünogold etiketleme tekniği kullanılmıştır. Bu proteinlerin hücre duvarı altındaki dokularda lokalize olduğu gözlenirken, stoplazmada ve hücre organellerinde herhangi bir birikim gözlenmemiştir. Duyarlı çeşitlerde infekteli buğday başaklarında thioninlerin ve HRGP'nin birikimi, dayanıklı çeşitlerden fazla olmuştur. İnfekteli buğday başaklarında thioninlerin ve HRGP'nin hücre duvarlarında birikiminin, *F. culmorum*'un infeksiyonuna ve yayılımına karşı bitkide oluşan bir savunma reaksiyonu olabileceği bildirilmiştir (Kang ve Buchenauer, 2003).

Gossypium hirsutum (H552 ve Vered) ve *G. barbadense* (PF15 ve P906) pamuk çeşitlerinin köklerine uygulanan kuru *Penicillium chrysogenum* (PEN) misellerinin, *Verticillium dahliae* Kleb.'in kontrolüne etkinliği incelenmiştir. PEN uygulamasının (% 5) her iki çeşit için de bu hastalığa karşı koruma sağladığı belirtilmiştir. İnokulasyondan 24 ve 48 saat sonra PEN uygulamasının, bitkide peroksidaz (POX) aktivitesini artırdığı ve hipokotillerde lignin birikimine neden olduğu bildirilmiştir (Dong ve ark., 2003).

2.3. *Fusarium* Türlerinin Moleküler Karakterizasyonuna Yönelik Çalışmalar

Bir fungus türünün veya ırkının birbirine olan genetik yakınlığı Vejetatif uyumluluk (Vegetative Compatibility Group; VCG), RAPD (Randomly Amplified Polymorfic DNA), RFLP (Restriction Fragment Lenght Polymorphism), AFLP (Amplified Fragment Lenght Polymorphism), DAF (DNA Fingerprinting) ve izo-enzim analizleri gibi moleküler tekniklerle araştırılabilmektedir (Sambrook ve ark., 1989; Arda, 1995; Katan, 1997; Nelson ve ark., 1997). RAPD kullanılarak pamukta solgunluk etmeni *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*'un (Assigbetse ve ark., 1994) ve nohutta solgunluk etmeni *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*'in (Kelly ve ark., 1994) ırklarının saptanabileceği belirtilmiştir.

Pamukta solgunluk hastalığına neden olan *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*'un, farklı coğrafik orijinlerden izole edilen 46 izolatı arasındaki genetik farklılığı belirlemede patojenite ve RAPD teknikleri kullanılmıştır. Patojenite denemelerinde bu izolatlar, virulensliklerine ve kullanılan farklı çeşitlere göre üç farklı gruba ayrılmıştır. Bu izolatlardan 25 tanesinin, *Gossypium hirsitum* ve *G. barbadense* çeşitlerinde yüksek virulenslik gösterdiği gözlenmiştir. Bu izolatlar arasındaki genetik varyasyon, tesadüfi 11 adet 10 bazlık primer setiyle polimeraz zincir reaksiyon yöntemi ile amplifiye edilerek belirlenmiştir. Polimorfizm gösteren 83 DNA bantı kaydedilerek (1/0) cluster analizi ile izolatlar arasındaki genetik yakınlığı gösteren bir dendrogram oluşturulmuştur. OPF-06 primeriyle oluşturulan amplifiye DNA fragmentlerinin büyüklüklerinin 0.2-2.1 kb arasında değiştiği bildirilmiştir. Oluşturulan dendrogramın patojenite sonuçlarıyla benzerlik göstermediği ve *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* izolatlarının moleküler karakterizasyonunda, RAPD yönteminin hızlı ve güvenilir olduğunu bildirilmiştir (Assigbetse ve ark., 1994).

F. oxysporum f. sp. *phaseoli* ile yapılan bir çalışmada, ırk ayrımında ve izolatların genetik karakterizasyonunda patojenite denemesi yanında, VCG, RFLP ve RAPD gibi tekniklerin de kullanılabileceği ortaya konmuştur (Woo ve ark., 1996). Soyada ani ölüme neden olan *F. solani* izolatlarının patojen olup olmadığı

ve patotiplerinin belirlenmesinde RAPD marker'ları kullanılmış ve oldukça duyarlı ve güvenilir bir metod olduğu belirtilmiştir (Achenbach ve ark., 1996).

Peru'da Huallaga vadisinde, coca bitkisi yetiştirilen alanlarda *Erythroxylum coca* var. *coca*'dan izole edilen *Fusarium* spp.'lerin RAPD analizi ile genetik yakınlıkları araştırılmıştır. Coca bitkisi yetiştirilen 10 farklı bölgeden 200 *Fusarium* izolatı elde edilmiştir. Kök daldırma yöntemi ile yapılan patojenite denemelerinde, bu izolatlardan 143'ünün *Erythroxylum coca* var. *coca*'da patojen olduğu belirtilmiştir. RAPD analizleriyle iki alt gruba ayrılan bu patojenik izolatlar arasında polimorfizm gözlenmemiştir. Alt populasyon I'in hastalığın en yaygın olduğu bölgeyi temsil ettiği bildirilmiştir. Ayrıca RAPD analizi ile patojen ve patojen olmayan izolatların kolayca ayırt edilebildiği belirtilmiştir (Nelson ve ark., 1997).

Hıyardan izole edilen *Fusarium* izolatlarının RAPD analiziyle genetik yakınlıklarının belirlendiği diğer bir çalışmada OPA-01, OPB-01'den OPB-20'ye kadar ve OPF-05 primerleri kullanılmış ve bu primerlerden 10 tanesi verdikleri bant görünümlerine göre RAPD-PCR çalışmaları için seçilmiştir. Amplifikasyonların sonucunda, 121 *Fusarium oxysporum* izolatının RAPD profilleri oluşturulmuş ve 107 amplifiye DNA bantının 97'sinin polimorfik olduğu belirlenmiştir. Amplifiye bantların büyüklüklerinin 0.2-2.3 kb arasında değiştiği bildirilmiştir (Vakalounakis ve Fragkiadakis, 1999).

Vakalounakis ve Fragkiadakis (1999) tarafından yapılan benzer bir çalışmada, kök ve gövde çürüklüğü gösteren hastalıklı hıyar bitkilerinden izole edilen 106 *F. oxysporum* izolatının genetik farklılıkları patojenite, vejetatif uyumluluk (vegetative compatibility) ve RAPD analizleriyle karakterize edilmiştir. Patojenite çalışmalarında, 68 izolat *F. oxysporum* f. sp. *radicis-cucunerinum*, 32 izolat *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* ve 6 izolat da patojen bulunmamıştır. *F. oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum*'un 68 izolatının hepsi oluşturulan genetik ağaçta tek bir RAPD grubuna dahil olmuştur. *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum*'un 32 izolatı, 8 farklı VCGs ve 2 farklı RAPD grubu oluştururken, iki izolat ise vejetatif olarak uyumsuz bulunmuştur. RAPD analizleri ile patojenite sonuçları birbirlerine paralellik göstermiş, *F. oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* ve *F.*

oxysporum f. sp. *cucumerinum*'lar oluşturulan genetik ağaçta tamamen farklı dallarda yer almışlardır. VCG ve RAPD çalışmalarının *F. oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* ve *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* izolatlarının farklılığını ortaya koymada etkin yöntemler oldukları belirtilmiştir.

İtalya ve İsrail'de yürütülen bir çalışmada, solgunluk simptomu gösteren fesleğen bitkilerinin sap, tohum, çiçek ve topraktan izole edilen 52 *Fusarium oxysporum* izolatının genetik yakınlıklarını belirlemede, RAPD-PCR tekniği kullanılmıştır. Patojenite denemelerinde 35 izolatın, Fusarium solgunluğuna duyarlı bir çeşit olan "Fine Verde" çeşidinde % 32-92 oranında hastalığa neden olduğu, 17 izolatın ise patojen olmadığı belirlenmiştir. Topraktan ve solgun bitkilerden izole edilen 30 *Fusarium* izolatının 31 farklı primerle (Operon serisinden OPB kiti (OPB-01-OPB-30) RAPD analizi sonucunda, *F. oxysporum* f. sp. *basilici* diğer f. sp.'lerinden ve patojen olmayan streynlerinden ayırt edebilmiştir. Amplifiye bantların büyüklüklerinin 0.3-3.0 kb arasında değiştiğini bildirilmiştir. RAPD-PCR tekniği ile *F. oxysporum* f. sp. *basilici*'nin tanımlanmasında 1.0 kb amplifikasyon ürünü veren OPB-08 primerinin en uygun primer olduğu belirtilmiştir. Fesleğende patojen olan *F. oxysporum* f. sp. *bacilici* izolatlarının diğer izolatlardan tamamen farklı RAPD bantları verdiğini, polimorfizm gösteren bantların *Fusarium* tür ve f. sp. düzeyinde teşhisinde kullanılabileceğini, böylece hızlı ve kesin tanı yapılabileceği belirtilmiştir (Chiocchetti ve ark., 1999).

Polonya, İngiltere, Yeni Zellanda, İtalya ve Kanada'dan izole edilen *Fusarium culmorum, F. graminearum, F. crookwellense* ve *F. avenaceum* toksigenik hububat patojenlerinin, RAPD-PCR ve Dizi Analizi yöntemleri ile moleküler karakterizasyonu yapılmıştır. Ayrıca bu izolatların morfolojileri ve laboratuvar koşullarında toksin üretimleri belirlenmiştir. Üç adet 20 bazlık primerlerle yapılan RAPD-PCR çalışmaları sonucunda *F. avenaceum* izolatlarının türe spesifik bant dizaynı sergiledikleri ve bu izolatların genetik olarak birbirlerine çok yakın oldukları belirtilmiştir. *F. culmorum* ve *F. graminearum*'un tanımlanmasında, RAPD-PCR yönteminin hızlı ve güvenilir sonuç verdiği bildirilmiştir. RAPD sonuçlarının, morfolojik özelliklerine göre tanısı yapılan *F.*

culmorum ve *F. graminearum* türlerinin sonuçlarını desteklediği bildirilmiştir (Chelkowski ve ark., 1999).

Portekiz ve Fransa orijinli *F. oxysporum* f. sp. *melonis* izolatlarının ırkları (ırk 1, 2 ve 1-2) arasındaki yakınlık, Randomly Amplified Polymorphic DNAs (RAPDs) tekniği ile belirlenmiştir. Bu çalışmada, 16 primer kullanılmış ve her bir izolat 5-10 DNA bantı oluşturmuştur. Amplifiye DNA fragmentlerinin büyüklükleri, 0.5-3.2 kb arasında değişmiştir. Portekiz izolatı (ırk 2), Fransa izolatı (ırk 1)'e çok yakın bulunurken, Fransa izolatı (ırk 2) diğer ırklara çok uzak bulunmuştur (Veloso ve ark., 2000).

F. oxysporum'un 4 farklı f. sp.'i ve *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*'nin iki ırkı (Fol; ırk 1 ve ırk 2) arasındaki genetik varyasyonun belirlenmesinde, RAPD, ITS ve rDNA analizleri yapılmıştır. *F. oxysporum* f. sp. *cubense*, *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*, *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* arasında % 50'den fazla genetik varyasyon gözlenirken, Fol; ırk 1 ve ırk 2 arasındaki varyasyon ise % 7 olarak saptanmıştır. Bu izolatların hepsi ITS1 ve ITS2 bölgelerinde % 97'den fazla genetik varyasyon gösterirken, rDNA genleri % 100 homolog olarak belirlenmiştir (Kuramae ve Souza, 2002).

Amerika'nın yüksek bölgelerinde, Fusarium solgunluk simptomu sergileyen fasülye ve şeker pancarı bitkilerinden izole edilen 166 *Fusarium oxysporum* izolatının, patojenite ve RAPD analizleriyle genetik farklılıkları belirlenmeye çalışılmıştır. Patojenite denemelerinde 166 izolattan sadece 4'ünün, fasülye bitkisinde patojen olan *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* (Fop) olduğu belirlenmiştir. Bu izolatların 12 farklı primerle yapılan RAPD analizlerinde 105 polimorfik bant elde edilmiş ve patojenik ve patojenik olmayan Fop ve Fob izolatlarının oluşturulan dendrogramda farklı gruplarda yer aldıkları gözlenmiştir (Cramer ve ark., 2003).

Farklı bölgelerden izole edilen 46 *Fusarium* izolatının, AFLP analizi ile türleri ve genetik yakınlıkları belirlenmiştir. Bu çalışmada, *Fusarium* DNA'sı, *Eco*RI ve *Ms*eI endonukleaz enzimleri ile kesilmiştir. 100-500 bp arasında değişen, toplam 80 AFLP polimorfik marker gözlenmiş ve analiz sonucunda oluşturulan dendrogramda F. *oxysporum*, *F. moniliforme, F. solani, F. avenaceum* ve *F. chylamdiosporum* türleri ayrı gruplarda yer almışlardır. *Fusarium* türlerinin

ayrımında AFLP'nin pratik bir teknik olduğu bildirilmiştir (Abdel-Satar ve ark., 2003).

Cezayir'de mercimek yetiştiriciliği yapılan alanlarda, solgun mercimek bitkilerinden 32 adet *F. oxysporum* f. sp. *lentis* izole edilmiştir. İzolatlar arasındaki genetik varyasyon, RAPD-PCR ve AFLP analiz yöntemleriyle belirlenmiştir. izolatlar arasındaki genetik yakınlık, Jaccard'ın coefficient formülü ve cluster analizleri ile hesaplanmıştır. Bu izolatlar her iki analiz yönteminde de iki alt populasyona ayrılmıştır (Belabid ve ark., 2003).

Kaliforniya'da solgunluk simptomu gösteren domates bitkilerinden 39 *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* izolatı elde edilmiş ve bu izolatların patojenite ve VCG testleri yapılmıştır. VCG çalışmaları sonucunda, 13 izolat ırk 3, dokuz izolat ırk 2 (VCG 0030), bir izolat ırk 1, üç izolat non patojenik (VCG 0031) ve altı izolat ırk 2 (VCG 0035) olarak belirlenmiştir. RFLP tekniği de, VCG çalışmasından elde edilen sonuçlara benzerlik göstermiştir. Ayrıca rDNA'nın IGS analizi ile bu izolatlara ait 5 IGS RFLP haplotipi tanımlanmıştır (Cai ve ark., 2003).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

Survey Alanı

Survey çalışmaları, 2002 yılı Mayıs-Ekim ayları arasında, Doğu Akdeniz Bölgesi'nde, Adana ilinin Merkez, Yüreğir, Ceyhan, İmamoğlu ve Kozan ilçeleri ile, Mersin ilinin Merkez, Tarsus, Aydıncık, Gülnar ve Silifke ilçelerinde patlıcan yetiştiriciliği yapılan sera, yüksek tünel ve açık alanlarda yapılmıştır.

Patojenin İzolasyonu, Patojenite ve Çeşit Reaksiyonu Çalışmalarında Kullanılan Materyal

Survey çalışmaları sırasında örneklenen patlıcan bitkilerinden izole edilen *Fusarium* türleri, çalışmanın materyalini oluşturmuştur.

İzolasyon ve tanı çalışmalarında, PDA ve CDA ortamları, petri kapları ve sıcaklık kontrollü inkübatörler kullanılmıştır.

Patojenite ve çeşit reaksiyonu denemelerinde, Pala, Faselis $F_{1,}$ İrena $F_{1,}$ Kemer ve Adana Topağı çeşitleri, kum-toprak-perlit-torf karışımı, plastik saksılar (13x15 cm) kullanılmıştır.

Deneme süresince bitkiler sıcaklık, ışık ve nem kontrollü klima odasında muhafaza edilmiştir.

Dayanıklılığın Uyarılması Çalışmalarında Kullanılan Materyal

Saksı ve arazi denemeleri şeklinde yürütülen çalışmalarda, dayanıklılık uyarıcı olarak, Actigard 50WG (Acibenzolar-S- methly; ASM) "Benzo (1,2,3) thiabendazole-7-carbothioic asit 5-methyl ester" ve patlıcanda patojen olmayan kavunda patojen olan, *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*'in 1,2 no'lu ırkı (FOM) kullanılmıştır. FOM Dr. S. Yücel[1]'den temin edilmiştir.

Dayanıklılığın uyarıldığı bitkilerden elde edilen ekstraktların, patojenin konidi çimlenmesine etkisinin belirlendiği çalışmalarda, stereo mikroskop, oküler

[1] Zirai Mücadele Araştırma Enstitüsü Fitopatoloji Laboratuvarı, ADANA

mikrometre, Czapek Dox besi ortamı, havan ve havan eli, etanol, kloroform, petri kabı (9 cm), inkübatör, lam, lamel ve kurutma kağıdı kullanılmıştır. Bu bitkilerde lignin oluşumunun belirlenmesi çalışmalarında ise, floroglusinol (Merck), metanol, kloral hidrat (Merck), HCl, gliserol, lam ve lamel, faz kontrast mikroskop, renkli polaroid film materyal olarak kullanılmıştır.

Saksı denemeleri, klima odasında, arazi denemeleri ise, Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü, Araştırma ve Uygulama Çiftliği ile Mersin ili Tarsus ilçesi, Kulak köyünde üretici yüksek tünelinde yürütülmüştür.

RAPD-PCR Çalışmalarında Kullanılan Materyal

RAPD-PCR çalışmalarının materyalini, Fom izolatlarına ait DNA'lar, Taq polimeraz, dNTP'ler (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), Rnase inhibitör ve 2X PCR Master mix (Promega) ve primerler (tek iplikli oligonükleotid'ler) materyal olarak kullanılmıştır. Nükleik asitlerin amplifikasyonunda TECHNE (Cambridge) GENIUS marka DNA Thermal Cycler cihazı kullanılmıştır.

Fom izolatlarına ait DNA'ların elde edilmesi amacıyla yapılan izolasyon çalışmalarında, lysis buffer, potasyum acetate, fenol-kloroform-isoamylalkol, kloroform-isoamylalkol, Rnase, etanol, PEG solüsyonları, mikrosantrifüj tüpleri, otomatik pipet ve pipet uçları ve UV spektrofotometre (Shimadzu 260) kullanılmıştır.

PCR çalışmaları sonucunda amplifiye edilmiş DNA'lar, agaroz jel elektroforez çalışmalarının materyalini oluşturmuştur. PCR ürünlerinin ayrıştırılmasında, agaroz, TBE buffer, DNA Marker (Promega), reaksiyon ürünü, yükleme tamponu (Loading), Agaroz jel tankı (Bio Rad Power) ve güç kaynağı kullanılmıştır. Jeldeki DNA bantlarının görüntülenmesinde ethidium bromid, UV Transilluminatör (Vilber Lourmat), kamera (MP4 Land, USA) polaroid pozitif/negatif film kullanılmıştır.

Fom izolatlarının birbirleriyle genetik yakınlıklarının hesaplanmasında Populasyon Genetik Analiz Programı (POPGENE v1.32) kullanılmıştır.

3.2. Metod

3.2.1. Patlıcan Ekim Alanlarında Fusarium Solgunluk Hastalığı Surveyi

Survey çalışmaları, 2002 yılı Temmuz-Eylül ayları arasında, Adana ili Merkez, Yüreğir, Ceyhan, Kozan ve İmamoğlu ilçelerinde açık alan patlıcan tarlalarında, Mersin ilinin ise Merkez, Tarsus, Aydıncık, Gülnar ve Silifke ilçelerinde açık alan, sera ve yüksek tünellerde Nisan-Haziran ayları arasında solgunluk hastalığı simptomlarının en karakteristik gözlendiği meyve-hasat döneminde yapılmıştır.

Adana ve Mersin illerinde survey yapılan ilçelerde, sera ve tünellerde aşağıda belirtilen örnekleme yöntemine göre patlıcan bitkileri solgunluk simptomları yönünden değerlendirilmiştir.

0,5 dekara kadar olan sera ve tünelde 3 ayrı noktadan,
0,5-1 dekarlık sera ve tünelde 5 ayrı noktadan,
1-5 dekarlık sera ve tünelde 8 ayrı noktadan,
5-10 dekarlık sera ve tünelde 10 ayrı noktadan,
10 dekardan büyük sera ve tünelde 15 ayrı noktadan olmak üzere her noktada 10'ar bitki değerlendirmeye alınmıştır.

Daha geniş yetiştiricilik alanına sahip açık alanda yetiştiricilik yapılan patlıcan tarlalarında ise, aşağıdaki örnekleme yöntemine göre bitkiler solgunluk simptomları yönünden incelenmiştir.

1-5 dekarlık tarlada 5 ayrı noktada,
5-10 dekarlık tarlada 8 ayrı noktada,
10-20 dekarlık tarlada 10 ayrı noktada,
20-50 dekarlık tarlada 15 ayrı noktada,
50 dekardan büyük tarlada 20 ayrı noktadan olmak üzere her noktada 10'ar bitki değerlendirilmiştir.

Gözlem yapılan bu alanlarda, Fusarium solgunluk hastalığının simptomlarının derecelendirilmesinde, Wilhelm ve ark. (1974)'in 0-4 skalası modifiye edilerek kullanılmıştır. Bu skala aşağıda verilmiştir.

0: Gözle görülebilir hastalık simptomu yok
1: Solgunluk başlangıcı, alt yapraklarda ince damarlarda renk açılması
2: Bitkinin yarısında solgunluk, klorosis ve nekrosis
3: Genel solgunluk, yapraklarda kuruma, dökülme ve uçlardan geriye ölüm
4: Bitkinin yarısı veya çoğunda kuruma ve ölüm

Her bir tarla için, "Ağırlıklı Ortalama" ile hastalık oranı (%) ve Tawsend-Heuberger formülü kullanılarak skala değerleri üzerinden de hastalık şiddeti (%) hesaplanmıştır (Bora ve Karaca, 1970; Karman, 1971). Daha sonra ilçe düzeyinde hastalık yayınlığı ve şiddeti belirlenmiştir. Hastalık yaygınlığı açısından inceleme yapılan tarlada, tek bir bitkide solgunluk simptomu görülse bile o tarla bulaşık olarak değerlendirilmiştir.

Surveyler sırasında, solgunluk simptomu gösteren patlıcan bitkilerinin dallarından temiz bir budama makası ile izolasyonda kullanılmak üzere, 15-20 cm uzunluğunda dal örnekleri alınarak plastik poşetlere konulmuş ve tüm örnekler buz kutularında korunarak laboratuvara getirilmiştir. Fusarium ve Verticillium solgunluğu hastalıklarının yaprak ve vasküler renklenme simptomlarının birbirine çok benzer olması incelemeler sırasında karar vermede bazı güçlükler oluşturmuştur. Bu nedenle simptomatolojik olarak karar verilemeyen solgun bitkilerden de örnekler alınarak laboratuvara getirilmiş ve patojen tespiti için izolasyonlar yapılmıştır. Surveyler sırasında izolasyon için yeterli oranda bitki alınmış ve her tarladan seçilen her bir bitkiden izole edilen *Fusarium* sp. ayrı bir izolat olarak değerlendirilmiştir.

Ayrıca survey yapılan tarlalarda, patlıcan yetiştiriciliğinde hangi çeşidin tercih edildiği, bir sezonda atılan gübre çeşidi ve miktarı, bir önceki yıl hangi bitkinin yetiştirildiği, üründe görülen yabancı otlar, dikim tarihi, ekim alanı gibi bilgiler kaydedilmiştir.

3.2.2. Patojenin İzolasyonu ve Patojenite Çalışmaları

Laboratuvara getirilen solgunluk simptomu gösteren patlıcan bitkilerinin dallarından enine kesitler alınarak, iletim demetlerinde kahverengileşmenin gözlendiği kısımlardan standart mikolojik yöntemlere göre izolasyonlar yapılmıştır.

Bu amaçla, hastalıklı dalların floem dokusu ayrılmış ve infeksiyon nedeniyle nekrozlaşmış ve sağlam dokuları içeren ksilem dokusundan temiz bir bistüri ile 2-3 mm'lik kesitler alınmıştır. Daha sonra bu doku parçaları % 1'lik Sodyum Hipoklorit (NaOCl) solüsyonunda 2-3 dak bekletilerek yüzey sterilizasyonu yapılmıştır. Sodyum hipoklorit çözeltisinden alınan bu parçalar, iki kez steril distile sudan geçirilerek NaOCl kalıntısı uzaklaştırılmış ve dokulardaki fazla suyun giderilmesi amacıyla steril kurutma kağıtları üzerine aktarılmıştır. Kurutulan parçalar, streptomycin (100 µg/ml) içeren Patates Dekstroz Agar (PDA) ortamına ekilmiştir. İnokule edilen petri kapları 24 ºC'de bir hafta süreyle inkübe edilmiş ve daha sonra gelişen *Fusarium* kolonilerinden saflaştırmalar yapılmıştır.

Saflaştırılan kolonilerin tek spor izolasyonu için öncelikle *Fusarium* konidilerinin çimlendirileceği su agar (% 2) hazırlanarak 9 cm çapındaki petrilere dökülmüştür. Daha sonra *Fusarium* sp.'nin 10 ml steril distile su içerisinde konidi süspansiyonu hazırlanmış ve mikroskopta incelenerek 4x10 µm görüş alanında 1-10 konidi olacak şekilde konsantrasyon ayarlandıktan sonra, su agar içeren petrilere yüzeyi kaplayacak şekilde (1 ml) cam bagetle yayılmıştır. Petriler 25 °C'de 16-24 saat inkübe edildikten sonra mikroskopta incelenerek çimlenen yakınında başka spor bulunmayan konidiler işaretlenmiş ve hemen ardından steril iğne yardımıyla alınarak PDA içeren ortama ekilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda tek spordan gelişen koloniler eğik PDA ortamı içeren tüplere aktarılmış ve sonraki aşamalarda kullanılmak üzere 4 °C'de saklanmıştır.

Mikroskobik incelemelerle tek spordan saf olarak gelişen izolatların, koloni rengi, mikrosklerot varlığı, konidiofor, fialid ve konidi özellikleri incelenerek *Fusarium* kolonilerinin tür tanımı yapılmıştır (Booth 1971; Nelson ve ark., 1983; Windels, 1992; Summerel ve ark., 2001).

Fusarium izolatlarının patojeniteleri, Biles ve Martyn (1989)'in yöntemine göre konukçusu olan patlıcan fidelerine kök daldırma yöntemi ile testlenmiştir. Bu amaçla, açıkta yetiştiricilikte tercih edilen, Fusarium solgunluğuna duyarlı "Pala" patlıcan çeşidi kullanılmıştır. Her bir tarladan elde edilen izolatlardan rastgele seçilen bir tanesi ile inokulasyon yapılmıştır. Deneme başlangıcında tohumların çimlendirildiği kum, toprak, perlit ve torf (1:2:1:2) karışımından oluşan toprak, 5 L'lik teneke kutularda 30 dak otoklav edilip 25x35 cm çapındaki plastik küvetlere konulmuş ve patlıcan tohumları bu şekilde hazırlanan küvetlere ekilmiştir. Tesadüf parselleri deneme desenine göre 10 tekerrürlü olarak kurulan denemede bitkiler, 25 ºC sıcaklık, 16 saat aydınlanma süresi ve % 70 nem koşullarına sahip, Bitki Koruma Bölümü klima odasında yetiştirilmiştir. Fideler, 8-10 cm boylandıklarında, bu küvetlerden köklere zarar verilmeden sökülmüş ve bu kökler çeşme suyunda yıkanarak uçları temiz bir makasla hafifçe kesilmiştir. Daha sonra bu kökler izolatların inokulum süspansiyonuna 5 dak süreyle daldırılmıştır. Fungal inokulum aşağıda belirtilen şekilde hazırlanmıştır.

PDA ortamında geliştirilen fungusun 8-10 günlük taze kültürlerinin üzerine 50 ml steril distile su dökülerek spatülle kazınmış ve sporların suya geçmeleri sağlanmıştır. Bu spor süspansiyonu iki kat steril tülbentten geçirilerek miselyum kalıntıları süspansiyondan uzaklaştırılmıştır. Daha sonra hazırlanan bu süspansiyondaki sporlar, Thoma lamında (hemocytometre) sayılarak konsantrasyonları 10^6 konidi/ml'ye ayarlanmıştır. Etmenin bu şekilde hazırlanan konidi süspansiyonuna bitkilerin kökleri daldırılmış ve 5 dak süreyle bekletilmiştir. Kontrol bitkilere de aynı işlem yapılmış ancak spor süspansiyonu yerine steril distile suya daldırılmıştır. İnokulasyondan sonra patlıcan fideleri, steril kum, toprak, perlit ve torf (1:2:1:2) karışımı içeren 13 cm çapındaki plastik saksılara şaşırtılmıştır. Deneme süresince patlıcan bitkileri son hastalık değerlendirmesi yapılana kadar, kontrollü koşullarının sağlandığı klima odasında muhafaza edilmiştir. İnokulasyondan 3 hafta sonra bitkiler hastalık gelişimi yönünden Bölüm 3.2.1'de belirtilen skalaya göre derecelendirilmiştir. Ayrıca solgunluk gelişimi değerlendirilen bu bitkilerin iletim demetlerinde kahverengileşme simptomları da değerlendirilmiştir. İnokulasyondan sonra bitkinin üst kısmına doğru iletim demetini

infekte edebildiği uzaklığı belirlemek için bitki gövde kısmından kesilerek, nekrozun ulaştığı en son nokta ölçülerek (cm) kaydedilmiştir.

Deneme sonuçlandırıldığında, *F. oxysporum* f. sp. *melongenae* (Fom) izolatları tarafından patlıcan bitkilerinin infeksiyonunun doğrulanması amacıyla, "Koch postülatları" uygulanmıştır.

3.2.3. Fom İzolatlarının Makroskobik ve Mikroskobik Tanısı

Bu amaçla yapılan çalışmalarda, Adana ve Mersin yöresi patlıcan ekim alanlarından elde edilen toplam 47 *F. oxysporum* f. sp. *melongenae* (Fom) izolatından, farklı yöreleri temsil edecek şekilde 20 tanesi seçilerek kullanılmıştır. Daha sonra yapılan RAPD-PCR çalışmalarının maliyetinin yüksek olması, bu izolatların sayısında kısıtlama yapılmasını gerektirmiştir.

Öncelikle bu izolatların PDA ortamında optimum gelişme sıcaklıkları belirlenmiştir. Bu amaca yönelik olarak, *Fusarium* izolatları PDA ortamında 24 ºC'de bir hafta süreyle geliştirilmiş ve Fom'un fungal miselyumunu içeren 5 mm çapında diskler kesilerek 15 ml PDA ortamı içeren 9 cm çapında petri kaplarının merkezine inokule edilmiştir. *Fusarium* izolatlarının her biri için 8 petri kabı kullanılmıştır. Bu şekilde hazırlanan petriler sıcaklık kontrollü inkübatörlerde 20 °C, 25 °C ve 30 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresince 3., 6., 9. ve 12. günlerde petrilerdeki koloni çapları (cm) ölçülerek kaydedilmiş ve makroskobik ve mikroskobik incelemelerle koloni özellikleri belirlenmiştir (Booth, 1971; Nelson ve ark., 1983; Summerel ve ark., 2001).

Daha sonra bu izolatların PDA ve CDA ortamında koloni gelişimleri belirlenmiştir. Bu amaca yönelik olarak, PDA ortamında geliştirilen her bir Fom izolatının, fungal miselyumunu içeren 5 mm çapında diskler kesilerek, 15 ml PDA ve CDA ortamı içeren 9 cm çapında petri kaplarının merkezine inokule edilmiştir. *Fusarium* izolatlarının her biri için 10 petri kabı kullanılmıştır. Bu şekilde hazırlanan petriler 25 °C sıcaklıkta, 10 gün süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda petrilerin koloni çapları (cm) ölçülerek kaydedilmiştir. Ayrıca, makroskobik ve mikroskobik incelemelerle de bu izolatların koloni özellikleri belirlenmiştir (Booth, 1971; Nelson ve ark., 1983; Summerel ve ark., 2001).

3.2.4. Acibenzolar-S-Methyl (ASM)'nin Fom'un Miseliyal Gelişimine Etkisi

Bu çalışmada ve dayanıklılığın uyarılması çalışmalarında, patojenite denemeleri sonucunda virulensliği yüksek bulunan *F. oxysporum* f. sp. *melongenae*'nın 10 no'lu izolatı (Fom 10) kullanılmıştır. ASM'nin önerilen konsantrasyonunun yarısı ve iki katı konsantrasyonlarının, Fom'un miseliyal gelişimine ve miseliyal kuru ağırlığına etkisi araştırılmıştır.

Bu amaçla, 250 ml'lik erlenlere 100'er ml'lik Patates Dekstroz Agar (PDA) ortamı hazırlanarak otoklav edilmiş ve bu ortamların su banyosunda, 60 °C'ye kadar soğumaları sağlanmıştır. Daha sonra belirlenen ASM konsantrasyonları ortamlara ilave edilerek, ASM'nin homojen dağılması için iyice çalkalanmış ve 9 cm'lik steril petri kaplarına dökülerek ortamın katılaşması beklenmiştir. Fom 10'un 8-10 günlük taze miseliyal kültüründen, 5 mm'lik diskler kesilerek, her petrinin ortasına bir adet inokule edilmiş ve bu petriler, 25 °C sıcaklıkta 8 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Deneme 8 tekrarlı olacak şekilde kurulmuştur. ASM içermeyen ortama inokule edilen Fom 10 petrileri kontrol olarak kabul edilmiştir. İnkübasyon süresi boyunca, gelişen Fom kolonilerinin çapları günlük olarak ölçülerek, mm cinsinden kaydedilmiştir.

ASM'nin, sıvı ortamda Fom 10'un miselyum kuru ağırlığı üzerine olan etkisi, Patates Dekstoz (PD) sıvı ortamda belirlenmiştir. Bunun için, 250 ml'lik erlenlere 100'er ml PD sıvı ortam hazırlanarak otoklav edilmiştir. ASM'nin belirlenen uygulama konsantrasyonları, otoklav edilen bu sıvı ortama ilave edilmiş ve hemen sonrasında Fom 10'un taze miseliyal kültüründen 10^6 konidi/ml konsantrasyonda hazırlanan spor süspansiyonundan 5 ml her bir erlene inokule edilmiştir. Bu şekilde hazırlanan ortamlar rotary shaker'a yerleştirilmiş ve 120 rpm'de (devir/dak), 25 °C sıcaklıkta ve karanlık koşullarda iki hafta süreyle inkübe edilmiştir. Deneme, her karakter için üç tekrarlı olacak şekilde kurulmuş ve sadece spor süspansiyonu ilave edilmiş sıvı ortamlar, kontrol olarak kabul edilmiştir.

Sıvı kültürde gelişen fungal miselyumun kuru ağırlığının belirlenmesi için, sıvı ortamlar bucher hunisinde filtre edilmiş ve Fom'un misellerini içeren filtre

kağıtları, 45 °C'de 12 saat kurutulmuştur. Kurutulan miselyumlu filtre kağıtları hassas terazide tartılarak kaydedilmiştir. Tartım sonunda elde edilen değerlerden filtre kağıtlarının boş ağırlıklarının çıkarılmasıyla miselyum net ağırlıkları hesaplanmıştır.

3.2.5. Farklı Patlıcan Çeşitlerinin Fusarium Solgunluk Hastalığına Reaksiyonu

Doğu Akdeniz Bölgesi'nde yaygın olarak yetiştiriciliği yapılan Faselis ve İrena F_1 hibrit çeşitleri ile lokal çeşitlerden Pala, Kemer, Adana Topağı çeşitleri kullanılmış ve deneme tesadüf parselleri deneme desenine göre 4 tekerrürlü olarak kurulmuştur. Yukarda belirtilen patlıcan çeşitlerinin yetiştirilmesi, patojen inokulasyonu ve hastalık değerlendirmesi, patojenite çalışmaları Bölüm 3.2.2'de belirtilen yönteme göre yapılmıştır.

3.2.6. Patlıcanda Fusarium Solgunluğuna Karşı Dayanıklılığın Uyarılması Çalışmaları

Patlıcanda Fusarium solgunluğuna karşı saksı denemeleriyle dayanıklılığın uyarılması çalışmalarında da, virulensliği yüksek Fom 10 izolatı ve solgunluk hastalığına duyarlı ‘‘Pala’’patlıcan çeşidi (*Solanum melongena* L.) kullanılmıştır. Bu amaca yönelik olarak, dayanıklılık uyarıcı abiyotik bir faktör olduğu bilinen, sentetik bir uyarıcı olan Actigard 50WG (acibenzolar-S-methyl; ASM) ve biyotik bir faktör olarak da, patlıcanda patojen olmayan kavunda patojen olan *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* (FOM) uygulanmıştır.

ASM (Bion® Syngenta, Frankfurt, 50WG), 0.2 mg/ml konsantrasyonda steril distile su içinde çözünmüş ve her bir patlıcan fidesine 200 µl spreylenmiştir (Kang ve Buchenauer, 2001; Baysal ve ark., 2003). Deneme, tesadüf parselleri deneme desenine göre 3 tekrarlı olarak kurulmuş ve her karakter için 10 bitki kullanılmıştır. ASM uygulanan bitkilerde SAR mekanizmasının tetiklendiği optimum zaman aralığını belirlemek için ASM uygulanan bu bitkilere uygulamadan sonraki 1., 2., 3. ve 4. günlerde patojen inokulasyonu yapılmıştır (Louws ve ark., 2001; Kang ve Buchenauer, 2001; Bokshi ve ark., 2003; Baysal ve ark., 2003). Fom 10

inokulasyonu ve hastalık değerlendirmesi, Bölüm 3.2.2.'de patojenite denemelerinde sözü edilen yönteme göre yapılmıştır.

Patojen olmayan FOM inokulasyonu için *F. oxysporum* f. sp. *melonis*'in 10^6 konidi/ml spor süspansiyonuna bitkilerin kökleri 5 dak süreyle daldırılmıştır. İnokulasyondan sonraki 1., 2., 3. ve 4. günlerde patojen (Fom 10) inokulasyonu yapılmıştır (Dickinson ve Lucas, 1982; Erzurum ve Maden, 1995; Fuchs ve ark., 1997). Sonuçların güvenilirliği açısından, saksı denemeleri iki kez kurulmuştur.

3.2.6.1. Dayanıklılığın Uyarıldığı Bitkilerden Elde Edilen Ekstraktların Fom'un Konidi Çimlenmesi Üzerine Etkisi

Bu amaca yönelik olarak, SAR mekanizmasının uyarılmasında en etkin olan zaman aralığındaki bitkilerden kök, gövde ve yaprak örnekleri alınmıştır. Bu bitkilerin ekstraktlarını elde etmede kullanılan yöntem aşağıda verilmiştir.

1. Pozitif kontrol, negatif kontrol, ASM ve FOM uygulanan bitkilerin kök, gövde ve yapraklarından 5'er g bitki örneği alınmış ve bu örnekler alüminyum kağıtlara sarılarak ekstraksiyon işlemi yapılana kadar -18 °C sıcaklıkta bekletilmiştir.

2. Ekstraksiyon için bitki dokuları porselen havanda, 9 kat hacimde etanol ilave edilerek ezilmiş daha sonra bu süspansiyon 4 katlı tülbentten geçirilerek doku kalıntıları uzaklaştırılmıştır. Süzülen sıvıdan petrilere eşit oranlarda pipetlenmiş ve hacim olarak % 90 azalana kadar 35 °C sıcaklıkta buharlaştırmaya bırakılmıştır.

3. Kalan konsantre bitki ekstraktının üzerine eşit hacimde kloroform ilave edilerek 6000 devir/dak da 10 dak santrifüj edilmiştir. Daha sonra mikrosantrifüj tüplerinde pelletin üzerinde oluşan bitki ekstraktı mikropipetle başka bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılmış, aynı işlem ikinci kez tekrar edilmiş ve elde edilen ekstrakt kullanılıncaya kadar -18 °C'de bekletilmiştir (Grinstein ve ark., 1984).

4. Her bir karaktere ait ekstrakttan 50 µl alınarak, steril lam üzerine damlatılmış ve bu lamlar 35 °C sıcaklıkta bekletilerek ekstraktların tamamen buharlaşması sağlanmıştır.

5. Buharlaşma işlemi tamamlandıktan sonra, Czapek Dox sıvı ortamında Fom 10'un konidi süspansiyonu (10^6 konidi/ml) hazırlanmış ve bu süspansiyondan

50 µl alınarak daha önce bitki ekstraktının damlatılıp buharlaştırıldığı bölgeye pipetlenmiştir.

6. Bu şekilde hazırlanan lamlar, içerisinde ıslak kurutma kağıdı bulunan petri kutularına yerleştirilerek 27 °C sıcaklıkta 9 saat süre ile inkübe edilmiştir.

Czapek Dox sıvı besi ortamında çimlendirilen sporlar, bir saat aralıklarla incelenmiş ve bu sporların çim borucuklarının birbirlerine karışmadan ölçülebileceği süre olarak 9 saat belirlenmiştir. İnkübasyon süresi sonunda, çimlenen konidilerin çim borusu uzunlukları ölçülerek kaydedilmiştir. Deneme 5 tekrarlı kurulmuş, her bir petri kabı bir tekrar olarak kabul edilmiş ve mikroskoptaki tek görüş alanında 10 adet çim tüpü uzunluğu, toplam olarak da 3 farklı görüş alanında, 30 adet çim tüpü uzunluğu ölçülerek kaydedilmiştir. Denemede negatif kontrol bitkilerinin ekstraktların spor çimlenmesine etkinliğinin belirlenmesinin yanı sıra, kontrol amacıyla Czapek Dox besi ortamında çimlendirilen konidilerin çim tüpü uzunlukları da ölçülerek diğerleriyle karşılaştırılmıştır.

3.2.6.2. Histokimyasal Boyamalarla Lignin Sentezinin Belirlenmesi

Dayanıklılığın uyarıldığı bitkilerde infekteli dokularda infeksiyon ve reaksiyon yerlerinde sentezlenen lignin, floroglusinol/HCl testi ile belirlenmiştir. ASM ve FOM uygulaması yapılan bitkiler saksılardan kök bölgesi zararlandırılmadan çıkarılarak çeşme suyunda yıkanmıştır. Bu bitkilerin kök ve gövdelerinden steril bir bistüri ile 3-5 mm uzunluğunda, yapraklarından ise 5 mm çapında kesitler alınmıştır. İnfekteli dokulardaki klorofiller, % 1 phloroglucinol (Merck) içeren % 100'lük metanol içerisinde, oda sıcaklığında 1 gece bekletilerek uzaklaştırılmıştır. Daha sonra beyazlaşan doku örnekleri, kloral hidrat (2.5 g/ml) içerisinde en az 24 saat bekletilerek dokular şeffaflaştırılmış ve temizlenmiştir. Metanol yardımıyla klorofil uzaklaştırılmış ve kloral hidrat (Merck) ile temizlenmiş dokular steril bir lam üzerine alınarak, üzerine 1-2 damla konsantre HCl ilave edilerek 10 dak bekletilmiştir. Daha sonra bu dokuların üzerine bir kaç damla % 50'lik gliserol çözeltisi damlatılmış ve lamel kapatılarak bu şekilde hazırlanan prepatlar incelenmiştir. İnfekteli dokuların üzerine HCl eklendikten ortalama 10 dak sonra, ligninlenmiş yapılar koyu pembe-turuncu renk bir oluşturmaktadır. Boyanmış

dokuların 3-5 saat sonra renklerini kaybetmeleri nedeniyle preparatlar, mümkün olduğunca kısa bir süre içerisinde, Faz kontrast mikroskopta 20X ve 40X büyütmede incelenerek görüntü alınmıştır (Gahan 1984; Vallet ve ark., 1996; Soylu, 1999). Aynı işlemler pozitif ve negatif kontrol bitkileri için de yapılmıştır.

3.2.7. Arazi Denemeleri

Saksı denemelerinde etkinlikleri denenen dayanıklılık uyarıcıların arazi koşullarında da etkinlikleri değerlendirilmiştir. Bu amaca yönelik olarak, Mersin ilinin Tarsus ilçesine bağlı Kulak Köyünde Ocak-Temmuz ayları arasında üretici yüksek tünelinde (18.0 x 3.80 m) Faselis F_1 patlıcan çeşidiyle ve Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Araştırma ve Uygulama Çiftliği'nde (30 m x 25 m), Nisan-Ekim ayları arasında Pala patlıcan çeşidiyle deneme kurulmuştur. Tesadüf blokları deneme desenine göre 5 tekerrürlü olarak olarak kurulan denemede her karakter için 20 bitki kullanılmıştır. Saksı denemelerinde patojen inokulasyonunda kullanılan Fom 10 izolatı, arazi denemelerinde de kullanılmıştır. Dayanıklılık uyarıcı olarak ASM (Novartis Crop Protection, Inc., Basel Switzerland), üretici firmanın önerdiği şekilde ve konsantrasyonda, şaşırtmayla birlikte 15 gün aralıklarla yeşil aksama püskürtme şeklinde maksimum 6 kez uygulanmıştır (Louws ve ark., 2001; Bokshi ve ark., 2003). Bitkiler büyüdükçe ASM konsantrasyonu, aktiviteyi sağlamak için belirtilen oranlarda artırılmış ve son uygulama ile hasat arasında 14 gün bırakılmıştır. Üretici firmanın önerdiği ASM uygulama prosedürü Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Şaşırtmayı izleyen haftalara göre alana atılması gereken ASM miktarı

ASM miktarı (g/da)	Alana ASM'li su miktarı (L/da)	Şaşırtmayı izleyen haftalar
2.3	29-48	0-2
3.5	57-67	3-4
5.3	67-95	5-8

ASM uygulanan bitkiler 25-30 cm boylandıklarında patojen (Fom 10), sağlıklı kontrol hariç bütün bitkilere buğday inokulumu şeklinde kök bölgesi açılan her bitkiye 10 g inokule edilmiştir.

FOM, sentetik sıvı ortam içerisinde geliştirilmiştir. FOM'un geliştirildiği sentetik sıvı ortam içeriği Lecoq ve ark. (1991)'na göre hazırlanmıştır (Ek 1). Tüm eriyiklerin dahil olduğu sentetik sıvı ortam 250 ml'lik erlenlere 100'er ml konularak otoklav edilmiştir. FOM'un 24 °C'de geliştirilen 8-10 günlük kültürlerinden 3-4 mm çapında diskler kesilerek 4-5 disk bu erlenlerin içine konulmuştur. Erlenler pamuk ve alüminyum folyo ile sıkıca kapatılarak, rotary shaker'da, 120 rpm'de, 24 °C sıcaklık ve aydınlık koşullarda 8 gün süreyle çalkalanmıştır. Bu süre sonunda fungus konidi üretiminden çok klamidospor oluşturmaya yönelmiştir. Bitkiler 25-30 cm boylandıklarında, bu süspansiyon 10^6 spor/ml dilüsyon oranında seyreltilmiş ve patojen inokulumu verilmeden 3 gün önce uygulanmıştır. Bunun için, bitkilerin kök bölgesi kürek yardımıyla açılmış ve her bitkiye 200 ml sulama suyu şeklinde verilerek köklerin üzeri kapatılmıştır.

ASM ve FOM uygulanan bitkilerde patojenin bitkinin üst kısmına doğru iletim demetinde infekte edebildiği son noktayı belirlemek için, patojen inokule edildikten bir hafta sonra, 10 gün aralıklarla, deneme sonuçlandırılana kadar yaprak örnekleri alınmıştır. Bunun için, her blokta 2 bitki belirlenmiş ve kök boğazının hemen üstünden her 5 cm'den bir yaprak örneği alınmıştır. Bu örnekler kağıtlara sarılarak laboratuvara getirilmiş ve yaprak sapından izolasyonlar yapılarak patojenin infeksiyon hızı belirlenmeye çalışılmıştır. Ayrıca denemedeki bitkiler, Bölüm 3.2.1'de belirtilen skalaya göre yaprak ve dal simptomları açısından değerlendirilmiştir. Deneme sonuçlandırıldığında, ASM ve FOM'un patlıcan bitkisinin gelişimine etkisini belirlemek amacıyla, denemedeki bitkilerin boyları ölçülerek (cm) kaydedilmiştir. Deneme süresince normal yetiştiricilik işlemleri uygulanmıştır. Gübreleme programı olarak, şaşırtma sırasında açılan çukurlara 18-46 DAP (Diamonyum Fosfat) çiftlik gübresiyle birlikte verilmiştir. Şaşırtmadan bir ay sonra, sulamadan hemen önce üre uygulanmıştır. Sonraki dönemlerde üç aşamalı olarak 50 kg amonyum sülfat ve 10 kg potasyum sülfat gübreleri sulamadan önce verilmiştir (Şeniz, 1992).

3.2.8. Fom İzolatlarının Moleküler Karakterizasyonu

3.2.8.1. Fom İzolatlarından DNA İzolasyonu

Fom izolatları arasındaki genetik varyasyonu belirlemede, Randomly Amplified Polimorphic DNA (RAPD) analiz tekniği kullanılmıştır. Ayrıca çalışmaya kontrol amacıyla, patlıcanda patojen olmayan kavunda patojen olan *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*'in 0 no'lu ırkı (FOM-0) da dahil edilmiştir.

Bu çalışmada öncelikli olarak, fungusun misellerinden total genomik DNA izolasyonu yapılmıştır. Bunun için, Fom izolatlarının bir haftalık taze miseliyal kültürlerinden, 5 mm çapında miseliyal diskler kesilmiş ve yaklaşık 15 ml patates dekstroz (PD) sıvı ortam içeren 9 cm çapında petri kaplarına konulmuştur. Bu şekilde hazırlanan petri kapları karanlıkta, 25 ºC sıcaklıkta, bir hafta süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda gelişen miseliyal koloninin altındaki PD sıvı ortamı uzaklaştırılmış ve miseller steril distile suyla yıkanıp kurutma kağıtları arasında fazla suları alınmıştır. Bu şekilde hazırlanan miseller 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine aktarılmıştır. Bu tüpler DNA ekstraksiyonu yapılıncaya kadar -20 ºC'de bekletilmiştir.

Total genomik DNA ekstraksiyon çalışmaları ve RAPD-PCR çalışmaları Peever ve ark. (1999)'nın önerdiği yönteme göre yapılmıştır. Total genomik DNA izolasyon protokolü aşağıda verilmiştir;

1. Daha önce mikrosantrifüj tüplerine alınan ve -20 ºC'de bekletilen fungal miselyum, steril bir pens yardımıyla porselen havana alınmış ve üzerine bir miktar sıvı nitrojen dökülerek toz haline gelinceye kadar iyice ezilmiştir.

2. Üzerine 800 µl lysis buffer (50 mM EDTA, 100 mM Tris, % 3 SDS, 100 µg/ml proteinaz K, % 1 sodyum bisulfit) iki aşamalı olarak ilave edilerek süspanse edilmiştir. Bu şekilde süspanse edilen karışım, 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine aktarılmıştır. Bu tüpler 65 ºC'ye ayarlanmış su banyosunda, 30-45 dak bekletilmiş ve 10.000 rpm'de, 15 dak santrifüj edilerek miselyum kalıntıları mikrosantrifüj tüpünün dip kısmına çöktürülmüştür.

3. Supernatant kısmın 625 µl'si başka bir mikrosantrifüj tüpüne alınmış ve üzerine 200 µl, 8 M potasyum asetat ilave edilerek 1 dak vortekslenmiştir. Daha sonra bu tüpler, -20 ºC'de 15 dak, buzda 1 saat veya +4 ºC'de 1 gece bekletilmiştir.

4. Bu tüpler 10.000 rpm'de 20 dak santrifüj edilmiş ve supernatant kısımdan 700-800 µl alınarak (<800 µl), başka bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır. Üzerine 1 ml fenol-kloroform-isoamylalkol ilave edilerek tüpler 10.000 rpm'de 10 dak santrifüj edilmiştir.

5. Supernatant kısımdan 500-600 µl (<600), alt faza karışmamasına dikkat edilerek alınmış ve başka bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır. Alınan sıvıya eşit hacimde fenol-kloroform-isoamylalkol eklenerek, 10.000 rpm'de 10 dak santrifüj edilmiştir.

6. Supernatant, 5. aşamada olduğu gibi alınmış ve alınan sıvıya eşit hacimde bu kez kloroform-isoamylalkol ilave edilerek 10.000 rpm'de 10 dak santrifüj edilmiştir.

7. Ekstraksiyon sonrası DNA içeren supernatant kısım yeni tüpe alınmış, üzerine 35 µl, 5 M NaCl (1/10 hacim) ve 700 µl (2 hacim) % 100'lük etanol (EtOH) ilave edilip, -20 ºC'de en az bir saat bekletildikten sonra 10.000 rpm'de 10 dak santrifüj edilerek DNA'nın çökelmesi sağlanmıştır.

8. Santrifüjden sonra süpernatant kısım, pellet üzerinden dikkatlice uzaklaştırılmıştır. Daha sonra pellet 500 µl steril distile suda süspanse edilmiştir. Çözünmüş pelletin üzerine 350 µl PEG solüsyonu, "% 20 PEG (8 ml % 50 PEG, 10 ml 5M NaCl, 2 ml dH_2O)" ilave edilerek -20 ºC 'de en az bir saat veya +4 ºC'de bir gün bekletilerek proteinler vb. çökeltilmiştir.

9. Bekletilen tüpler yukarıdaki gibi santrifüj edildikten sonra 50 µl TE (10 mM Tris, pH 8 ve 1 mM EDTA) içinde süspanse edilmiş ve RNA'ları elemine etmek için RNase (20 µg/ml) konulup 37 ºC'de 3-4 saat inkübe edilerek, olası RNA bulaşıklığı giderilmeye çalışılmıştır.

10. İnkübatörden çıkan tüplere sırasıyla, 250 µl steril distile su, 30 µl 5 M NaCl ve 600 µl % 100'lük etanol (EtOH) ilave edildikten sonra tüpler hafifçe çalkalanmış ve -20 ºC'de bir saat bekletilmiştir.

11. Tüpler santrifüj edildikten sonra supernatant kısım atılıp, pellet üzerine 0,5 ml % 70'lik EtOH ilave edilerek yıkama yapılmış ve 15 sn'lik kısa bir santrifüjle EtOH tüpten uzaklaştırılmıştır. Daha sonra tekrar etanol çökelmesi yapılıp, EtOH'ın tamamen uzaklaşması için steril kabinde, DNA içeren tüplerin kapakları açık bırakılarak birkaç saat kurutulmuştur.

12. Son olarak, DNA 50 µl TE buffer içinde süspanse edilmiş ve PCR çalışmalarında kullanılmak üzere -20 ºC'de stoklanmıştır.

Fungal miselyumdan ekstrakte edilen DNA'lar % 1'lik agaroz jelde elektrofore edilmiştir.

3.2.8.2. Fom İzolatlarının DNA Konsantrasyonu ve Saflık Derecesinin Ölçülmesi

Adana ve Mersin yörelerinden izole edilen patojenik 20 izolatın saflaştırılan DNA'ları, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemiyle amplifiye edilmiştir (Sambrook ve ark., 1989; Darling ve Brickell, 1994; Arda, 1995; Öğüş, 2002; Kayrın ve ark., 2003). RAPD-PCR çalışmaları, Peever ve ark. (1999)'nın geliştirdikleri bir yöntem modifiye edilerek yapılmıştır.

Ekstrakte edilen genomik DNA'lar, TE (10 mM Tris, pH:8 ve 1 mM EDTA) buffer içerisinde sulandırılarak, izole edilen DNA'nın miktarı ve saflık derecesi belirlenmiştir. DNA konsantrasyonu, UV (Ultra Viyole) spektrofotometre (Shimadzu 260) ile ölçülmüştür. Solüsyon tarafından emilen UV miktarı, örnekteki DNA miktarı ile doğru orantılı olmaktadır. Spektrofotometrede 260 nm dalga boyundaki her absorbans değeri, 50 µg/ml çift sarmallı DNA miktarına karşılık gelmektedir. A_{260} nm'de 1 OD, 50 µg/ml DNA'ya karşılık gelmektedir. Bu değer tek iplikli DNA (ssDNA) için 33 µg/ml, RNA için ise 40 µg/ml'dir (Sambrook ve ark., 1989; Arda, 1995; Kayrın ve ark., 2003).

Bu amaca yönelik olarak, ekstrakte edilen DNA örnekleri 1/100 dilüsyon oranında steril distile su ile seyreltilerek quartz kuvetlere konulmuş ve spektrofotometrede 260 nm dalga boyundaki absorbans değerleri ölçülerek kaydedilmiştir. DNA derişim hesabında kullanılan formül aşağıda verilmiştir.

DNA derişimi (μg/ml) = OD_{260} X Seyreltme Faktörü X 50*

μg/ml = OD_{260} X 100 X 50

***1 cm ışık yollu küvette 1 OD'ye karşılık gelen μg/ml biriminden DNA miktarı

Ayrıca UV absorbans değerleri üzerinden, izole edilen DNA'ların saflık dereceleri de belirlenmiştir. 260 nm'de nükleik asitler, 280 nm'de proteinler pik vermektedir (Sambrook ve ark., 1989; Arda, 1995; Kayrın ve ark., 2003).

Saf olarak izole edilebilen bir DNA örneğinde, 260 ve 280 nm'de optimum absorbans oranı aşağıda verilmiştir.

Saf DNA için; 260 nm/280 nm = 1.8

Quartz küvetlere konulan örneklerin spektrofotometrede, hem 260 nm dalga boyundaki absorbans değerleri hem de 280 nm'deki absorbans değerleri okunmuş ve 260 nm/280 nm oranları hesaplanmıştır.

Adana ve Mersin illeri patlıcan alanlarından toplam 47 *Fusarium oxysporum* f. sp. *melongenae* (Fom)'nin izolatı elde edilmiş ve bu izolatların hepsinin total DNA'sı izole edilebilmiştir. Fom DNA örnekleri arasından, PCR çalışmaları için saf olarak izole edilebilen 20 izolat farklı bölgeleri temsil edebilecek şekilde seçilmiştir.

Ölçüm sonucunda 1.8'den düşük değerler, DNA örneğinde protein veya fenol kontaminasyonunu, 1.8'den büyük değerler ise RNA kontaminasyonunu göstermektedir. Bu oran RNA için 260 nm/280 nm = 1.8-2.0'dır (Sambrook ve ark., 1989).

3.2.8.3. Primer Seçimi

Genomik yapısı bilinmeyen mikroorganizmaların moleküler karakterizasyonunda, RAPD-PCR ve AFLP teknikleri en uygun tekniklerdir (Sambrook ve ark., 1989; Arda, 1995; Katan, 1997; Nelson ve ark., 1997). *Fusarium oxysporum* f. sp. *melongenae*'nın genomik yapısının tam olarak bilinmemesi ve günümüze kadar bu fungusa yönelik spesifik bir primerin dizayn edilmemiş olması, bu çalışmada RAPD-PCR tekniğinin tercih edilme nedeni olmuştur.

F. oxysporum'ların f. sp.'lerinin moleküler karakterizasyonu çalışmasında kullanılan primerler, literatür incelemeleri ile belirlenmiş ve 10 bazlık 10 primer bu çalışmada kullanılmıştır (Assigbetse ve ark., 1994; Chiocchetti ve ark.,1999; Vakalounakis ve Fragkiadakis 1999). Üretici bir firmaya çalışmada kullanılacak primerlerin sentez ve pürifikasyonu yaptırılmıştır. Bu primerler Çizelge 3.2'de verilmiştir. Amplifikasyonda en fazla polimorfik bant veren primerler RAPD-PCR çalışmalarında kullanılmıştır.

Çizelge 3.2. RAPD-PCR analizleri için sentezlenen primerlerin nükleotid dizilimleri ve bağlanma sıcaklıkları

Primer	Baz Dizilimi (5´3´)	Bağlanma Sıcaklığı (ºC)
OPB-01	GTTTCGCTCC	34.7
OPB-02	TGATCCCTGG	33.7
OPB-03	CATCCCCCTG	38.8
OPB-07	GGTGACGCAG	37.9
OPB-08	GTCCACACGG	37.3
OPB-14	TCCGCTCTGG	40.7
OPB-20	GGACCCTTAC	28.6
OPF-05	CCGAATTCCC	37.2
OPF-10	GGAAGCTTGG	35.1
OPE-11	GAGTCTCAGG	22.8

3.2.8.4. Amplifikasyon Sırasında Reaksiyona Girecek Bileşenlerin Optimum Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

PCR reaksiyonundaki bileşenlerin miktarları, 25 µl'lik reaksiyon hacmi için optimize edilmiştir. Reaksiyonlarda 1X polimeraz zincir reaksiyon (PCR) buffer'ı (Promega, Madison WI, USA) içeren master mix kullanılmıştır. Master mix'in bileşenlerini; 400 µM dNTPs, 50 unit/ml Taq DNA polimeraz, 3 mM $MgCl_2$ oluşturmaktadır. Amplifikasyonda bir örnek için reaksiyona girecek bileşenler, Çizelge 3.3'de belirtildiği gibi hazırlanmış ve 200 µl'lik PCR tüplerine 25 µl konulmuştur (Assigbetse ve ark., 1994; Chiocchetti ve ark., 1999; Vakalounakis ve Fragkiadakis, 1999). Reaksiyonlar steril koşullarda ve buz üzerinde hazırlanmıştır. Reaksiyon karışımını içeren PCR tüpleri, DNA Thermal Cycler [Techne (Cambridge), genius]'a yerleştirilerek cihaz programlanmıştır.

Çizelge 3.3. Amplifikasyonda bir örnek için reaksiyon bileşenlerinin oranları

Reaksiyon Bileşenleri	Stok Konsantrasyon	Alınan Miktar
DNA (kalıp)	100 ng/µl	1.0 µl
Master Mix	2X/1,25 µl	12.5 µl
Primer	100 pmol/µl	1.5 µl
Su	-	10.0 µl
Toplam	-	25.0 µl

3.2.8.5. Amplifikasyon için Thermal Cycler Cihazının Programlanması

Primer (TIB Molbiol marka, HPLC saflıkta)'in kalıp DNA'ya yapıştığı sıcaklık (anneling temperature) reaksiyonun başarısında oldukça önemli bir kriterdir. Bu nedenle, primerlerin bağlanma sıcaklığı esas alınarak, her primer için Thermal Cycler cihazında ayrı bir program yapılmıştır. Primerin bağlanması için gerekli süre ve sıcaklık, amplifikasyon primerlerinin baz içeriğine, uzunluğuna ve derişimine bağlıdır. Uygulanabilir bağlanma sıcaklığının amplifikasyon primerlerinin gerçek *T*m'sinin 5 ºC altında olduğu belirtilmiştir (Sambrook, 1989; Arda, 1995; Kayrın ve ark., 2003). Thermal Cycler cihazı programlanırken primerin bağlanma sıcaklığının birkaç derece altı esas alınmıştır (Çizelge 3.4). RAPD-PCR çalışmasında en iyi çalışan 7 primer seçilmiş ve bu primerlerin gerçek *T*m'lerini hesaplamada kullanılan formül aşağıda verilmiştir.

$$\boldsymbol{T}\mathbf{m} = 2\,(\mathbf{A} + \mathbf{T}) + 4\,(\mathbf{G} + \mathbf{C})$$

Çizelge 3.4. Amplifikasyona girecek primerlerin gerçek *T*m'lerine göre belirlenen bağlanma sıcaklıkları

Primer	Uygulanan Bağlanma Sıcaklığı (ºC)	*T*m-Bağlanma Sıcaklığı (ºC)
OPB-01	34.5	34.7
OPB-03	38.5	38.8
OPB-07	37.5	37.9
OPB-08	36.5	37.3
OPB-14	40.5	40.7
OPF-05	36.5	37.2
OPF-10	34.5	35.1

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Thermal Cycler programı aşağıda belirtildiği şekilde kurulmuştur.

1. 93 ºC'de 2 dak……..1 döngü
2. 92 ºC'de 2 dak .....
3. Primerin uygulanan yapışma sıcaklığı 1 dak ..... 40 döngü
4. 72 ºC'de 2 dak .....
5. 72 ºC'de 10 dak……..1 döngü

1. **Program** (93 ºC'de 2 dak, 1 döngü); bu aşamada hedef DNA kalıbının veya PCR ürününün denatürasyonu gerçekleşmektedir.
2. **Program** (92 ºC'de, 2 dak); çift iplikli nükleik asitteki zincirler birbirlerinden ayrılmaktadır (Denatürasyon).
3. **Program** (Primerin uygulanan yapışma sıcaklığı, 1 dak); primer hedeflenen nükleik asitte kendisine spesifik yerlere bağlanmaktadır (Anneling).
4. **Program** (72 ºC'de, 2 dak); Bu sıcaklık, DNA Taq polimeraz enziminin etkin bir şekilde çalışma sıcaklığı olup, spesifik bölgeler bağlanan primerin 5'-3'yönünde uzaması sağlanmaktadır. Bu sıcaklıkta DNA Taq polimeraz enzimi, dNTP'leri kullanarak amplifikasyonu gerçekleştirmektedir (Anneling). 2, 3 ve 4. programlar 40 kez tekrarlanacak şekilde programlanmıştır.
5. **Program** (72 ºC'de, 10 dak); son uzama, amplifikasyon sonunda çoğalan nükleik asit ipliklerinde tanımlanmayan bazı bölgeleri tanımlanması amacıyla ayarlanmıştır.

3.2.8.6. Agaroz Jel Elektroforez Çalışmaları ve DNA Bantlarının Analizi

Agaroz jel elektroforez işlemi aşağıda belirtilen sıraya göre yürütülmüştür.

1. PCR ürünleri % 2'lik agaroz jelde elektroforezle ayrıştırılmıştır. % 2'lik agaroz, 0,5X TBE (1 M Tris, buffer içerisinde M Borik Asit, 0.02 M Na_2 EDTA) içerisinde hazırlanmıştır.

2. Agaroz TBE buffer karışımı agaroz eriyinceye kadar mikrodalga fırında kaynatılmıştır. Kaynamadan dolayı olacak kayıplar göz önünde bulundurularak, TBE buffer kaynatılmadan önce işaretlenmiş ve kayıp kısım aynı bufferla tamamlanmıştır.

3. Agaroz jel tankı (Bio Rad)'nın tarakları yerleştirilmiş ve buffer 60 °C'ye kadar soğutulduktan sonra 15 x 15 cm tank içerisine dökülmüştür.

4. Jel donduktan sonra taraklar çıkarılmıştır. Daha sonra jelin üzerini 1-2 mm kaplayıncaya kadar 0,5 X TBE buffer ilave edilmiştir.

Amplifiye olan ürün, DNA Marker (Promega, 1kb DNA Ladder, 100 μg/ml)'la paralel olacak şekilde jeldeki boşluklara yüklenmiştir. Bu amaca yönelik olarak, 1 hacim yükleme tamponu (Loading), 5 hacim reaksiyon ürünü jeldeki boşluklara pipetlenmiştir. Kontrol amacıyla patlıcanda patojen olmayan *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*'in 0 no'lu ırkı da (Fom-0) elektroforez işlemine dahil edilmiştir. Jel tankı güç kaynağına (Bio-rad Power Pac 300) bağlanarak, 1 saat süreyle 150 V elektrik akımı verilmiştir.

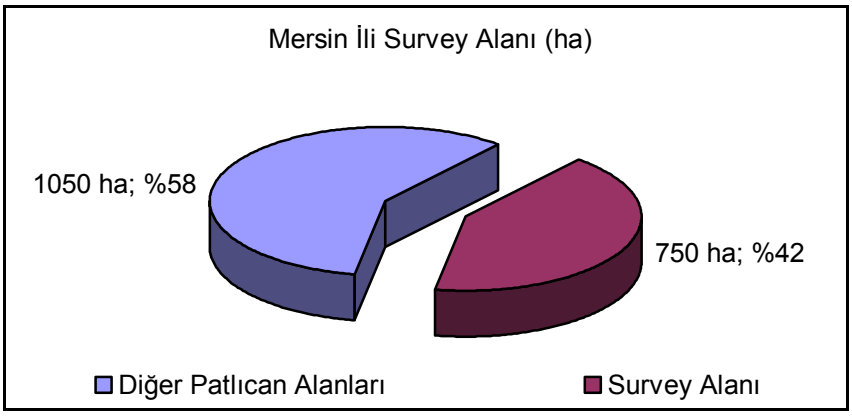
5. Elektroforez işleminin sonunda, her bir reaksiyon için oluşan DNA bantlarının görünür hale gelebilmesi için, jel oda sıcaklığında Ethidium Bromide'le (0,5 μg/ml) birkaç dakika boyanmıştır. Jeldeki fazla ethidium bromide steril distile su içerisinde 10 dak bekletilerek uzaklaştırılmıştır. Yıkama işlemi tamamlanan bu jel, Transilluminatör (Vilber Lourmat) cihazına yerleştirilmiştir. UV ışık altında parlak kırmızımsı pembe renk gösteren DNA bantları, polaroid pozitif/negatif film yerleştirilmiş kamera (MP4 Land, USA) yardımıyla görüntülenmiştir (Sambrook ve ark., 1989; Rickwood ve Hames, 1990; Darling ve Brickell, 1994).

Agaroz jel elektroforez çalışmaları sonucunda her bir izolat için, oluşan değerlendirilebilir her bant, var/yok (0/1) şeklinde kaydedilmiştir. Fom izolatlarının birbiri ile olan genetik yakınlıkları, Populasyon Genetik Analiz Programı (POPGENE v1.32) kullanılarak hesaplanmıştır. Bu programda, UPGMA metodu ile Jaccord's coefficient formülüne "Nei's Genetic Distance" dayalı olarak (Nei, 1978) izolatlar arasındaki mesafeyi gösteren bir dendrogram oluşturulmuştur. Yazılımın dendrogram fonksiyonu PHYLIP programının NEIGHBOR prosedürü modifiye edilerek hazırlanmıştır (Nei, 1978; Yeh ve ark., 1999; Vakalounakis ve Fragkiadakis, 1999; Açık, 2002).

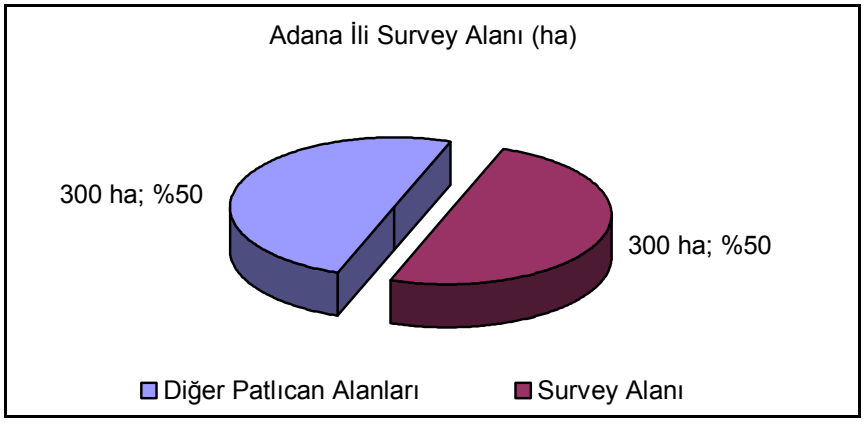
4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. Patlıcan Ekim Alanlarında Fusarium Solgunluk Hastalığı Surveyi

Bu survey çalışmasında, Mersin ve Adana illerinde açık alan, sera ve yüksek tünellerde patlıcanda Fusarium solgunluk hastalığının hastalık oranı (%) ve hastalık şiddeti (%) belirlenmiştir. Bölüm 3.2.1'de survey yapılan ilçeler ve survey programı belirtilmiştir. Mersin ilinde toplam yetiştiricilik yapılan 1800 ha alanın % 42'sini oluşturan 750 ha alanda, Adana ilinde ise, toplam yetiştiricilik yapılan 600 ha alanın % 50'sini oluşturan 300 ha alanda survey çalışmaları yapılmıştır. Şekil 4.1 ve 4.2'de bu illerde survey yapılan alanın patlıcan yetiştirilen toplam alana oranı gösterilmiştir.



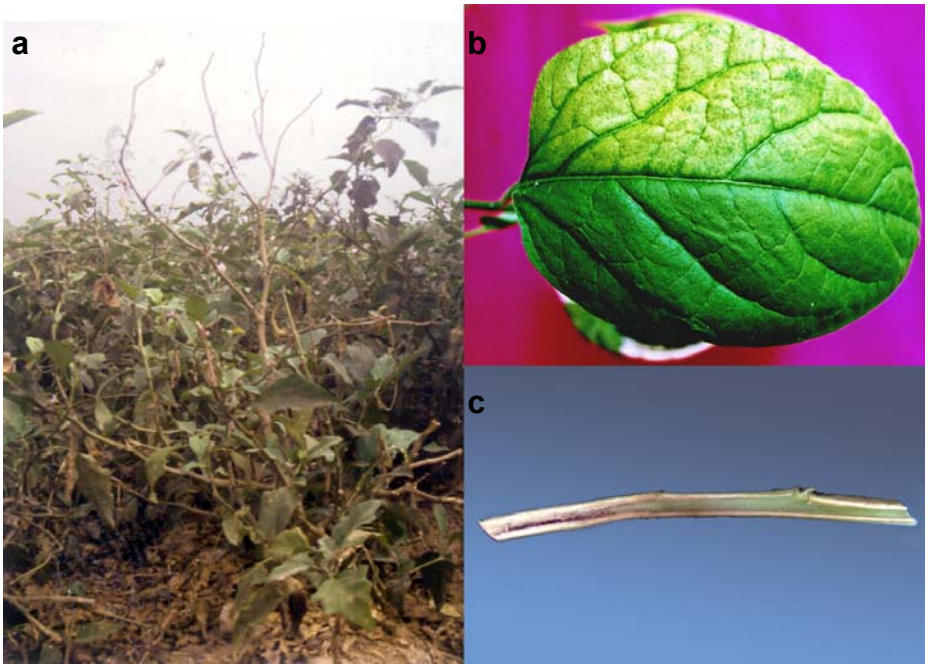
Şekil 4.1. Mersin ilinde survey yapılan patlıcan tarla alanının toplam tarla alanına oranı (%)



Şekil 4.2. Adana ilinde survey yapılan patlıcan tarla alanının toplam tarla alanına oranı (%)

Patlıcanda solgunluk hastalığına, *Fusarium oxysporum* Schlecht. f. sp. *melongenae* Matuo and Ishigami ve *Verticillium dahliae* Kleb. isimli iki fungus neden olmaktadır. Her iki etmenin oluşturduğu solgunluk simptomları birbirine oldukça benzer olup, bazen aynı alanda ve hatta aynı bitkide birlikte bulunabilmektedir (Snyder ve Smith, 1981). *Fusarium* ve *Verticillium* funguslarının her ikisi de, bitkide genel bir solgunluk şeklinde ilk simptomları sergilemekte, hastalığın ilerleyen dönemlerinde şiddetli infeksiyonlar bitkiyi tamamen öldürebilmektedir. Fusarium solgunluk hastalığı, infeksiyonun başlangıç dönemlerinde genç yapraklarda ince damarlarda renk açılmasına neden olmakta bunu yaprakların tek taraflı sararması ve solması izlemektedir. Yaprak ölümü, yaşlı yapraklarda başlamakta ve üst kısımlara doğru ilerlemektedir.

Solgunluk simptomu sergileyen bitkilerin dallarından enine kesitler alındığında, ksilemde kahverengileşme görülmektedir. *Fusarium oxysporum* f. sp. *melongenae*'nın neden olduğu şiddetli infeksiyonlar bitkinin sürgün uçlarının veya bazı dallarının tamamen kurumasına neden olabilmektedir (Snyder ve Smith, 1981; Hillocks,1992). Fusarium solgunluk hastalığının karakteristik bitki, yaprak ve iletim demeti simptomları Şekil 4.3'de verilmiştir.



Şekil 4.3. Patlıcanda Fusarium solgunluk hastalığının genel bitki (a), yaprak (b) ve vasküler renklenme (c) simptomları

Sera ve yüksek tünelde yetiştiriciliğin yaygın olduğu Mersin ilinde, 2002 yılı Mayıs ayının başından, Temmuz ayının sonuna kadar olan dönemde surveyler yapılmıştır.

Mersin ilinin Merkez, Aydıncık, Gülnar, Silifke ve Tarsus ilçelerinde sera ve yüksek tünellerde yaklaşık 840 ha alanda ekonomik anlamda patlıcan yetiştiriciliği yapılmaktadır (Anonymous, 2004).

Survey yapılan bu ilçelerde, survey yapılan tarla sayısı, hastalıkla bulaşık tarla sayısı, survey alanı ve hastalıklı tarla alanı Çizelge 4.1'de verilmiştir. Çizelge 4.1'de görüldüğü gibi, toplam 4575 da'lık alanı temsil eden, 77 tarlada gözlem yapılmış ve bu alanın 2625 da'lık kısmını oluşturan 52 tarlanın solgunluk hastalığı ile infekteli olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.1. Mersin ili sera ve tünellerde, patlıcanda Fusarium solgunluk hastalığının 2002 yılı survey sonuçları

Mersin Survey Alanı		**Survey Yapılan Sera ve Tünel Sayısı**	**Hastalıklı Sera ve Tünel Sayısı**	**Survey Alanı (da)**	**Hastalıklı Sera ve Tünel Alanı (da)**
Merkez		6	4	450	250
Aydıncık		10	7	400	300
Gülnar	Sipahili	6	6	315	315
Silifke	Akdere	7	3	220	180
Tarsus	Merkez	5	3	400	140
	Adanalıoğlu	4	3	350	110
	Alifakı	7	6	300	200
	Halitağa	4	0	350	290
	Kulak	5	3	300	150
	Özelbahşiş	5	3	300	160
	Reşadiye	8	7	450	310
	Yeşiltepe	5	3	350	120
	Yunusoğlu	5	4	390	100
Toplam		**77**	**52**	**4575**	**2625**

Mersin yöresinde sera ve yüksek tünelde survey yapılan her bir tarla için, hastalık oranı (%) ve hastalık şiddeti (%) Çizelge 4.2'de verilmiştir.

Mersin ilinin Silifke, Gülnar ve Aydıncık ilçelerinde çoğunlukla yetiştiricilikte hibrit bir çeşit olan "Faselis F_1" patlıcan çeşidinin tercih edildiği ve ekim nöbeti uygulanmaksızın aynı cam serada uzun yıllar patlıcan yetiştiriciliği yapıldığı belirlenmiştir. Bu nedenle, toprakta klamidospor formunda, uzun yıllar canlı kalabilen Fusarium solgunluk patojeninin bu çeşit seralarda çok tahripkar sonuçlara neden olduğu gözlenmiştir. Mersin ilinde sera ve tünellerde ortalama hastalık oranı ve şiddeti sırasıyla, % 42.1 ve % 18.5 olarak saptanmıştır.

Çizelge 4.2. Mersin ili sera ve tünellerde, patlıcanda Fusarium solgunluk hastalığının 2002 yılı hastalık oranı ve şiddeti (%)

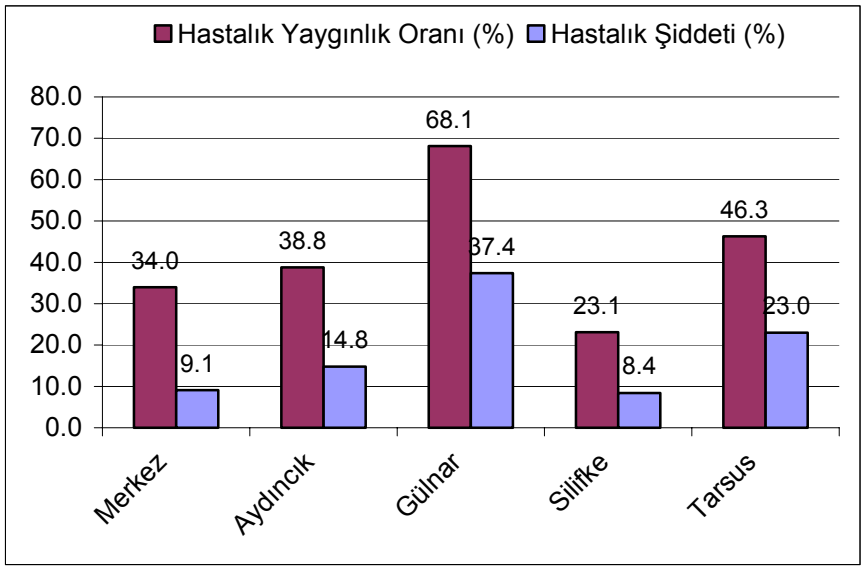
Mersin Survey Alanı	Sera ve Tünel Adı	Hastalık Oranı (%)	Hastalık Şiddeti (%)
Merkez	Mrk 1	46.0	11.00
	Mrk 2	58.0	19.0
	Mrk 3	40.0	10.0
	Mrk 4	60.0	14.5
	Mrk 5,6	0.0	0.0
Ortalama		***34.0***	***9.1***
Aydıncık	Aydın 1	66.0	14.0
	Aydın 2	55.0	18.5
	Aydın 3	61.0	20.0
	Aydın 4	40.0	23.0
	Aydın 5	55.0	27.0
	Aydın 6	42.0	24.0
	Aydın 7	69.0	21.0
	Aydın 8,9,10	0.0	0.0
Ortalama		***38.8***	***14.8***
Gülnar	Gül 1	70.0	38.5
	Gül 2	78.0	47.0
	Gül 3	73.0	44.5
	Gül 4	66.0	26.0
	Gül 5	54.0	27.8
	Gül 6	67.5	40.3
Ortalama		***68.1***	***37.4***
Silifke	Slfk 1	52.0	17
	Slfk 2	72.0	33.5
	Slfk 3	38.0	8.5
	Slfk 4,5,6,7	0.0	0.0
Ortalama		***23.1***	***8.4***

Çizelge 4.2'nin devamı

Mersin Survey Alanı		Sera ve Tünel Adı	Hastalık Oranı (%)	Hastalık Şiddeti (%)
Tarsus	Merkez	Trs 1	61.0	30.5
		Trs 2	63.0	28.8
		Trs 3	69.0	36.0
		Trs 4,5	0.0	0.0
	Adanalıoğlu	Aoğlu 1	67.0	40.3
		Aoğlu 2	73.0	41.7
		Aoğlu 3	72.0	40.8
		Aoğlu 4	0.0	0.0
	Alifakı	Afakı 1	68.0	43.6
		Afakı 2	71.0	41.3
		Afakı 3	73.0	38.0
		Afakı 4	65.0	41.0
		Afakı 5	77.0	42.2
		Afakı 6	70.0	43.0
		Afakı 7	0.0	0.0
	Halitağa	Hağa 1,2,3,4	0.0	0.0
	Kulak	Kulak 1	71.0	23.2
		Kulak 2	74.0	20.7
		Kulak 3	65.0	27.0
		Kulak 4,5	0.0	0.0
	Özelbahşiş	Bahş 1	69.0	34.2
		Bahş 2	66.0	36.0
		Bahş 3	69.0	28.8
		Bahş 4,5	0.0	0.0
	Reşadiye	Reşad 1	76.0	31.5
		Reşad 2	77.0	26.1
		Reşad 3	68.0	28.8
		Reşad 4	70.0	38.0
		Reşad 5	64.0	36.0
		Reşad 6	63.0	32.4
		Reşad 7	69.0	39.6
		Reşad 8	0.0	0.0
	Yeşiltepe	Ytepe 1	74.0	28.8
		Ytepe 2	68.0	36.0
		Ytepe 3	69.0	31.4
		Ytepe 4,5	0.0	0.0
	Yunusoğlu	Yunus 1	72.4	36.5
		Yunus 2	68.0	32.0
		Yunus 3	67.0	34.0
		Yunus 4	73.0	36.0
		Yunus 5	0.0	0.0
Ortalama			***46.3***	***23.0***
Genel Ortalama			**42.1**	**18.5**

Ayrıca ilçe düzeyinde hastalık oranı ve şiddeti de hesaplanmıştır (Şekil 4.4). Mersin yöresinde yapılan survey çalışmaları sonucunda en yüksek hastalık oranı yaklaşık % 70'lik bir oranla Gülnar ilçesinin Sipahili beldesinde belirlenmiştir (Şekil 4.4 ve Çizelge 4.2). İlçe genelinde oldukça yaygın olan solgunluk hastalığının şiddeti ise % 37.4 olarak saptanmıştır. Gülnar ilçesini Merkez, Aydıncık, Silifke ve Tarsus ilçeleri izlemiştir. Bu ilçelerde hastalık oranları, Mersin Merkez'de % 34.0, Aydıncık'da % 38.8, Silifke'de % 23.1 ve Tarsus'da % 46.3 olarak saptanmıştır. Bu ilçelerde hastalık şiddeti ise sırasıyla, Merkez (% 9.1), Aydıncık (% 14.8), Silifke (% 8.4) ve Tarsus (% 23.0) olarak saptanmıştır.

Tarsus ilçesine bağlı beldeler arasında en yüksek hastalık oranı, % 60.9 oranıyla Reşadiye beldesinde saptanırken bunu sırasıyla, Alifakı (% 60.6), Yunusoğlu (% 56.1), Adanalıoğlu (% 53.0), Yeşiltepe (% 42.2), Özelbahşiş (% 40.8), Kulak (% 42.0), Merkez (% 38.6) ve Halitağa (% 0) beldeleri izlemiştir.



Şekil 4.4. Mersin ili sera ve tünellerde, patlıcanda Fusarium solgunluk hastalığının 2002 yılı hastalık oranı ve şiddeti (%)

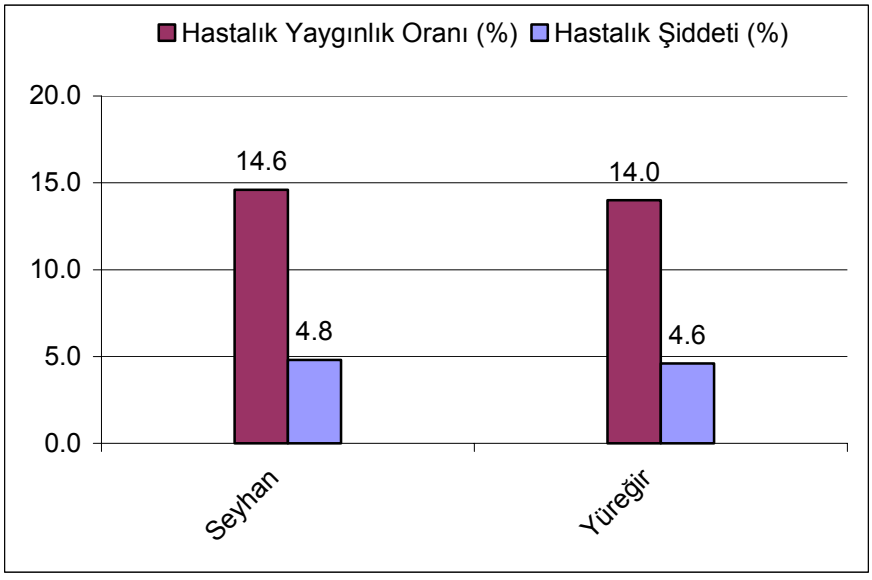
Adana ve yöresinde ise, açık alanda yetiştiricilik yaygın olup kışlık üretimde, maliyeti çok yüksek olan cam seranın yerine daha düşük maliyetle tesis edilebilen yüksek tünel tercih edilmektedir. 2002 yılında yürütülen survey programı çerçevesinde belirlenen ilçeler, survey yapılan tünel sayısı, hastalıkla bulaşık tarla sayısı, survey alanı ve hastalıklı tarla alanı Çizelge 4.3'de verilmiştir.

Çizelge 4.3. Adana ili sera ve tünellerde, patlıcanda Fusarium solgunluk hastalığının 2002 yılı survey sonuçları

Adana Survey Alanı	Survey Yapılan Tünel Sayısı	Hastalıklı Tünel Sayısı	Survey Alanı (da)	Hastalıklı Tünel Alanı (da)
Yüreğir	3	1	270	60
Seyhan	3	1	265	50
Toplam	**6**	**2**	**535**	**110**

Adana ilinin Seyhan ve Yüreğir ilçesinde, toplam 6 tünelde, ortalama 535 dekarlık alanda survey yapılmıştır. Seyhan'a bağlı Yenidam beldesinde ve Yüreğir ilçesinde, 6-7 yılda bir patlıcan üretiminin yapıldığı, hem açık alanda hem de tünelde yetiştiricilikte yaygın olarak "Adana Topağı" çeşidinin kullanıldığı üreticilerden edinilen bilgiler arasındadır. Fusarium solgunluğuna neden olan toprak kökenli bu fungusun gözlem yapılan alanlarda çok yaygın olmadığı belirlenmiştir.

Adana yöresinde patlıcan yetiştiriciliği yapılan tünellerde survey yapılan tarlaların % hastalık oranı ve hastalık şiddeti Şekil 4.5'de verilmiştir.



Şekil 4.5. Adana ili sera ve tünellerde, patlıcanda Fusarium solgunluk hastalığının 2002 yılı hastalık oranı ve şiddeti (%)

Adana ilinin sadece Seyhan ve Yüreğir ilçesinde yüksek tünellerde patlıcan yetiştiriciliği yapılmaktadır. Adana Seyhan ve Yüreğir ilçesinin Yenidam beldesindeki tarlalarda solgunluk hastalığının çok yaygın olmadığı gözlenmiştir. Bu alanlarda hastalık oranı yaklaşık olarak % 15.0 ve hastalık şiddeti de % 5.0 olarak saptanmıştır. Üreticilerin 5-6 yılda bir patlıcan tarımına yer vermeleri, toprak kökenli bu patojenin inokulum oranını önemli ölçüde düşürmüş ve bunun sonucu olarak da Fusarium solgunluk hastalığı oluşumu önemli oranda azalmıştır.

Mersin ilinde açık alanlarda patlıcan yetiştiriciliği yoğun olarak Tarsus ilçesinde yapılmaktadır. Ayrıca Merkez'e bağlı birkaç beldede de yetiştiriciliğin yapıldığı tespit edilmiştir. Belirlenen bu alanlarda, 2002 yılı Temmuz ve Ağustos aylarında surveyler yapılmıştır. Survey programı çerçevesinde, belirlenen ilçeler, survey yapılan tarla sayısı, hastalıkla bulaşık tarla sayısı, survey alanı ve hastalıklı tarla alanı Çizelge 4.4'de verilmiştir.

Çizelge 4.4. Mersin ili açık alanlarda, patlıcanda Fusarium solgunluk hastalığının 2002 yılı survey sonuçları

Mersin Survey Alanı		Survey Yapılan Tarla Sayısı	Hastalıklı Tarla Sayısı	Survey Alanı (da)	Hastalıklı Tarla Alanı (da)
Merkez		11	8	1800	850
Tarsus	Alifakı	8	6	1100	750
	Yeşiltepe	3	3	752	300
	Özelbahşiş	6	3	650	200
	Reşadiye	7	6	500	200
	Adanalıoğlu	4	2	550	100
	Yunusoğlu	3	3	450	190
	Kulak	8	6	500	285
	Merkez	4	2	450	100
Toplam		**54**	**39**	**6752**	**2975**

Mersin ilinde 952 ha'lık alanda, açıkta patlıcan yetiştiriciliği yapılmaktadır (Anonymous, 2004). Survey çalışmaları toplam 6752 da alanda yapılmış ve bu alanın 2975 da'lık kısmının Fusarium solgunluğu ile infekteli olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.4'den de görüleceği gibi toplam 54 tarlada survey yapılmış ve bu tarlalardan, 39'unun solgunluk hastalığı ile infekteli olduğu tespit edilmiştir. Bu ilde

hem açık alanda hem de sera ve yüksek tünellerde en yoğun yetiştiricilik Tarsus ilçesinde yapılmaktadır.

Açık alanda yetiştiricilikte, Mersin yöresinde "Pala", Adana yöresinde ise "Adana Topağı" patlıcan çeşidinin kullanıldığı belirlenmiştir.

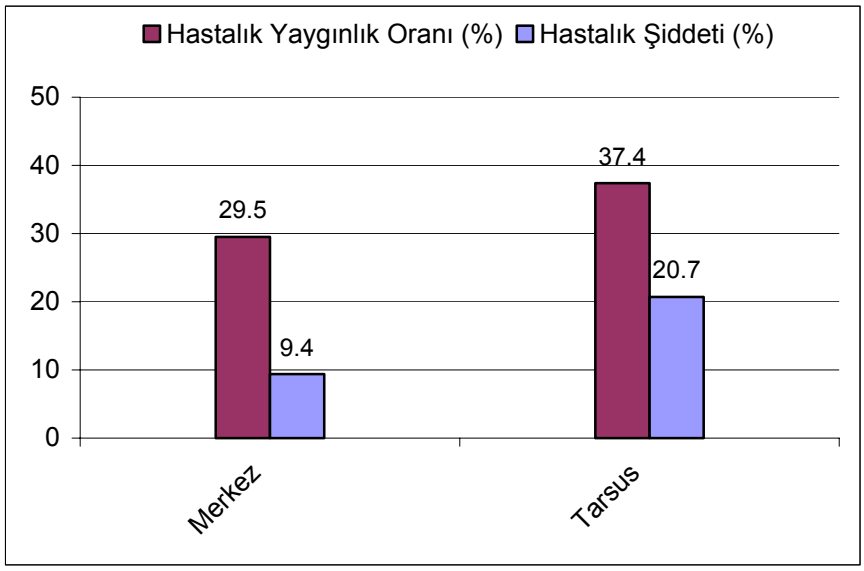
Mersin yöresinde survey yapılan tarlaların hastalık oranı (%) ve hastalık şiddeti (%) Çizelge 4.5 ve Şekil 4.6'da verilmiştir. Mersin ili ve ilçelerinde açık alanlarda hastalığın ortalama hastalık oranı % 33.5 ve hastalık şiddeti ise % 15.1 olarak saptanmıştır.

Çizelge 4.5. Mersin ili açık alanlarda, patlıcanda Fusarium solgunluk hastalığının 2002 yılı hastalık oranı ve şiddeti (%)

Mersin Survey Alanı		Tarla Adı	Hastalık Oranı (%)	Hastalık Şiddeti (%)
Merkez		Mrk 1	75.0	29.0
		Mrk 2	65.0	20.0
		Mrk 3,4,5	57.0	25.0
		Mrk 6	67.0	15.0
		Mrk 7,8	61.0	14.0
		Mrk 9,10,11	0.0	0.0
Ortalama			***29.5***	***9.4***
Tarsus	Merkez	Trs 1,2	55.3	25.8
		Trs 3,4	0.0	0.0
	Adanalıoğlu	Aoğlu 1,2,3	48.0	23.0
		Aoğlu 4,5	0.0	0.0
	Alifakı	Afakı 1,2,3	44.0	21.2
		Afakı 4	42.4	22.0
		Afakı 5	40.4	20.0
		Afakı 6	45.0	25.0
		Afakı 7,8	0.0	0.0
	Kulak	Kulak 1,2	55.0	21.3
		Kulak 3,4	52.0	22.4
		Kulak 5,6	57.0	25.2
		Kulak 7,8	0.0	0.0
	Özelbahşiş	Bahş 1	45.0	19.5
		Bahş 2,3	44.0	27.0
		Bahş 4,5,6	0.0	0.0

Çizelge 4.5'in devamı

Mersin Survey Alanı		Tarla Adı	Hastalık Oranı (%)	Hastalık Şiddeti (%)
Tarsus	Reşadiye	Reşad 1,2,3	32.0	18.0
		Reşad 4,5,6	30.5	15.0
		Reşad 7	0.0	17.0
	Yeşiltepe	Ytepe 1	50.0	20.0
		Ytepe 2	50.0	24.0
		Ytepe 3	46.0	15.0
	Yunusoğlu	Yunus 1	42.0	18.0
		Yunus 2	41.0	15.0
		Yunus 3	39.2	17.0
Ortalama			***37.4***	***20.7***
Genel Ortalama			**33.5**	**15.1**



Şekil 4.6. Mersin ili açık alanlarda, patlıcanda Fusarium solgunluk hastalığının 2002 yılı hastalık oranı ve şiddeti (%)

Çizelge 4.5 ve Şekil 4.6'ya göre Mersin ilinin Tarsus ilçesinde, Fusarium solgunluk hastalığının hastalık oranı ve hastalık şiddetinin sırasıyla % 37.4 ve % 20.7, merkezde ise % 29.5 ve % 9.4 olduğu saptanmıştır.

Tarsus ilçesine bağlı beldeler arasında % 49.0 yaygınlık oranıyla Yeşiltepe beldesi ilk sırada yer almıştır. Bunu sırasıyla, Kulak (% 41.0), Yunusoğlu (% 40.7), Alifakı (% 32.5), Adanalıoğlu (% 28.8), Merkez (% 27.7), Reşadiye (% 26.8) ve Özelbahşiş (% 22.2) beldeleri izlemiştir.

Bu tarlalarda, solgun bitkilerden alınan örneklerden *Verticillium* sp., düşük oranlarda izole edilmiştir. Mersin yöresi patlıcan tarlalarının çoğunda, sera ve yüksek tünellerde olduğu gibi üreticilerin ekim nöbeti uygulamasına dikkat etmediği, bunun sonucunda da bazı tarlalarda hastalığın oldukça tahripkar olduğu gözlenmiştir.

Açık alanda yetiştiriciliğin yaygın olduğu Adana ilinin Seyhan, Yüreğir, Ceyhan, Kozan ve İmamoğlu ilçelerinde survey çalışmaları yapılmıştır. Bu ilçelerde gözlem yapılan tarla sayısı, hastalıkla bulaşık tarla sayısı, survey alanı ve hastalıklı tarla alanı Çizelge 4.6'da verilmiştir.

Çizelge 4.6. Adana ili açık alanlarda, patlıcanda Fusarium solgunluk hastalığının 2002 yılı survey sonuçları

Adana Survey Alanı		Survey Yapılan Tarla Sayısı	Hastalıklı Tarla Sayısı	Survey Alanı (da)	Hastalıklı Tarla Alanı (da)
Seyhan	Şanbayat	4	1	250	100
	Mıdık	2	1	280	80
	Camuzcu	5	3	250	150
	Yenidam	3	1	200	100
	Hadırlı	4	2	250	120
	Küçükdikili	5	2	150	110
	Havutlu	6	2	220	160
Ceyhan	Hamdilli	5	3	150	120
	Kıvrıklı	3	1	140	80
	Merkez	7	5	160	75
Yüreğir		3	3	200	200
Kozan		7	4	600	180
İmamoğlu		3	2	150	100
Toplam		**57**	**30**	**3000**	**1575**

Adana ilinde 454 ha alanda açıkta patlıcan yetiştiriciliği yapılmaktadır (Anonymous, 2004). Şanbayat, Mıdık, Camuzcu, Yenidam, Hadırlı, Küçükdikili ve Havutlu beldelerinde toplam 57 tarlada, 3000 dekarlık bir alanda gözlem yapılmış ve bu tarlalardan 30'unda Fusarium solgunluğu tespit edilmiştir. En fazla yetiştiriciliğin yapıldığı Ceyhan ilçesinde ise, 15 tarladan 9'unun bulaşık olduğu belirlenmiştir. Adana yöresinde, gözlem yapılan alanın yaklaşık yarısının, Fusarium solgunluğu ile

infekteli olduğu tespit edilmiştir. Adana yöresinde survey yapılan tarlaların % hastalık oranı ve % hastalık şiddeti Çizelge 4.7 ve Şekil 4.7'de verilmiştir.

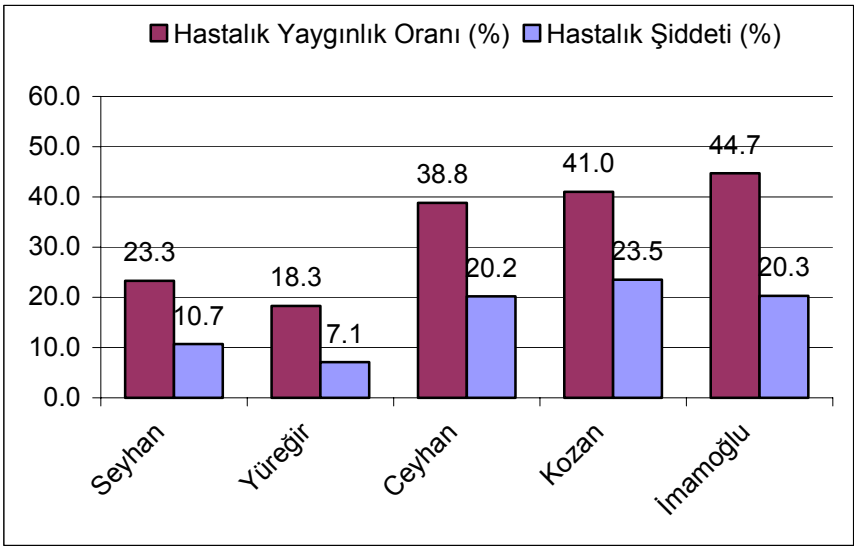
Açıkta yetiştiriciliğin yaygın olduğu Adana ilinde ise ortalama hastalık oranı ve hastalık şiddeti sırasıyla % 33.2 ve % 16.4 olarak saptanmıştır.

Çizelge 4.7. Adana ili açık alanlarda, patlıcanda Fusarium solgunluk hastalığının 2002 yılı hastalık oranı ve şiddeti (%)

Adana Survey Alanı	Tarla Adı	Hastalık Oranı (%)	Hastalık Şiddeti (%)
Seyhan/Şanbayat	Şnbyt 1	58.0	25.0
	Şnbyt 2,3,4	0.0	0.0
Seyhan/Mıdık	Mıdık 1	74.0	42.5
	Mıdık 2	0.0	0.0
Seyhan/Camuzcu	Cmzc 1	70.0	45.5
	Cmzc 2	64.0	24.5
	Cmzc 3	44.0	14.0
	Cmzc 4,5	0.0	0.0
Seyhan/Yenidam	Ydam 1	40.0	18.0
	Ydam 2,3	0.0	0.0
Seyhan/Hadırlı	Hadır 1	38.0	12.0
	Hadır 2	40.0	12.5.0
	Hadır 3,4	0.0	0.0
Seyhan/Küçükdikili	Kdikili 1	58.0	30.5
	Kdikili 2	56.0	31.5
	Kdikili 3,4,5	0.0	0.0
Seyhan/Havutlu	Havut 1	60.0	25.0
	Havut 2	50.0	17.5
	Havut 3,4,5,6	0.0	0.0
Seyhan Ortalama		***23.3***	***10.7***
Yüreğir	Yür 1	54.9	21.2
	Yür 2,3	0.0	0.0
Yüreğir Ortalama		***18.3***	***7.1***
Ceyhan Merkez	Cyhn 1	60.0	27.5
	Cyhn 2	58.0	28.0
	Cyhn 3	82.0	60.5
	Cyhn 4	80.0	59.5
	Cyhn 5	58.0	26.0
	Cyhn 6,7	0.0	0.0
Ceyhan/Hamdilli	Hamdil 1	60.0	26.5
	Hamdil 2	64.0	30.0
	Hamdil 3	64.0	22.0
	Hamdil 4,5	0.0	0.0

Çizelge 4.7'nin devamı

Adana Survey Alanı	Tarla Adı	Hastalık Oranı (%)	Hastalık Şiddeti (%)
Ceyhan/Kıvrıklı	Kıvrık 1	56.0	23.5
	Kıvrık 2,3	0.0	0.0
Ceyhan Ortalama		***38.8***	***20.2***
Kozan	Kzn 1	78.6	50.2
	Kzn 2	72.0	43.5
	Kzn 3	74.0	45.0
	Kzn 4	62.0	25.5
	Kzn 5,6,7	0.0	0.0
Ortalama		***41.0***	***23.5***
İmamoğlu	İoğlu 1	64.0	24.0
	İoğlu 2	70.0	37.0
	İoğlu 3	0.0	0.0
Ortalama		***44.7***	***20.3***
Genel Ortalama		**33.2**	**16.4**



Şekil 4.7. Adana ili açık alanlarda, patlıcanda Fusarium solgunluk hastalığının 2002 yılı hastalık oranı ve şiddeti (%)

Açık alanda patlıcan yetiştiriciliğinin yaygın olduğu Adana yöresinde gözlem yapılan alanlardan toplanan örneklerden sadece *Fusarium* izole edilmiştir. Fusarium solgunluğuna en fazla % 44.7 hastalık oranı ve % 20.3 hastalık şiddetiyle, İmamoğlu ilçesinde rastlanmıştır. Bunu sırasıyla, Kozan (% 41.0-% 23.5), Ceyhan (% 38.8-% 20.2), Seyhan (% 23.3-% 10.7) ve Yüreğir (% 18.3-% 7.1) ilçeleri izlemiştir.

Ülkemizde, Adana, Mersin ve Antalya yöresinde patlıcanda solgunluk hastalığına *Fusarium* sp. neden olurken Hatay yöresinde ise etmenin büyük oranda *Verticillium* sp. olduğu belirtilmiştir (Delen ve Yıldız, 1982; Yücel, 1994). Bu survey çalışmasında da, Mersin ilinde patlıcan yetiştiriciliğinin Adana iline oranla hem açık alanda hem de sera ve yüksek tünelde daha yaygın olduğu belirlenmiştir. Çalışmada, survey yapılan alanın tamamında *Fusarium oxysporum* f. sp. *melongenae* yaygın olarak saptanırken, *Verticillium dahliae* birkaç alanda düşük oranlarda bulunmuştur.

Üreticilerden edinilen bilgilerden, Mersin yöresi patlıcan alanlarının çoğunda ekim nöbeti uygulamasına dikkat edilmediği tespit edilmiştir. Bu alanlarda birbirine yakın tarlalarda, Fusarium solgunluk hastalığının yaygınlık ve şiddetinin birbirine yakın oranlarda saptanması, sulama suyunda potansiyel bir inokulumun varlığına işaret etmektedir.

Ülkemizde patlıcan üretiminde önemli bir paya sahip Doğu Akdeniz Bölgesi'nde, patlıcan ekim alanlarında sorun oluşturan fungal hastalıkların en önemlisi solgunluk hastalığıdır. Bu çalışmada, Adana ve Mersin illeri ve çevresinde patlıcan tarımının yapıldığı alanlarda *F. oxysporum* f. sp. *melongenae*'nin ekonomik kayıplara neden olan ve Verticillium solgunluğundan daha yaygın bir solgunluk patojeni olduğu ortaya konulmuştur. Fusarium solgunluk hastalığının, genellikle ortalama günlük sıcaklığın 23 ºC'nin üzerinde olan alanlarda daha yaygın olarak görülmesi (Hillocks, 1992), yaz aylarında günlük sıcaklık ortalaması 30 ºC ve üzerinde seyreden Adana ve Mersin illerinde yapılan bu çalışmadan elde edilen sonuçları destekler niteliktedir. Mersin ilinde ekim nöbeti uygulanmaksızın, aynı cam serada uzun yıllar patlıcan yetiştiriciliğinin yapıldığı tespit edilmiştir. Bu nedenle toprakta klamidospor formunda yıllarca canlılığını sürdürebilen *F. oxysporum* f. sp. *melongenae*'nin neden olduğu solgunluk hastalığı bu durumdaki seralarda daha yaygın olarak saptanmıştır.

Solgunluk patojenlerinin yaygınlık oranı ile toprak ve sulama suyunda bulunan inokulum oranı ve bu inokulumun uzun yıllar canlılığını koruma özelliği arasında ilişki olduğu düşünülmektedir. Bu konular ile toprak kökenli patojenlerin kontrolündeki zorluklar üreticilere açıklanmalı, ekim nöbeti, uygun sulama ve

gübreleme tekniklerinin kullanılması yönünde bilgiler verilmelidir. Ayrıca bölgede yaygın olarak yetiştirilen, özellikle lokal çeşitlerden "Pala" ve "Adana Topağı" çeşitlerinin Fusarium solgunluğuna duyarlı olması nedeniyle, bunların yerine dayanıklı çeşitlerin geliştirilerek yetiştiricilikte kullanılması daha uygun olacaktır.

4.2. Patojenin İzolasyonu ve Patojenite Çalışmaları

Solgunluk simptomu gösteren patlıcan bitkilerinin iletim demetlerinde kahverengileşme gösteren kısımlarından etmen izole edilmiş ve inkübasyon süresinin sonunda gelişen *Fusarium* kolonilerinden saflaştırmalar yapılmıştır. Tek spordan geliştirilen *Fusarium* türlerinin makroskobik ve mikroskobik incelemelerle, PDA ve CDA ortamında oluşturdukları koloni büyüklüğü, koloni rengi, konidi büyüklüğü, klamidospor oluşturma özellikleri, fialid yapısı ve uzunluğu gibi özellikleri kaydedilmiştir.

Adana yöresinde surveyler sırasında örnekleme yapılan tarlalardan alınan bitkilerden yapılan izolasyonlarda sadece *Fusarium* sp. izole edilmiştir. Mersin ili ve yöresinde ise, bazı tarlalardan alınan solgun bitkilerden, düşük oranlarda *Verticillium* sp. izole edilmiştir (Haris ve ark., 1993; Melouk, 1992; Pegg ve Brady, 2002).

Adana ve Mersin illeri ve yöresinden toplam 47 *F. oxysporum* f. sp. *melongenae* (Fom) izolatı elde edilmiştir. Bu Fom izolatlarının patojeniteleri, Biles ve Martyn (1989)'in yöntemine göre konukçusu olan patlıcan fidelerine kök daldırma yöntemi ile testlenmiştir.

Bu çalışmada test bitkisi olarak, Fusarium solgunluğuna duyarlı "Pala" patlıcan çeşidinin (*Solanum melongenae* L.) fideleri kullanılmıştır. İnokulum süspansiyonu verilen bitkiler inokulasyondan 3 hafta sonra, infekteli yapraklarda klorosis ve nekrosis derecesine göre Fusarium solgunluk hastalığı gelişimi yönünden değerlendirilmiştir (Wilhelm ve ark., 1974). Ayrıca, gövdede kahverengileşmenin ulaştığı en son nokta kaydedilerek, vasküler renklenme simptomlarına göre de hastalık gelişimi belirlenmiştir. Yeşil aksam ve vasküler renklenme simptomlarına göre kaydedilen değerler üzerinden, $p \leq 0.05$ önem seviyesinde varyans analizi yapılarak, "Duncan" çoklu karşılaştırma testi ile izolatların virulenslikleri karşılaştırılmıştır (Bora ve Karaca, 1970; Karman, 1971).

Patojenite denemelerinde, her tarladan elde edilen izolatlarından rastgele bir tanesi ile bitkiler inokule edilmiştir. Toplam 47 izolatın virulensliklerinin denendiği bu çalışmada, bütün izolatların patojenik özellik gösterdiği belirlenmiştir. Çizelge 4.8'de bu izolatları temsil eden yöreler, patojenite sonuçları ve RAPD grupları birlikte verilmiştir.

Patojenite denemeleri sonucunda, Fom 10 (Tarsus/Alifakı) izolatı, virulensliği en yüksek izolat olarak belirlenmiştir. İstatistiksel analizler sonucunda, izolatların yaprak ve vasküler renklenme simptomlarına göre virulenslikleri farklı bulunmuştur. Çizelge 4.8'de görüldüğü gibi, yaprak simptomlarına göre yapılan değerlendirmelerde, Fom 10 dışında diğer izolatların birbirine yakın virulenslik gösterdikleri (% 75-85) saptanmıştır. Vasküler renklenme değerleri üzerinden yapılan analizlerde, izolatların virulenslikleri yaprak simptomlarına oranla daha spesifik sonuç vermiştir. Patojen inokulasyonu sonucu solgunluk simptomu gösteren patlıcan bitkilerinden biri Şekil 4.8'de görülebilir.

Ayrıca, bu izolatların dahil oldukları RAPD gruplarının, patojenite sonuçları ile benzerlik göstermediği belirlenmiştir. Birçok araştırıcı, virulensliğin tamamen farklı genler tarafından yönetildiğini ve *Fusarium* izolatlarının genetik yakınlıkları ile virulenslikleri arasında herhangi bir bağlantı olmadığını bildirmiştir (Kistler, 2001; Summerel ve ark., 2001).

Benzer bir çalışmada, pamukta solgunluk hastalığına neden olan *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*'un farklı coğrafik orijinlerden izole edilen 46 izolatı arasındaki genetik yakınlığı belirlemede, patojenite ve RAPD teknikleri kullanılmıştır. RAPD sonuçlarının patojenite sonuçlarına oranla, izolatların gruplandırılmasında daha spesifik sonuçlar oluşturduğu bildirilmiştir (Assigbetse ve ark., 1994).

Çizelge 4.8. Farklı bölge izolatlarının yaprak ve vasküler renklenme simptomlarına göre virulenslik değerleri ve dahil oldukları RAPD grupları

İzolat No	Lokasyon	Hastalık İndeksi	Hastalık Şiddeti (%)	Vasküler renklenme (cm)	RAPD Grubu
Fom 6	Tarsus/Bahşiş	3.20	80.00 ab*	19.20 ab	I
Fom 7-1	Tarsus/Reşadiye	3.10	77.50 ab	18.80 ab	I
Fom 9	Ceyhan	3.30	82.50 ab	19.30 ab	III
Fom 10	Tarsus/Alifakı	3.80	95.00 a	23.00 a	II
Fom 13	Tarsus/Yeşiltepe	3.10	77.50 ab	17.00 c	II
Fom 16	Gülnar/Sipahili	3.00	75.00 ab	17.50 c	II
Fom 18	Gülnar/Sipahili	3.20	80.00 ab	18.00 c	II
Fom 20	Aydıncık	3.30	82.50 ab	22.50 a	II
Fom 22	Gülnar/Sipahili	2.80	70.00 b	17.00 c	II
Fom 24	Tarsus/Kulak	3.00	75.00 ab	23.40 a	II
Fom 26	Tarsus/Adanalıoğlu	3.40	85.00 ab	19.20 ab	I
Fom 28	Tarsus/Köselerli	3.00	75.00 ab	17.50 c	II
Fom 30	Kozan	3.60	90.00 ab	22.30 a	III
Fom 32	Tarsus/Yunusoğlu	3.30	82.50 ab	19.50 ab	II
Fom 34	Tarsus/Alifakı	3.60	90.00 ab	23.30 a	I
Fom 36	Adana/Havutlu	3.20	80.00 ab	19.00 ab	IV
Fom 43	Tarsus/Adanalıoğlu	3.50	87.50 ab	22.70 a	I
Fom 45	Tarsus/Kulak	3.30	82.50 ab	19.00 ab	II
Fom 47	Tarsus/Kulak	3.00	75.00 ab	19.50 ab	I
Fom 50	Silifke/Akdere	3.20	80.00 ab	20.00 ab	II
Ortalama		**3.25**	**81.13**	**19.89**	

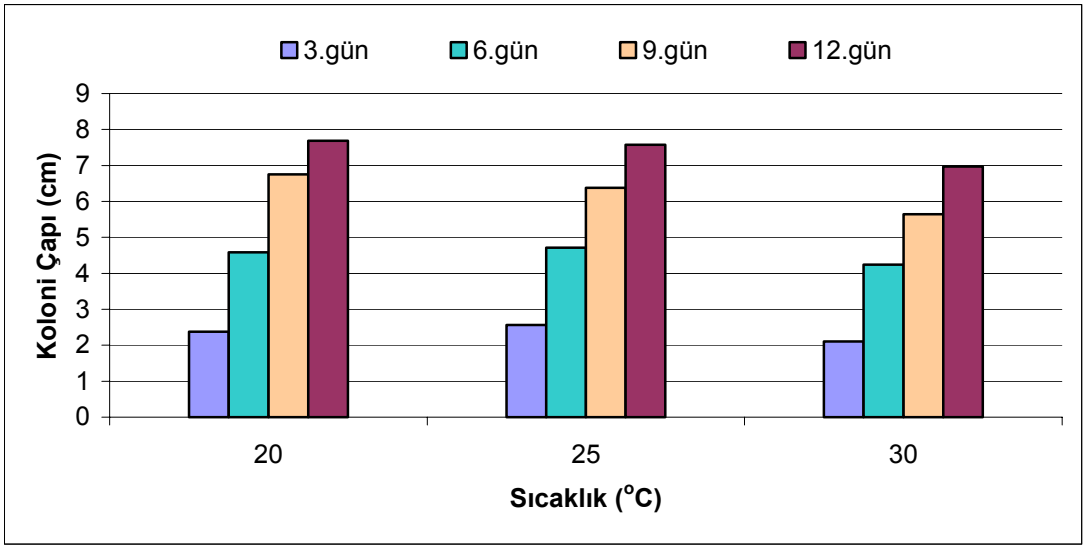
*Farklı harf içeren ortalamalar Duncan ($p \leq 0.05$) testine göre istatistiksel olarak farklıdır.



Şekil 4.8. "Pala" patlıcan çeşidinde (*Solanum melongena* L.) patojenite denemesi (a: Kontrol, b: İnfekteli)

4.3. Fom İzolatlarının Makroskobik ve Mikroskobik Tanılanması

Fom izolatları, PDA ortamına inokule edilerek, sıcaklıkları 20, 25 ve 30 °C'ye ayarlanmış inkübatörlerde, karanlık koşullarda, 12 gün süre ile inkübe edilmiştir. Bu süre içerisinde 3 gün aralıklarla koloni çapları ölçülmüştür (Ek 4). Fom izolatlarının 20-25 °C sıcaklıkta, optimum geliştikleri, bu sıcaklıkların üstünde ise bu izolatların miseliyal gelişimlerinin yavaşladığı gözlenmiştir (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. Fom izolatlarının farklı sıcaklıklarda koloni gelişimleri

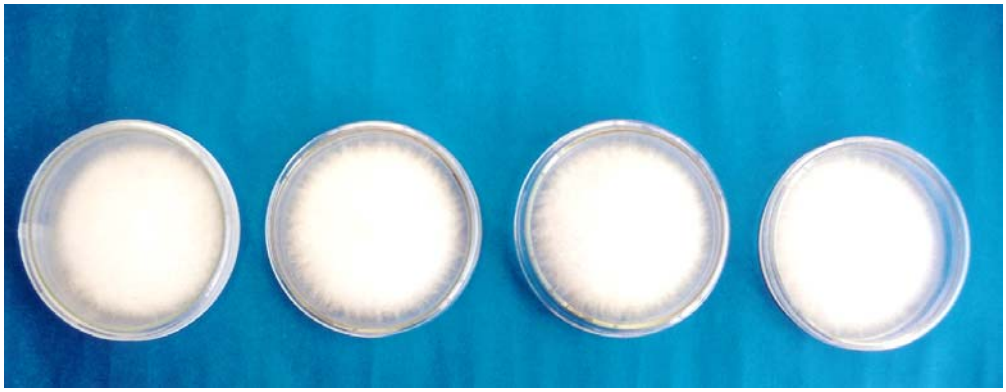
Daha sonra toplam 47 Fom izolatının PDA ve CDA ortamlarında oluşturdukları koloni büyüklüğü, koloni rengi, konidi büyüklüğü, klamidospor oluşturma özellikleri, fialid yapısı ve uzunluğu gibi özellikleri dikkate alınarak tanısı yapılmıştır (Bölüm 3.2.3). Ancak, RAPD çalışmasına dahil edilen 20 izolatın koloni özellikleri verilmiştir (Ek 5 ve Ek 6).

PDA ortamında gelişimini tamamlayan izolatların makroskobik incelemelerle koloni renkleri ve çapları kaydedilmiştir. İzolatlar, flüoresan ışık altında 1-2 gün bekletilerek, sporulasyona yönelmeleri sağlanmış ve koloni renkleri incelenmiştir. Bu izolatların genellikle, koloni üst yüzey renklerinin krem beyaz, alt yüzey (Stroma) renklerinin ise, özellikle merkezde yoğunlaşan pembemsi veya mor bir renkte olduğu gözlenmiştir. Mikroskobik incelemeler sonucunda, Fom izolatlarının *Fusarium oxysporum*'ların bütün morfolojik özelliklerini taşıdıkları belirlenmiştir.

Makrokonidilerinin 4 bölmeli olduğu, çentik şeklinde bazal hücre içerdikleri ve yaklaşık olarak 160 derece açı oluşturdukları belirlenmiştir. Oküler mikrometre ile yapılan ölçümler sonucunda, bu Fom izolatlarının makrokonidi uzunluklarının ise 25-50 µm arasında değiştiği gözlenmiştir. Mikrokonidilerinin ise genellikle iğ şeklinde olduğu ve uzunluklarının da 6-15 µm arasında değiştiği gözlenmiştir. Ayrıca, yuvarlak formda bol miktarda klamidospor oluşturdukları ve kısa monofialidik özellik gösterdikleri belirlenmiştir (Booth 1971; Nelson ve ark., 1983; Windels. 1992; Summerel ve ark., 2001).

CDA ortamında da bu izolatlar, PDA ortamında oluşturdukları koloni rengine benzer renkler oluşturmuşlardır. Ayrıca izolatların, makro ve mikrokonidi boyutları PDA ortamında yapılan ölçümlerle çok büyük oranda benzer olarak kaydedilmiştir. Bu izolatların tamamının her iki yapay besi ortamında oluşturdukları morfolojik özellikler, *Fusarium oxysporum*'ların tanı karakterleriyle aynı özellikte belirlenmiştir (Booth 1971; Nelson ve ark., 1983; Windels, 1992; Summerel ve ark., 2001).

Bütün Fom izolatları PDA ve CDA ortamında morfolojik olarak birbirine yakın özellikler göstermiştir. Fom 10 izolatının PDA ortamında koloni gelişimi ve sporulasyonu Şekil 4.10 ve 4.11'de gösterilmiştir.



Şekil 4.10. *Fusarium oxysporum* f. sp. *melongenae*'nın koloni gelişimi



Şekil 4.11. Patlıcan bitkisinden izole edilen *Fusarium oxysporum* f. sp. *melongenae*'nın makrokonidi ve mikrokonidi şekilleri (Bar 40 μm)

4.4. Acibenzolar-S-Methyl (ASM)'in Fom'un Miseliyal Gelişimine Etkisi

Bölüm 3.2.4'de belirtilen yönteme göre, bitki savunma aktivatörü ticari bir preparat olan, acibenzolar-S-methyl (ASM)'nin *in vitro*'da *Fusarium oxysporum* f. sp. *melongenae* (Fom 10)'nın miseliyal gelişimine etkisi araştırılmıştır. ASM uygulama dozlarının, Çizelge 4.9'dan da görüleceği gibi, Fom 10'un miseliyal gelişimine ve miseliyal kuru ağırlığına kontrole göre herhangi bir inhibitör etkide

bulunmadığı belirlenmiştir. ASM uygulama dozlarının, Fom 10'un miseliyal gelişimine etkisi yönünden önemli bir fark saptanmadığı için verilerin varyans analizi yapılmamıştır. Sonuçların güvenilirliği açısından aynı deneme tekrar kurulmuş ve benzer sonuçlar elde edilmiştir.

Ishii ve ark. (1999) yaptıkları *In vitro* denemeler sonucunda, acibenzolar-S-methyl (ASM)'in, patojen mikroorganizmaların miseliyal gelişimine önemli bir inhibitör etkide bulunmadığı, bu kimyasalın sadece bitkilerde dayanıklılığı uyardığı görüşünü savunmuşlardır.

Çizelge 4.9. Farklı ASM dozlarının Fom'un koloni gelişimine ve miseliyal kuru ağırlığı üzerine etkisi

Konsantrasyon	Koloni Çapı (mm)	Miseliyal Kuru Ağırlık (g)
0.5 mM	81.25	0.71
1.0 mM	82.83	0.69
2.0 mM	81.38	0.67
3.0 mM	82.38	0.72
Kontrol	82.00	0.73
Ortalama	81.97	0.70

4.5. Farklı Patlıcan Çeşitlerinin Fusarium Solgunluk Hastalığına Reaksiyonu

Farklı patlıcan çeşitlerinin Fusarium solgunluğuna reaksiyonunu belirlemede inokulasyonlarda virulensliği yüksek Fom 10 izolatı kullanılmıştır. Bölüm 3.2.5'de belirtilen yönteme göre, Faselis F_1, İrena F_1, Pala, Kemer ve Adana Topağı çeşitlerinin Fusarium solgunluğuna tepkileri, yaprak ve vasküler renklenme simptomlarına göre değerlendirilmiştir. İstatistiksel analizler sonucunda, Fusarium solgunluğuna en duyarlı çeşidin "Pala" patlıcan çeşidi olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.10). Bu çeşitlerin vasküler renklenme simptomlarının, yaprak simptomlarından daha spesifik sonuç verdiği belirlenmiştir.

Yaprak simptomlarına göre Faselis F_1, İrena F_1, Kemer ve Adana Topağı patlıcan çeşitleri ortalama 3.14 hastalık indeksi değerleriyle aynı grupta yer alırken, vasküler renklenme simptomlarına göre İrena F_1 ve Kemer çeşitleri ayrı bir grup oluşturmuştur.

Çizelge 4.10. Yaprak ve vasküler renklenme simptomlarına göre farklı patlıcan çeşitlerinde Fusarium solgunluk hastalığının gelişimi

Çeşitler	Hastalık İndeksi Değerleri	Hastalık Şiddeti (%)	İletim Demetlerinde Gelişme Hızı (cm)
Faselis F_1	2.82 a*	70.50	18.69 a
İrena F_1	3.23 a	80.75	23.59 c
Pala	3.75 b	93.75	30.34 d
Kemer	3.04 a	76.00	22.78 c
Adana Topağı	2.87 a	71.75	21.29 b
Ortalama	**3.14**	**78.55**	**23.33**

*Farklı harf içeren ortalamalar Duncan ($p \leq 0.05$) testine göre istatistiksel olarak farklıdır.

Ayrıca patojenin bitkide ilerleme hızı belirlenmiş ve iletim demetlerinde renklenmenin gözlendiği en son noktanın birkaç cm üzerinden patojen izole edilebilmiştir (Çizelge 4.11). Ayrıca bu çeşitlerin Fusarium solgunluğuna reaksiyonu, Şekil 4.12 ve 4.13'de gösterilmektedir.

Çizelge 4.11. Fom ile inokule edilen patlıcan çeşitlerinde Fusarium solgunluk hastalığının infeksiyon gelişimi (cm)

Çeşitler	G Ü N L E R											
	5			7			14			21		
	İnfeksiyon Gelişimi (cm)											
	5	8	10	10	15	20	20	25	30	30	35	40
Faselis F_1	+	+	–	+	+	+	–	–	–	–	–	–
	+	+	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–
İrena F_1	+	+	–	+	+	–	–	–	–	–	–	–
	+	+	–	+	+	–	+	–	–	–	–	–
Pala	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–	–	–
	+	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–	–
Kemer	+	+	–	+	+	–	–	–	–	–	–	–
	+	+	–	+	+	+	–	–	–	–	–	–
Adana Topağı	+	+	–	+	+	+	–	–	–	–	–	–
	+	+	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–



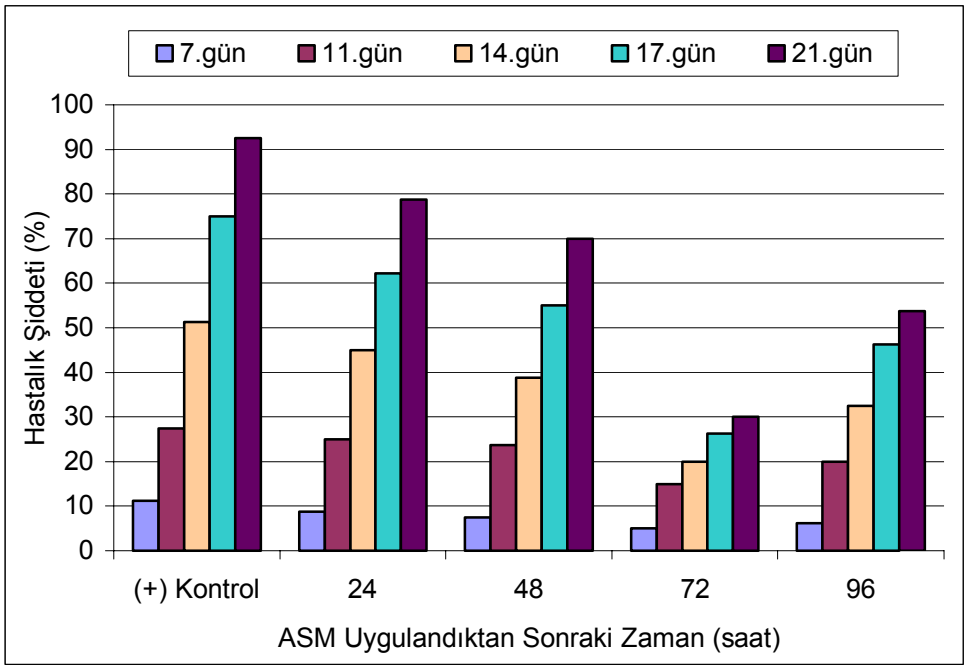
Şekil 4.12. **"**Kemer ve Pala" patlıcan çeşitlerinin Fusarium solgunluk hastalığına gösterdikleri reaksiyon



Şekil 4.13. "Adana Topağı, Faselis F_1 ve İrena F_1" patlıcan çeşitlerinin Fusarium solgunluk hastalığına gösterdikleri reaksiyon

4.6. Patlıcanda Fusarium Solgunluk Hastalığına Karşı Dayanıklılığın Uyarılması Çalışmaları

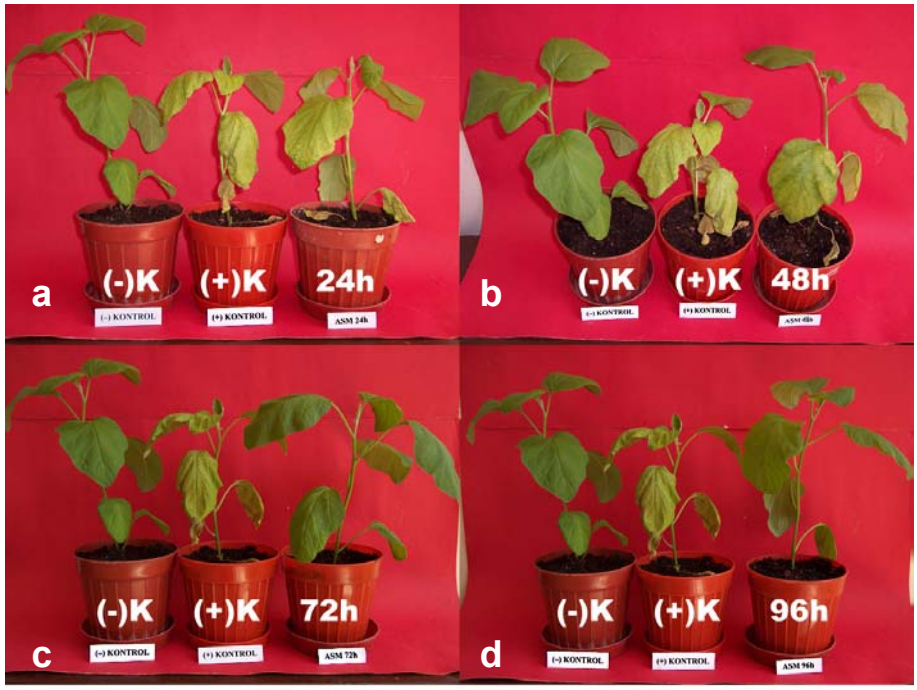
Dayanıklılık uyarıcı ASM patojen olmayan (FOM)'un uygulama şekli ve patojen inokulasyonu (Fom 10) Bölüm 3.2.6'da belirtildiği şekilde yapılmıştır. ASM ve FOM uygulandıktan 24, 48, 72 ve 96 saat sonra patojen uygulaması sonucu bitkilerde gözlenen makroskobik simptomlar, inokulasyondan sonraki 7., 11., 14., 17. ve 21. günlerde değerlendirilmiştir (Dickinson ve Lucas, 1982; Louws ve ark., 2001; Baysal ve ark., 2003). Dayanıklılık uyarıcılar uygulandıktan sonra belirlenen zaman aralıklarında patojen inokulasyonu yapılıp, bitkide patojene karşıt bir reaksiyon olarak gelişen SAR mekanizmasının en aktif olduğu optimum zaman aralığı belirlenmiştir (Şekil 4.14).



Şekil 4.14. Acibenzolar-S-methyl (ASM) uygulandıktan 24, 48, 72 ve 96 saat sonra patojen inokulasyonu sonucu Fusarium solgunluk hastalığının gelişimi

Şekil 4.14'de görüldüğü gibi, Fom 10'un 24, 48, 72 ve 96 saat sonra inokule edilmesi sonucunda inokulasyon zamanına bağlı olarak bitkilerde farklı reaksiyonlar gelişmiştir. Bütün zaman aralıklarında hastalık şiddeti azalma gösterse de, Fom 10 inokulasyonundan 72 saat önce ASM uygulaması, hastalığın en yüksek oranda baskı

altına alındığı uygulama zaman aralığı olarak belirlenmiştir. İlk simptomlar inokulasyondan sonra 7. günde, (+) kontrol bitkilerinde ince damarlarda hafif renk açılması şeklinde gözlenmiştir. (+) kontrol bitkilerinde 21. günde yapılan değerlendirmelerde hastalık şiddeti % 92.5 oranında iken, ASM uygulamasından 72 saat sonra patojen inokule edilen bu bitkilerde hastalık şiddeti % 30 olarak saptanmıştır. ASM uygulamasından 24, 48 ve 96 saat sonra Fom 10 inokulasyonlarının bitkilerde hastalık şiddetini azaltmada 72. saat inokulasyonları kadar etkin olmadığı gözlenmiştir. Bu durumda, SAR'ın tetiklenmesi için yeterli sürenin sağlanamadığı ve ASM uygulamasından 72 saat sonra patojen inokulasyonunun, SAR mekanizmasının tetiklenmesi için optimum zaman aralığı olduğu düşünülebilir. Şekil 4.15'de ASM uygulandıktan 24, 48, 72 ve 96 saat sonra patojen inokulasyonu sonucu Fusarium solgunluk hastalığı gelişimi gösterilmektedir.

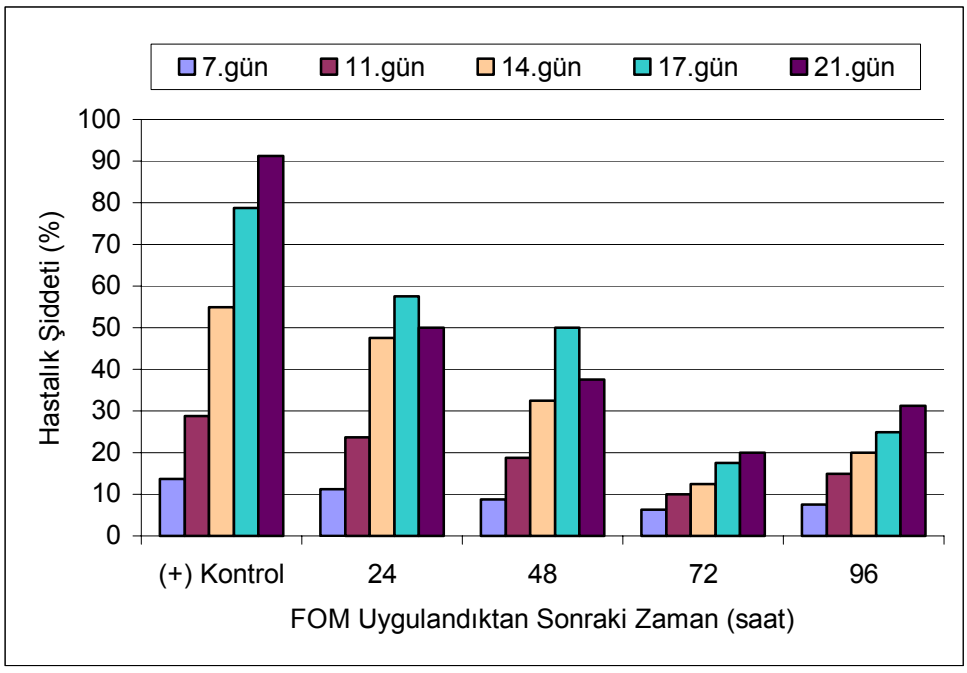


Şekil 4.15. Acibenzolar-S-methyl (ASM) uygulandıktan 24, 48, 72 ve 96 saat sonra patojen inokulasyonu sonucunda Fusarium solgunluk hastalığına patlıcan bitkilerinin gösterdikleri reaksiyon (a:24h; b:48h; c:72h; d:96h)

Deneme sonuçlandırıldığında ASM uygulanan bitkiler, (+) kontrol bitkilere oranla daha uzun bir sürede ölüme gitmişlerdir. Önce pozitif kontrol bitkileri, ardından yaklaşık bir aylık bir sürede sırasıyla, 24, 48, 96 ve en son olarak da 72 saat

sonra inokule edilen bitkiler ölmüştür. Benzer bir çalışmada, domateste bakteriyel kansere neden olan *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'e karşı ASM'in etkinliği araştırılmış ve en düşük hastalık oranı, ASM uygulandıktan 72 saat sonra yapılan patojen inokulasyonları sonucunda elde edilmiştir. Kang ve Buchenauer (2001), ASM uygulaması yapılan bitkilerde peroksidaz ve kitinaz aktivitelerinde önemli artış olduğunu ve ASM uygulamasının, *Fusarium* sporlarının çim tüpü uzamasını engellediği ve penetrasyonu tamamen durdurduğunu bildirmişlerdir.

Dayanıklılık uyarıcı biyotik bir faktör olarak patlıcanda patojen olmayan *Fusarium* (FOM; *F. oxysporum* f. sp. *melonis*) ve patojen inokulasyonları da, Bölüm 3.2.6'da belirtildiği şekilde yapılmıştır. ASM uygulamasında olduğu gibi, uygulama zamanına bağlı olarak bitkilerde hastalığın gelişiminde farklı reaksiyonlar gözlenmiştir (Şekil 4.16).

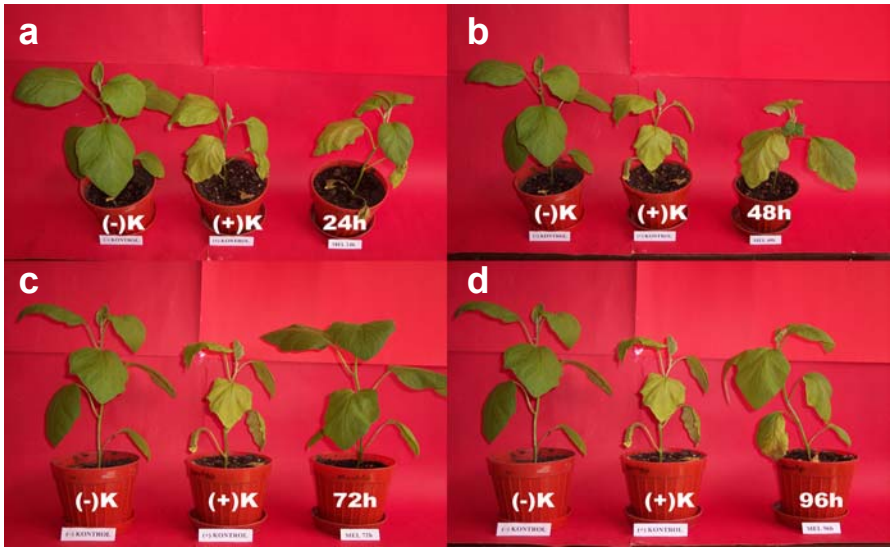


Şekil 4.16. *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* (FOM) uygulandıktan 24, 48, 72 ve 96 saat sonra patojen inokulasyonu sonucu patlıcan bitkisinde Fusarium solgunluk hastalığının gelişimi

Pozitif kontrol bitkilerinde patojen inokulasyonundan sonraki 7. günde ilk simptomlar, hafif nekroz ve ince damarlarda renk açılması şeklinde gözlenmiştir. İnfeksiyonun ilerleyen dönemlerinde (+) kontrol bitkilerinde hastalık şiddeti

% 90'lara ulaşarak, şiddetli solgunluk gelişimi 21. günde pozitif kontrol bitkilerin tamamen ölümüne neden olmuştur. Bütün zaman aralıklarında hastalık şiddeti azalma gösterse de, Fom 10 inokulasyonundan 72 saat önce, FOM uygulama zaman aralığının hastalığın baskılanmasında en etkin zaman aralığı olduğu belirlenmiştir.

FOM uygulamasından 24, 48 ve 96 saat sonra patojen inokulasyonuyla da hastalığın gelişiminde azalma sağlanmış ancak, 72 saat sonra yapılan inokulasyonlar kadar hastalığın baskılanmasında etkin olmamıştır (Şekil 4.16). Deneme sonuçlandırıldığında, pozitif kontrol bitkileri kısa bir süre içerisinde ölürlerken, FOM inokule edilen bu bitkiler daha geç ölüme gitmişlerdir. FOM inokule edilen bütün bitkiler belirli oranlarda hastalanmışlar, ancak ASM uygulanan bitkilere oranla daha geç ölüm görüntüleri sergilemişlerdir. Patojen inokulasyon zaman aralığına bağlı olarak yaklaşık üç aylık bir sürede sırayla, 24, 48, 96 ve 72 saat sonra patojen inokule edilen bitkiler ölüm görüntüleri sergilemişlerdir. Şekil 4.17'de *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* (FOM) uygulandıktan 24, 48, 72 ve 96 saat sonra patojen inokulasyonu sonucu Fusarium solgunluk hastalığı gelişimi gösterilmektedir.

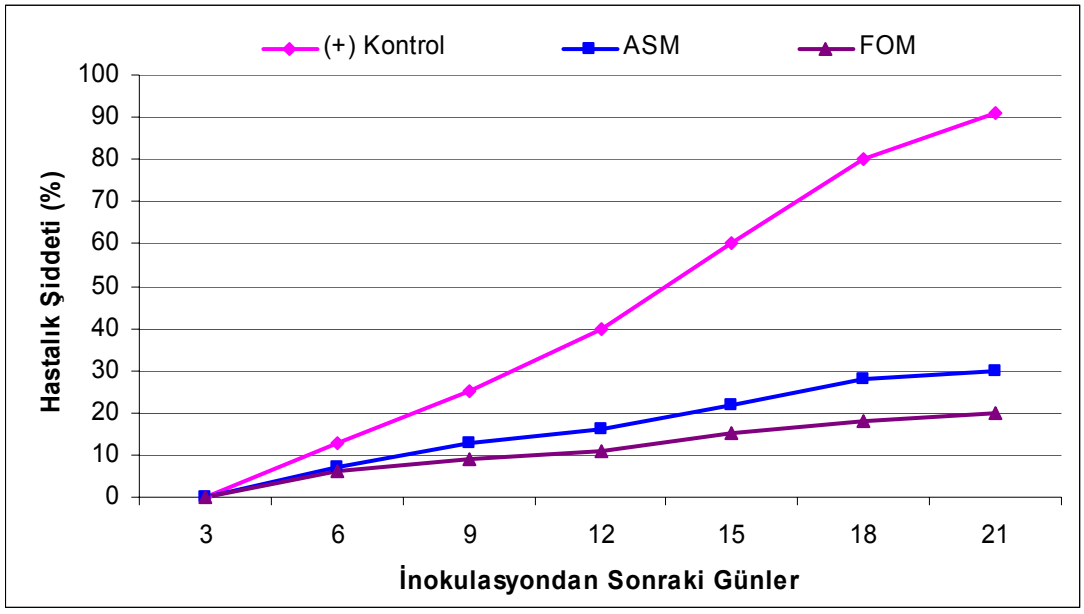


Şekil 4.17. *F. oxysporum* f. sp. *melonis* (FOM) uygulandıktan 24, 48, 72 ve 96 saat sonra patojen inokulasyonu sonucunda Fusarium solgunluk hastalığına patlıcan bitkilerinin gösterdikleri reaksiyon (a:24h; b:48h; c:72h; d:96h)

4.6.1. ASM ve FOM Uygulamasından 72 Saat Sonra Patojen İnokulasyonu ile Dayanıklılığın Uyarılması

Patlıcan bitkilerine dayanıklılık uyarıcılar uygulandıktan 72 saat sonra patojen inokulasyonunun, SAR mekanizmasının uyarılması için optimum zaman aralığı olduğu belirlenmiştir. Hastalığın baskılanma mekanizmasını daha ayrıntılı olarak araştırabilmek amacıyla bu optimum zaman aralığına yönelik daha büyük çapta bir deneme kurulmuştur. Bu denemede de, dayanıklılık uyarıcılar ve patojen inokulasyonu Bölüm 3.2.6'da belirtildiği şekilde yapılmıştır.

Patojen inokulumu verildikten sonra üç hafta boyunca, periyodik olarak 3'er gün aralıklarla yaprak simptomlarına göre bitkiler derecelendirilmiştir. ASM, FOM ve kontrol amacıyla steril distile su uygulanan bu bitkilerde, Fusarium solgunluk hastalığının ilerleme grafiği Şekil 4.18'de verilmiştir.



Şekil 4.18. ASM ve FOM uygulamasından 72 saat sonra patojen inokulasyonu sonucu patlıcanda Fusarium solgunluk hastalığının gelişimi

Şekil 4.18'den de görüldüğü gibi ASM ve FOM uygulanan bitkilerde Fusarium solgunluk hastalığının gelişiminin (+) kontrole göre önemli oranda azaldığı gözlenmiştir. Denemenin son gününde (21. gün) bitkiler, yaprak simptomlarına göre

derecelendirilmiş ve yapılan istatistiksel analizlerin sonucu Çizelge 4.12'de verilmiştir. FOM uygulamasının, 0.53 hastalık indeksi değeriyle Fusarium solgunluk hastalığını önlemede % 75.47 oranında etkin olduğu belirlenmiştir. ASM uygulamasının ise, 0.70 hastalık indeksi değeriyle hastalık oluşumunu azaltmada % 67.60 oranına etki göstermiştir. Patlıcan bitkilerinde Fusarium solgunluk hastalığına karşı dayanıklılık mekanizmasının uyarılmasında patojen olmayan *Fusarium* (FOM) uygulamasının, ASM uygulamasından daha etkin olduğu belirlenmiştir. Yaprak simptomlarına göre hastalık değerlendirmesinin yanı sıra, bu bitkilerin iletim demetlerinde kahverengileşme simptomları da değerlendirilmiş ve benzer sonuçlar alınmıştır. Pozitif kontrol bitkilerinde vasküler renklenme 30 cm'ye kadar çıkarken, FOM uygulamasıyla kahverengileşme % 50 oranında azalmıştır. ASM uygulaması sonucunda ise vasküler renklenmenin 20 cm civarında kaldığı belirlenmiştir.

Çizelge 4.12. ASM ve FOM uygulamasından 72 saat sonra patojen inokule edilen bitkilerde vasküler renklenme simptomlarına göre hastalık değerlendirmesi

Uygulamalar	Vasküler Renklenme (cm)	Hastalık İndeksi Değerleri	% Etki
ASM	20.50 a*	0.70 a	67.60
FOM	16.53 b	0.53 a	75.47
KONTROL	30.56 c	2.16 b	-

*Farklı harf içeren ortalamalar Duncan ($p \leq 0.05$) testine göre istatistiksel olarak farklıdır.

Hastalığın baskılanmasında her iki denemede de SAR mekanizmasının etkin hale geçebilmesi için optimum zaman aralığı, dayanıklılık uyarıcılar uygulandıktan 72 saat sonra patojen inokulasyonu olarak belirlenmiştir. Bu denemelerin sonucunda, Fusarium solgunluk hastalığına karşı dayanıklılık mekanizmasının uyarılmasında FOM uygulamasının ASM uygulamasından daha etkin olduğu belirlenmiştir.

Dayanıklılık uyarıcılara bitkilerin gösterdikleri reaksiyonlar, uyumlu reaksiyon (duyarlılık), uyumsuz reaksiyon (dayanıklılık) ve kısmi uyumsuz reaksiyon (orta derecede duyarlı) olarak adlandırılmaktadır (Dickinson ve Lucas,

1982). Patlıcanda Fusarium solgunluk hastalığına karşı dayanıklılığın uyarılmasına yönelik olarak yapılan bu çalışmada, her iki dayanıklılık uyarıcı için de, 72 saat sonra patojen inokulasyonunun SAR mekanizmasının tetiklenmesi için optimum zaman aralığı olduğu saptanmış ve bitkilerde gözlenen reaksiyonun uyumsuz bir reaksiyon (dayanıklılık) olduğu belirlenmiştir.

Dayanıklılığın oluşmasında ilk aşama, patojenin hissedilmesi ve konukçu bitki ve patojen arasında bazı sinyalizasyon olaylarının başlamasıdır. Konukçu bitkilerde bulunan dayanıklılık mekanizmasını harekete geçiren uyarıcılara elisitör adı verilmektedir (Hahlbrock ve Scheel, 1987; Ebel ve Cosio 1994). Abiyotik ve biyotik uyarıcılar patojen ve konukçu bitkideki reseptörleri arasındaki etkileşimi aktif hale geçirilmekte ve konukçuda bulunan ve dayanıklılığı yöneten dayanıklılık genleri harekete geçirilmektedir (Hahlbrock ve Scheel, 1987; Isaac, 1992; Ebel ve Cosio, 1994).

Benzer bir çalışmada Biles ve Martyn (1989), karpuzda Fusarium solgunluğuna karşı karpuzda patojen olmayan *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum*'u patojen inokule edilmeden 72 saat önce inokule etmişler ve patojen olmayan *Fusarium* uygulamasının karpuz bitkilerinde dayanıklılığı teşvik ederek solgunluk simptomlarını önemli oranda azalttığını bildirmişlerdir. Kavunda Fusarium solgunluk hastalığına (*F. oxysporum* f. sp. *melonis*) karşı patojen olmayan iki izolatın dayanıklılığı yüksek oranda teşvik ederek, hastalık çıkışını azalttığını bildirmiştir (Erzurum ve Maden, 1995).

Benzer başka bir çalışmada, domateste Fusarium solgunluğuna karşı dayanıklılık uyarıcı olarak patojen olmayan *Fusarium* türü (Fo47)'nün patojenden önce inokulasyonlarının, hastalığın baskılanmasında oldukça etkin olduğu ve bu bitkilerde dayanıklılığın sistemik olarak uyarıldığı bildirilmiştir. Ayrıca Fo47 ile inokulasyonun bitkideki kitinaz ve β-1-4-glukosidaz seviyesini artırdığı, bunun da dayanıklılığı desteklediği bildirilmiştir (Fuchs ve ark., 1997).

Bu çalışmada da, dayanıklılık uyarıcılar uygulandıktan 72 saat sonra patojen inokulasyonuyla, patlıcan bitkilerinde dayanıklılığı yöneten genlerin harekete geçirildiği söylenebilir. Elde edilen bulgulardan, ASM ve FOM uygulamalarının patojenin başlangıç penetrasyonunu engellemediği ancak, bitkinin savunma

mekanizmasını tetikleyerek, hastalık oluşumunu baskı altına aldığı sonucuna varılmıştır. Ayrıca bu denemedeki bitkilerden elde edilen bitki ekstraktlarının, *F. oxysporum* f. sp. *melongenae* (Fom)'nin konidi çimlenmesine etkileri araştırılmıştır. Bunun yanı sıra, yine bu bitkilerden alınan, yaprak, gövde ve kök örneklerinde infekteli dokularda, infeksiyon ve reaksiyon yerlerinde sentezlenen lignin oluşumlarının varlığı araştırılmıştır (Gahan, 1984; Vallet ve ark., 1996; Soylu, 1999).

4.6.1.1. Dayanıklılığın Uyarıldığı Bitkilerden Elde Edilen Ekstraktların Fom'un Konidi Çimlenmesi Üzerine Etkisi

ASM ve FOM uygulamasından 72 saat sonra patojen inokulasyonu ile dayanıklılığın uyarılmasına yönelik kurulan denemenin sonuçları alındıktan sonra, bu bitkilerden Bölüm 3.2.6.1'de belirtildiği şekilde bitki örnekleri alınmış ve elde edilen bitki ekstraktlarının Fom izolatlarının konidi çimlenmesine etkileri mikroskobik çalışmalarla incelenmiştir.

Denemede, herhangi bir dayanıklılık uyarıcının uygulanmadığı sağlıklı bitkilerden elde edilen ekstraktların, konidi çimlenmesine etkisinin belirlenmesinin yanı sıra kontrol amacıyla sadece spor içeren Czapek Dox besi ortamı damlatılmış lamlar da mikroskopta incelenerek çim tüpü uzunlukları ölçülmüş ve bu ölçüm değerleri üzerinden elde edilen ortalamalar birbirleriyle karşılaştırılmıştır (Çizelge 4.13). Czapek Dox sıvı besi ortamında çimlenmeye bırakılan sporlar mikroskop altında 2'şer saat aralıkla incelenerek konidilerin çimlenip çimlenmedikleri kontrol edilmiştir. Yapılan gözlemler sonucunda, çim borucuklarının birbirleriyle karışmayacak düzeydeki uzunluklarının gözlendiği an (9 saat) ölçüm zamanı olarak belirlenmiştir. Czapek Dox sıvı besi ortamında çimlenen konidilerin çim tüpü uzunluk ortalaması, 16.96 µm olarak saptanmıştır. Diğer uygulamalardaki ortalamaların bu değerden oldukça yüksek olması bitki ekstraktlarının patojenin konidi çimlenmesini belirli oranlarda teşvik ettiğini göstermektedir. Ancak bu ortalama (16.69 µm), istatistiksel olarak farklı sonuçların ortaya çıkmasına neden olacağı için varyans analizine alınmamıştır.

Çizelge 4.13. Bitki ekstraktlarının Fom'un konidi çimlenmesine olan etkileri (%)

Uygulamalar	Çim tüpü Uzunluğu (μm)	% Etki
ASM	25.14 a*	56.33
FOM	30.50 b	47.03
(+) Kontrol	40.62 c	29.45
(–) Kontrol	57.86 d	-

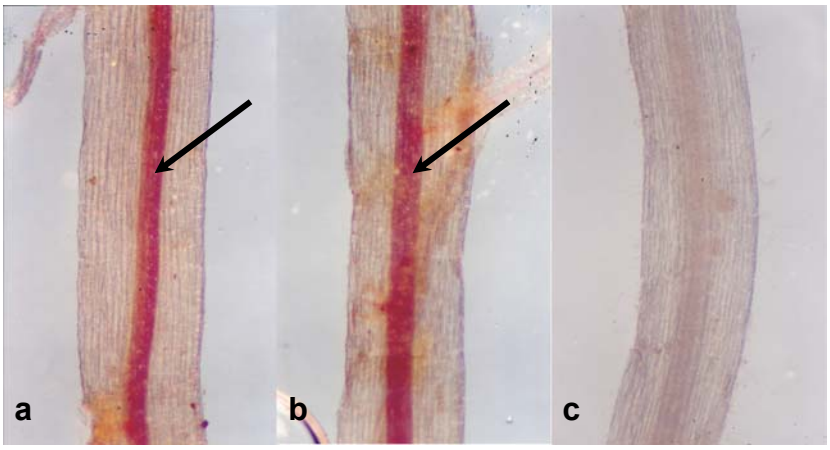
*Farklı harf içeren ortalamalar Duncan ($p \leq 0.05$) testine göre istatistiksel olarak farklıdır.

Çizelge 4.13'den de görülebileceği gibi çim tüpü uzunlukları üzerinden yapılan istatistiksel analizler sonucunda, (+) kontrol, (-) kontrol, ASM ve FOM uygulanmış bitkilerden elde edilen ekstraktların, patojenin çim tüpü uzunluğuna etkilerinin farklı olduğu saptanmıştır. En yüksek çim tüpü uzunluk ortalaması herhangi bir dayanıklılık uyarıcı veya patojen inokulasyonu yapılmayan sağlıklı bitki ekstraktlarından elde edilmiştir (57.86 μm). Çim tüpü uzunluğunu engellemede en yüksek etkiyi 25.14 μm'lik ortalama ile ASM uygulanan bitki ekstraktları göstermiş, bunu 30.50 μm'lik ortalama ile FOM uygulanan bitki ekstraktları izlemiştir. Bu sonuçlar bize dayanıklılık uyarıcılar uygulandıktan sonra bitkide antifungal bazı bileşiklerin sentezlenerek, patojenin konidi çimlenmesi üzerinde olumsuz etkide bulunduğu yönünde bir fikir vermektedir. Ancak patojen inokule edilen bitkilerden elde edilen ekstraktların, herhangi bir dayanıklılık uyarıcının uygulanmadığı sağlıklı bitkilerden elde edilen ekstraktlara göre fungusun konidi çimlenmesini inhibe etmesi, patojen inokule edilen bu bitkilerde bazı inhibitör maddelerin patojene karşıt bir reaksiyon olarak düşük oranlarda da olsa sentezlenebildiğini göstermektedir. Sağlıklı bitki ekstraktlarında çim tüpü uzunluklarının yüksek değerlerde saptanması hücre içeriğinin patojenin gelişimine katkıda bulunabildiğine işaret etmektedir. Acibenzolar-S-methyl'in *Fusarium* spp.'lerin konidi çim tüpü oluşumunu azalttığı ve bitkide dayanıklılık mekanizmasını uyararak bazı hastalıkların gelişimini engellediği birçok araştırıcı tarafından bildirilmiştir (Kang ve Buchenauer 2001; Bokshi ve ark., 2003). Benzer bir çalışmada, domateste Fusarium solgunluğu'na karşı ASM uygulamasının, *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* sporlarının çim tüpü uzamasını engellediği ve penetrasyonu tamamen durdurduğu elektron mikroskop çalışmalarıyla belirlenmiştir (Kang ve Buchenauer, 2001).

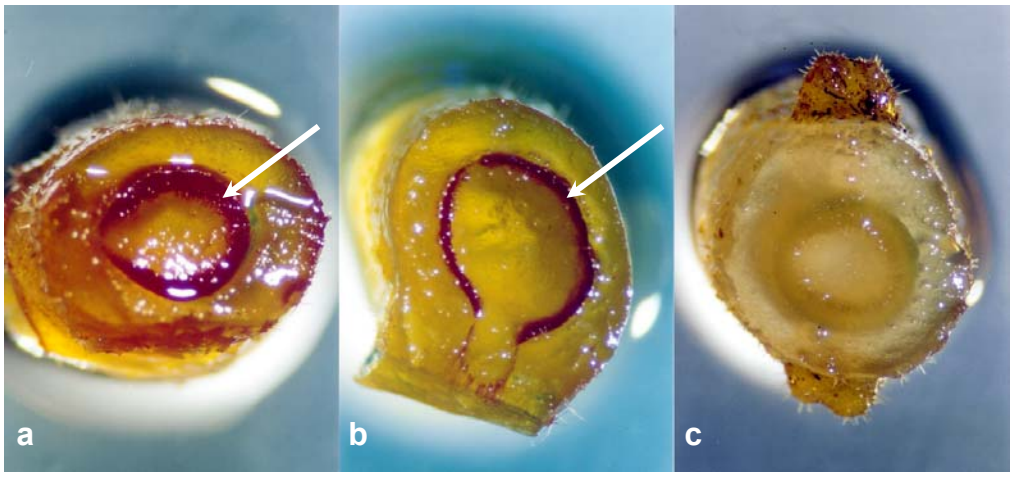
4.6.1.2. Histokimyasal Boyamalarla Lignin Sentezinin Belirlenmesi

ASM ve FOM uygulandıktan 72 saat sonra patojen (Fom 10) inokulasyonunun, SAR mekanizmasının uyarılması için optimum zaman aralığı olduğu belirlenmiş ve dayanıklılığın maksimum seviyede uyarıldığı bu bitkilerden alınan dokularda, Bölüm 3.2.6.2'de belirtilen yönteme göre, ligninin histokimyasal lokasyonu belirlenmiştir.

ASM ve FOM uygulanan bu bitkilerde, lignifikasyonun yoğunluğunda ve dağılımında farklılıklar gözlenmiştir. Lignin oluşumları, Hipersensitif Reaksiyon (HR) göstererek ölmüş hücreler ile bu hücrelerin etrafında bulunan ksilem demetlerinde en karakteristik olarak gözlenmiştir. Her iki dayanıklılık uyarıcı için de, patojen inokulasyonundan sonraki ilk beş günde, henüz HR tam olarak oluşmadığı için bu dokularda ligninin daha az sentezlendiği, yapılan boyamalarla belirlenmiştir. İnfeksiyonun ilerleyen dönemlerinde, patojen inokulumu verildikten sonraki 8. ve 10. günde, özellikle HR'nin arttığı hücrelerde, lignin boyama şiddeti de artmıştır (Şekil 4.19 ve 4.20). FOM inokule edilen bitkilerin kök dokularında 10. günde lignin boyama şiddetinin, ASM uygulanan bitkilerden daha yoğun olduğu gözlenmiştir. Hastalık ilerleme grafiği belirlenen bu bitkilerde, FOM inokulasyonun hastalığın baskılanmasında, ASM uygulamasından daha etkin olduğu saksı denemeleriyle belirlenmiştir. Dayanıklılığın uyarıldığı bu bitkilerde infekteli dokularda infeksiyon ve reaksiyon yerlerinde sentezlenen lignin yoğunluğu, saksı denemelerinden elde edilen sonuçları destekler niteliktedir. Bitkilerin avirülent fungal patojenler veya elisitörler ile uygulanmaları sonucu reaksiyon noktalarında fenolik ve lignin benzeri materyallerin biriktiği birçok araştırıcı tarafından bildirilmiştir (Hornby ve Fitt, 1981; Aist, 1983; Stoltzenburg ve ark., 1984a; Nicholson ve Hammerschmidt, 1992). Abiyotik ve biyotik uyarıcılarla dayanıklılığın uyarıldığı bitkilerde, bitki hücre duvarında fenolik bileşiklerden lignin oluşumu, hücre duvarının mekanik gücünü arttırmakta ve fungal enzimlere karşı duyarlılığı azaltmaktadır. Bitki hücre duvarlarında sentezlenen lignin oluşumları, histokimyasal boyamalar ile belirlenebilmektedir (Aist, 1983; Gahan, 1984; Biggs ve Miles, 1988; Isaac, 1992; Vallet ve ark., 1996).



Şekil 4.19. ASM ve FOM uygulanan bitkilerin köklerinde infeksiyon ve reaksiyon yerlerinde ligninlenmiş dokular (a: ASM; b: FOM; c: Kontrol)



Şekil 4.20. ASM ve FOM uygulanan bitkilerin gövdelerinde infeksiyon ve reaksiyon yerlerinde ligninlenmiş dokular (a: ASM; b: FOM; c: Kontrol)

Patojene karşı bir duyarlılık tepkimesi olan HR, birçok araştırıcı tarafından yıllar önce konukçu bitki hücrelerinde gözlenmiş ve patojen infeksiyonu sonucu konukçu bitkinin patojeni tanımasının ardından, patojen ve konukçu bitki arasında uyumsuz bir ilişkinin sonucunda oluştuğu bildirilmiştir. Bu hızlı hücre ölümleri patojenin infeksiyon noktasında durdurulmasında oldukça etkili olup, patojen saldırısından sonra ne kadar hızlı hücre ölümü olursa, bitki o kadar çok infeksiyona dayanıklılık kazanmaktadır (Dixon, 1986; Dixon ve Harison, 1990; Isaac, 1992).

4.7. Arazi Denemeleri

Saksı denemelerinde ASM ve FOM uygulamalarının Fusarium solgunluk hastalığının baskılanmasında önemli oranda etkili oldukları belirlenmiş ve bu uyarıcıların, arazi koşullarında da etkinlikleri araştırılmıştır. Bu amaca yönelik olarak, üretici yüksek tünelinde ve açık alanda iki deneme kurulmuştur. Her iki denemede de ASM ve FOM Bölüm 3.2.7'de belirtildiği gibi uygulanmış ve aynı parametreler değerlendirilmiştir.

4.7.1. Üretici Yüksek Tünelinde Arazi Denemesi

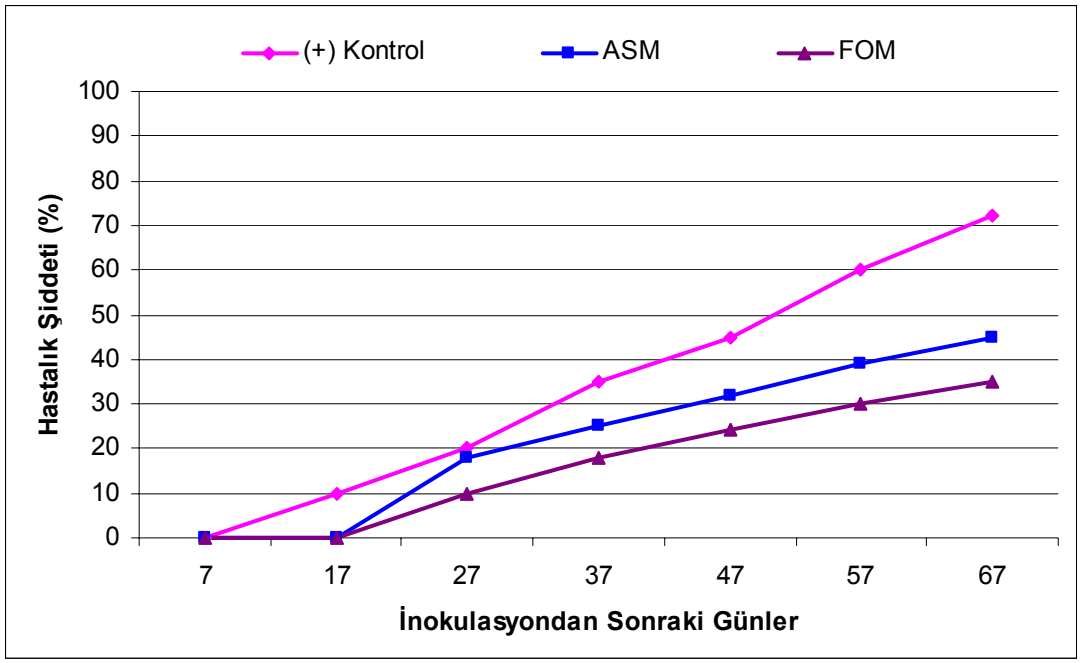
Patojen inokulasyonundan sonra, ASM ve FOM uygulanan bitkilerde patojenin bitkinin üst kısmına doğru iletim demetini infekte edebildiği en üst noktayı belirlemek için, patojen inokule edildikten bir hafta sonra 10 gün aralıklarla deneme sonuçlandırılana kadar, yaprak sapından örnekler alınmış ve alınan bu örneklerden izolasyonlar yapılarak patojenin infeksiyon hızı belirlenmiştir (Çizelge 4.14).

Üretici yüksek tünelinde, inokulasyondan sonraki 7. günde yaprak saplarından yapılan izolasyonlarda ASM, FOM ve pozitif kontrol bitkilerinden patojen izole edilememiştir. Patojen ilk olarak, inokulasyonundan sonraki, 17. günde, 15 cm'den izole edilebilmiştir. ASM ve FOM uygulanan bitkilerin yaprak saplarından 27. günde yapılan izolasyonlarda, ise patojen en son 25 cm'den izole edilebilmiştir. Pozitif kontrol bitkilerinde ise patojen en son 57. günde yapılan izolasyonlarda 55 cm'den izole edilebilmiştir. ASM ve FOM uygulanan bitkilerde hastalık gelişiminin pozitif kontrole göre daha yavaş ilerlediği belirlenmiştir. Her iki dayanıklılık uyarıcının da, patojenin başlangıç penetrasyonunu engellemediği ancak, infeksiyon hızını yavaşlattığı gözlenmiştir.

Ayrıca, yaprak simptomlarına göre değerlendirilen bu bitkilerin, hastalık indeksi değerleri üzerinden % hastalık şiddetleri hesaplanmıştır. ASM, FOM ve kontrol bitkilerinde Fusarium solgunluk hastalığının ilerleme grafiği Şekil 4.21'de verilmiştir.

Çizelge 4.14. Üretici yüksek tünelinde ASM ve FOM uygulamasının patojenin infeksiyon hızı üzerine etkisi (cm)

Uygulamalar	G Ü N L E R																				
	7			17			27			37			47			57			67		
	İ n f e k s i y o n H ı z ı (c m)																				
	10	15	20	15	20	25	25	30	35	35	40	45	45	50	55	55	60	65	65	70	75
ASM	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	–	–	–	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	–	–	–	+	+	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	–	–	–	+	+	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
FOM	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	–	–	–	+	+	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	–	–	–	+	+	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
(+) Kontrol	–	–	–	+	+	–	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	–	–	–	–	–
	–	–	–	+	–	–	+	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–
	–	–	–	+	–	–	+	+	–	+	+	–	+	+	–	–	–	–	–	–	–
	–	–	–	+	+	–	+	–	–	+	+	+	+	+	–	–	–	–	–	–	–
	–	–	–	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–	–
	–	–	–	+	+	–	+	+	+	+	+	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–
	–	–	–	+	+	–	+	–	+	+	+	–	+	+	–	–	–	–	–	–	–
	–	–	–	+	–	–	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	–	–	–	–	–



Şekil 4.21. Üretici yüksek tünelinde ASM ve FOM uygulamalarının patlıcanda Fusarium solgunluk hastalığının gelişimine etkisi

ASM, FOM ve kontrol amacıyla steril distile su uygulanan bitkiler, patojen inokule edildikten bir hafta sonra deneme sonuçlandırılana kadar 10 gün aralıklarla yaprak simptomlarına göre değerlendirilmiştir. Şekil 4.21'de görüldüğü gibi patojen inokulumu verildikten sonraki 17. günde yapılan değerlendirmelerde, ASM ve FOM uygulanan bitkilerde Fusarium solgunluğuna rastlanmazken, pozitif kontrol bitkilerinde ise hastalık şiddeti % 10.0 olarak saptanmıştır. ASM ve FOM uygulanan bitkilerde, patojen inokulumu verildikten sonraki 27. günde yapılan değerlendirmelerde ilk simptomlar gözlenmiş ve hastalık şiddetinin sırasıyla, % 18.0 ve % 10.0 olduğu belirlenmiştir.

Deneme süresince (+) kontrol bitkilerinde hastalık gelişiminde önemli oranda artış gözlenirken, ASM ve FOM uygulanan bitkilerde hastalığın gelişiminde yavaşlama gözlenmiştir. Denemenin son değerlendirmesinin yapıldığı 67. günde (+) kontrol bitkilerinde hastalık şiddeti % 80'lere ulaşırken, FOM uygulanan bitkilerde hastalık gelişiminde % 50 oranında azalma saptanmıştır.

Çizelge 4.15'de denemenin son değerlendirmesinin yapıldığı 67. günde ASM ve FOM'un % hastalık şiddetine bitki gelişimine etkileri verilmiştir. FOM uygulaması 1.60 hastalık indeksi değeriyle hastalığın önlenmesinde % 50.61 oranında etkili olurken, ASM uygulamasının ise 2.02 hastalık indeksi değeriyle % 37.65 oranında etkili olduğu saptanmıştır. Ayrıca dayanıklılık uyarıcıların patlıcan bitkisinin gelişimi üzerine etkilerini belirlemek için, deneme sonuçlandırıldığında bitki boyları ölçülerek kaydedilmiştir. İstatistiksel analizler sonucunda, Çizelge 4.15'den de görülebileceği gibi sağlıklı kontrolde bitkilerin boyları yaklaşık olarak 95 cm'ye kadar ulaşırken, patojen inokulumu verilen bitkilerde hastalığın hızlı bir şekilde ilerlemesi nedeniyle, bitkilerin boyları % 50 oranında kısalmıştır. FOM uygulamasının, hastalığın baskılanmasında, ASM uygulamasından daha etkin olduğu hastalık değerlendirmeleriyle belirlenmiştir. Ancak bu uygulamaların bitki boyuna etkileri değerlendirildiğinde, tersi durum söz konusu olmuştur. Bunun sonucu olarak, ASM'nin bitki aktivatörü olarak bitki gelişimine olumlu etkide bulunduğu fakat hastalık simptomlarını baskılamada FOM kadar etkin olmadığı sonucuna varılmıştır.

Çizelge 4.15. Üretici yüksek tünelinde ASM ve FOM uygulamasının Fusarium solgunluk hastalığının gelişimine ve bitki boyuna etkisi

Uygulamalar	Hastalık İndeks Değerleri	Hastalık Şiddeti (%)	% Etki	Bitki Boyu (cm)
ASM	2.02 a*	50.50	37.65	88.80 b
FOM	1.60 b	40.00	50.61	78.70 c
(+) Kontrol	3.24 c	81.00	-	53.56 d
(–) Kontrol	-	-	-	94.06 a

*Farklı harf içeren ortalamalar Duncan ($p \leq 0.05$) testine göre istatistiksel olarak farklıdır.

4.7.2. Açık Alanda Arazi Denemesi

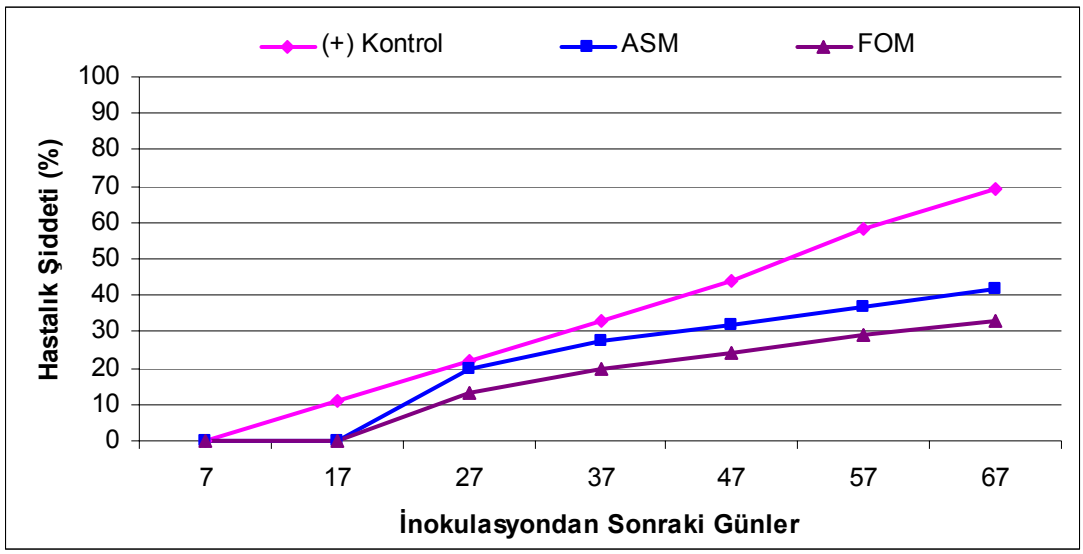
Açık alan arazi denemesinde de aynı parametreler değerlendirilmiş ve benzer sonuçlar alınmıştır. Patojen inokulasyonundan sonra, ASM ve FOM uygulanan bitkilerde patojenin infeksiyon hızı belirlenmiştir (Çizelge 4.16).

Çizelge 4.16. Açık alanda ASM ve FOM uygulamasının patojenin infeksiyon hızına etkisi (cm)

Uygulamalar	G Ü N L E R																				
	7			17			27			37			47			57			67		
	İ n f e k s i y o n H ı z ı (c m)																				
	10	15	20	15	20	25	25	30	35	35	40	45	45	50	55	55	60	65	65	70	75
ASM	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	–	–	–	–	+	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	–	–	–	–	+	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	–	–	–	+	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	–	–	–	+	+	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	–	–	–	+	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	–	–	–	+	+	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	–	–	–	+	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
FOM	–	–	–	+	+	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	–	–	–	+	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	–	–	–	+	+	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	–	–	–	–	+	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	–	–	–	–	+	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	–	–	–	–	+	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	–	–	–	+	+	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	–	–	–	+	+	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
(+) Kontrol	–	–	–	+	+	–	+	+	–	+	+	+	+	+	–	+	–	–	–	–	–
	–	–	–	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+	+	–	+	+	–	–	–	–
	–	–	–	+	–	–	+	+	+	+	+	–	+	+	–	+	+	–	–	–	–
	–	–	–	+	+	–	+	+	–	+	+	–	+	+	–	–	–	–	–	–	–
	–	–	–	+	+	–	+	+	–	+	–	+	+	+	–	+	–	–	–	–	–
	–	–	–	+	+	–	+	+	–	+	+	+	+	–	+	+	–	–	–	–	–
	–	–	–	+	+	–	+	+	–	+	+	–	+	–	–	+	+	–	–	–	–
	–	–	–	+	–	–	+	–	–	+	+	–	+	+	–	+	+	–	–	–	–

İnokulasyondan sonraki 7. günde, ASM, FOM ve pozitif kontrol bitkilerinden patojen izole edilememiştir. Patojen ilk olarak, 17. günde, 15 cm'den izole edilebilmiştir. ASM ve FOM uygulanan bitkilerde patojen en son 25 cm'de sınırlı kalırken, pozitif kontrol bitkilerinde patojen 57. günde yapılan izolasyonlarda en son 60 cm'ye kadar ilerleyebilmiştir.

Patojen inokulasyonundan sonra periyodik aralıklarla yaprak simptomlarına göre değerlendirilen bu bitkilerin hastalık şiddetleri (%) hesaplanmış ve Fusarium solgunluk hastalığının ilerleme grafiği Şekil 4.22'de verilmiştir.



Şekil 4.22. Açık alanda ASM ve FOM uygulamalarının patlıcanda Fusarium solgunluk hastalığının gelişimine etkisi

ASM, FOM ve pozitif kontrol bitkilerinde deneme sonuçlandırılana kadar 10 gün aralıklarla, yaprak simptomlarına göre bitkiler değerlendirilmiştir. Şekil 4.22'de görüldüğü gibi patojen inokulumu verildikten sonraki 17. günde yapılan değerlendirmelerde (+) kontrol bitkilerinde hastalık şiddeti % 10.0 olarak saptanırken, ASM ve FOM uygulanan bitkilerde hastalık görülmemiştir. ASM ve FOM uygulanan bitkilerde ilk simptomlar, patojen inokulumu verildikten sonraki 27. günde yapılan değerlendirmelerde gözlenmiş ve hastalık şiddetinin sırasıyla % 20.0 ve % 13.0 olduğu belirlenmiştir. Deneme süresince (+) kontrol bitkilerinde hastalık hızlı bir şekilde ilerlemiş ve son değerlendirmenin yapıldığı 67. günde hastalık

şiddeti % 80'lere ulaşmıştır. ASM ve FOM uygulanan bitkilerde, hastalığın gelişiminde yavaşlama gözlenmiştir.

Çizelge 4.17'de denemenin son değerlendirmesinin yapıldığı 67. günde ASM ve FOM'un % hastalık şiddetine bitki gelişimine etkileri verilmiştir. ASM uygulanan bitkilerde hastalık şiddeti % 47.75, FOM uygulanan bitkilerde ise % 38.25 olarak saptanmıştır. FOM uygulaması, 1.53 hastalık indeksi değeriyle hastalığın önlenmesinde % 51.42 oranında etkili olurken, ASM uygulamasının ise, 1.91 hastalık indeksi değeriyle % 39.36 oranında etkili olduğu saptanmıştır. Ayrıca dayanıklılık uyarıcıların patlıcan bitkisinin gelişimi üzerine etkilerini belirlemek için, deneme sonuçlandırıldığında, bitki boyları ölçülerek kaydedilmiştir. Sağlıklı kontrolde bitkilerin boyları yaklaşık olarak 99 cm'ye kadar ulaşırken, patojen inokulumu verilen bitkilerde hastalığın hızlı bir şekilde ilerleyerek, bitkinin gelişimine engel olduğu belirlenmiştir. ASM ve FOM uygulamasının hastalığın baskılanmasında etkin oldukları bu denemede de belirlenmiştir. Ancak, ASM'nin bitki gelişimini düzenlemedeki rolü göz önünde bulundurulduğunda, FOM'a göre bitki gelişimine bir miktar katkıda bulunduğu söylenebilir. Üretici yüksek tünelinde ve açık alanda yapılan denemelerde, Fusarium solgunluk hastalığının engellenmesinde FOM uygulamasının ASM uygulamasından daha etkin olduğu belirlenmiştir. Her iki arazi denemesinde de benzer sonuçlar alınmış ve bu sonuçlar saksı denemelerinden elde edilen sonuçlara paralellik göstermiştir.

Çizelge 4.17. Açık alanda ASM ve FOM uygulamasının Fusarium solgunluk hastalığının gelişimine ve bitki boyuna etkisi

Uygulamalar	Hastalık İndeks Değerleri	Hastalık Şiddeti (%)	% Etki	Bitki Boyu (cm)
ASM	1.91 a*	47.75	39.36	82.70 c
FOM	1.53 b	38.25	51.42	78.98 b
(+) Kontrol	3.15 c	78.75	-	59.21 d
(-) Kontrol	-	-	-	99.53 a

*Farklı harf içeren ortalamalar Duncan ($p \leq 0.05$) testine göre istatistiksel olarak farklıdır.

Patojenik olmayan mikroorganizmaların bitkide dayanıklılığı uyardığı birçok araştırıcı tarafından bildirilmiştir. Vasküler solgunluğa neden olan *Fusarium*

oxysporum'lar, çok yüksek oranda konukçu spesifitesine sahip olup, sadece kendi konukçu bitkisinde simptom sergilemektedirler. Bu türler, konukçuların kök korteks tabakasına kadar penetrasyon yapabilmekte, ancak konukçusu olan bitkilerde simptom ortaya çıkarabilmektedir. Örneğin kavunda solgunluk etmeni *F. oxysporum* f. sp. *melonis*'in bu ürünle rotasyona giren pamuk, şekerpancarı, domates, üçgül ve buğday bitkilerinin köklerini kolonize ettiği, fakat bu bitkide hastalık oluşturmadığı bildirilmiştir (Gordon ve ark., 1989; Tüzün ve Kloepper 1995; Fuchs ve ark., 1997).).

F. oxysporum'ların bu özellikleri dikkate alındığında, vasküler solgunluk patojenlerinin kontrolünde patojen olmayan *Fusarium* türleri ile dayanıklılığın uyarılması çalışmaları önem kazanmaktadır. Fuchs ve ark. (1999), yaptıkları çalışmada, domateste Fusarium solgunluk etmeni *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*'ye patojen olmayan *Fusarium* türünün (Fo47) hem saksı hem de arazi koşullarında hastalığın baskılanmasında etkili olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmaların sonucunda, Fo47'nin domateste Fusarium solgunluğunun kontrolünde etkin bir biyotik faktör olduğunu ve ticari koşullarda fungal inokulumunun preparasyonu yönünde çalışmalar yapılması gerektiğini belirtmişlerdir.

Benzer şekilde iki arazi denemesinde de, patlıcanda Fusarium solgunluk hastalığına karşı SAR mekanizmasının uyarılmasında patlıcanda patojen olmayan *Fusarium* (FOM) inokulasyonunun etkin olduğu saptanmıştır.

4.8. Fom İzolatlarının Moleküler Karakterizasyonu

Fungal miselyumdan genomik DNA'nın ekstraksiyon çalışmaları, Peever ve ark. (1999)'nın önerdiği yönteme göre yapılmıştır. DNA ekstraksiyonunda kullanılan yöntem, Bölüm 3.2.8.1'de verilmiştir. Adana ve Mersin illeri patlıcan alanlarından toplam 47 Fom izolatının total DNA'sı izole edilmiştir. Ayrıca DNA izolasyonlarına, kontrol amacıyla patlıcanda patojen olmayan, kavunda patojen olan *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*'in 0 no'lu ırkı (FOM-0) da dahil edilmiştir.

Fungal miselyumdan ekstrakte edilen total DNA'lar % 1'lik agaroz jelde elektrofore edilerek bant görünümleri incelenmiştir. Fom izolatlarının total DNA bantları, moleküler ağırlıklarına göre agaroz jelde görüntülenmiştir.

4.8.1. DNA Konsantrasyonu ve Saflık Derecesinin Ölçülmesi

Patojenik Fom izolatlarının DNA'larının konsantrasyonları, UV (Ultra Viyole) spektrofotometre (Shimadzu 260) ile ölçülmüştür. Bunun için, DNA'lar 1/100 dilüsyon oranında steril distile su ile seyreltilmiştir. Quartz küvetlere konulan örneklerin spektrofotometrede 260 ve 280 nm'deki absorbans değerleri okunarak, bu örneklerin 260 nm/280 nm oranları kaydedilmiştir. DNA derişimi hesabında kullanılan formül, Bölüm 3.2.8.2'de gösterilmiştir (Sambrook ve ark., 1989; Arda, 1995; Kayrın ve ark., 2003). Fom DNA örnekleri arasından, PCR çalışmaları için saf olarak izole edilebilen 20 izolat farklı bölgeleri temsil edebilecek şekilde seçilmiştir. Çizelge 4.18'de seçilen 20 Fom izolatının 260 ve 280 nm'deki absorbans değerleri verilmiştir.

Çizelge 4.18. Fom izolatlarının 260 ve 280 nm dalga boyundaki absorbans değerleri

İzolat No	Lokasyon	260 nm	280 nm
Fom 6	Tarsus/Bahşiş	0.235	0.181
Fom 7-1	Tarsus/Reşadiye	0.115	0.070
Fom 9	Ceyhan	0.150	0.121
Fom 10	Tarsus/Alifakı	0.036	0.024
Fom 13	Tarsus/Yeşiltepe	0.240	0.172
Fom 16	Gülnar/Sipahili	0.260	0.200
Fom 18	Gülnar/Sipahili	0.300	0.240
Fom 20	Aydıncık	0.340	0.283
Fom 22	Gülnar/Sipahili	0.320	0.260
Fom 24	Tarsus/Kulak	0.280	0.250
Fom 26	Tarsus/Adanalıoğlu	0.198	0.178
Fom 28	Tarsus/Köselerli	0.200	0.173
Fom 30	Kozan	0.218	0.186
Fom 32	Tarsus/Yunusoğlu	0.209	0.180
Fom 34	Tarsus/Alifakı	0.210	0.180
Fom 36	Adana/Havutlu	0.187	0.177
Fom 43	Tarsus/Adanalıoğlu	0.190	0.161
Fom 45	Tarsus/Kulak	0.150	0.130
Fom 47	Tarsus/Kulak	0.137	0.110
Fom 50	Silifke/Akdere	0.170	0.126

4.8.2. RAPD-PCR Yöntemi ile DNA'ların Amplifikasyonu

Adana ve Mersin yörelerinden izole edilen 20 adet patojenik Fom izolatı arasındaki genetik varyasyon RAPD-PCR analizleriyle belirlenmiştir (Sambrook ve ark., 1989; Darling ve Brickell, 1994; Arda, 1995; Öğüş, 2002; Kayrın ve ark., 2003). Bu Fom izolatlarının, öncelikle patojenite denemeleriyle virulenslikleri belirlenmiştir. Bölüm 4.2. Çizelge 4.8'de bu izolatları temsil eden yöreler, patojenite sonuçları ve RAPD grupları ile birlikte verilmiştir.

RAPD-PCR tekniği, Peever ve ark. (1999)'nın geliştirdikleri yöntem modifiye edilerek uygulanmıştır. Buna göre her bir Fom izolatından elde edilen DNA'nın kalıp DNA olarak kullanıldığı PCR reaksiyonundaki bileşenlerin miktarları, 25 µl'lik reaksiyon hacmi için optimize edilmiştir. Amplifikasyon koşullarını belirlemek için yapılan ön denemeler sonucunda, reaksiyona girecek primer oranı 100 pmol, kalıp DNA konsantrasyonu da 100 ng olarak belirlenmiştir. Primerler, dH_2O ile sulandırılmış ve ön denemeler sonucunda, toplam 10 adet 10 bazlık primerden 7 adetinin amplifikasyonda başarılı olduğu belirlenmiştir. RAPD-PCR çalışmaları için seçilen primerler ve bu primerlerin gerçek *Tm* (Bağlanma Sıcaklığı)'lerine göre belirlenen bağlanma sıcaklıkları Bölüm 3.2.8.3'de Çizelge 3.2'de gösterilmektedir.

Amplifikasyonda bir örnek için reaksiyon bileşenlerinin oranları Bölüm 3.2.8.4'de Çizelge 3.3'de verilmiştir. Reaksiyonlar, steril koşullarda ve buz üzerinde hazırlanmıştır.

4.8.3. RAPD-PCR Çalışmaları Sonucunda Elde Edilen DNA Bantlarının Analizi

RAPD-PCR çalışmaları sonucunda amplifiye ürünlerin Bölüm 3.2.8.6'da belirtildiği şekilde agaroz jel elektroforez işlemi yapılmıştır. Agaroz jel elektroforez çalışmaları sonucunda, bütün izolatlar için toplam 7 primerle oluşturulan RAPD profilleri incelenmiş ve değerlendirilebilir her bant "var" veya "yok" (0/1) şeklinde kaydedilmiştir. Fom izolatlarının birbiri ile olan genetik yakınlıkları, Populasyon Genetik Analiz Programı (POPGENE v1.32) kullanılarak hesaplanmıştır. Bu programda, Jaccord's coefficient formülü ile bir dendrogram oluşturulmuş ve

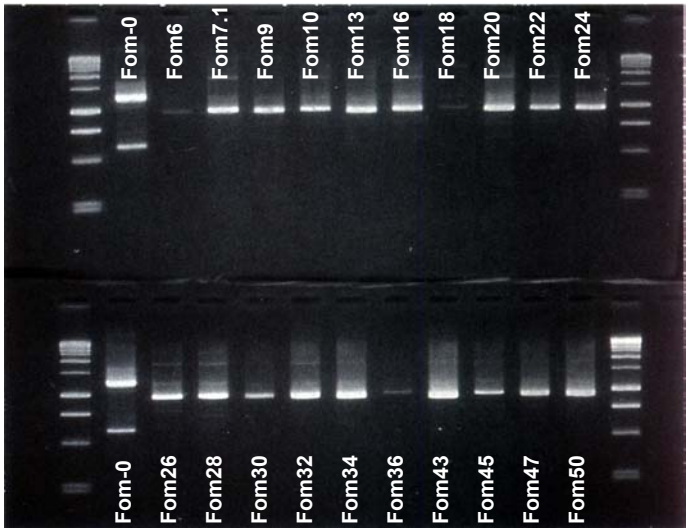
izolatların birbirlerine olan genetik yakınlığı hesaplanmıştır. Fom izolatlarının oluşturulan bu dendrogramda farklı dallarda yer aldığı gözlenmiştir (Nei, 1978; Vakalounakis ve Fragkiadakis, 1999; Yeh ve ark., 1999; Açık, 2002).

Amplifikasyon sonucunda her primerin 20 Fom izolatı için oluşturduğu amplifiye ve polimorfik fragment sayıları, Çizelge 4.19'da verilmiştir. Toplam 168 bant pozisyonundan 14'ünün polimorfik olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.19. RAPD çalışmasında kullanılan primerler ve Fom izolatlarının oluşturdukları amplifiye ve polimorfik DNA fragmentleri

Primer Kodu	Baz Dizilimi	Amplifiye Fragment	Polimorfik Fragment
OPB-01	5´-GTTTCGCTCC-3´	1	1
OPB-03	5´-CATCCCCCTG-3´	3	3
OPB-07	5´-GGTGACGCAG-3´	2	2
OPB-08	5´-GTCCACACGG-3´	4	4
OPB-14	5´-TCCGCTCTGG-3´	1	–
OPF-05	5´-CCGAATTCCC-3´	2	2
OPF-10	5´-GGAAGCTTGG-3´	2	2

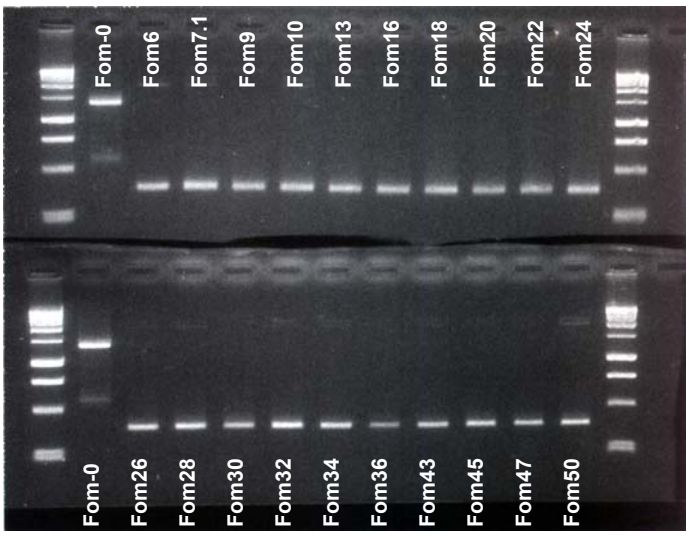
Bu çalışmada testlenen bütün primerler, izolatlar arasında polimorfizm göstermemiştir. OPB-01 primeriyle amplifikasyon sonucunda, 17 Fom izolatı 1 kb büyüklüğünde reaksiyon ürünü vermiş, ancak 3 izolat için değerlendirilebilir herhangi bir bant oluşturmamıştır (Şekil 4.23). OPB-01 primerinin amplifikasyonda, 0.4-2.4 kb reaksiyon ürünü verdiği bildirilmiştir (Chiocchetti ve ark., 1999).



Şekil 4.23. OPB-01 primeriyle ile elde edilen RAPD-PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü

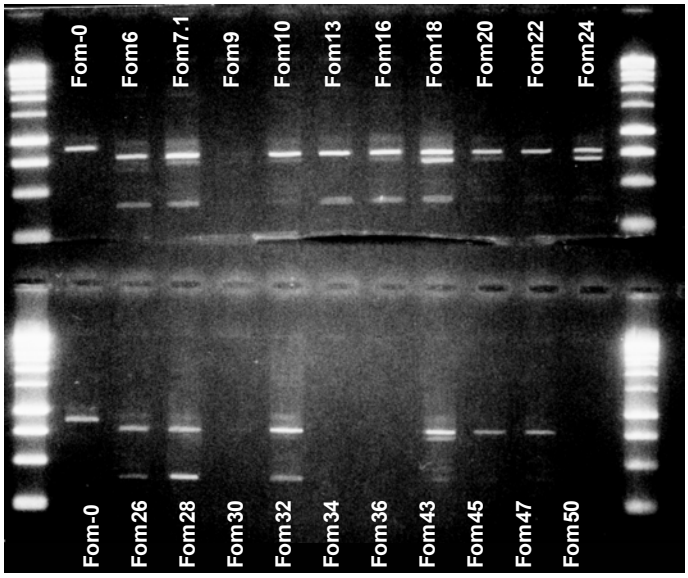
OPB-14 primeri bütün izolatlar için 0.5 kb büyüklüğünde amplifiye bant oluşturmuştur. Fakat izolatlar arasında herhangi bir polimorfizm gözlenmemiştir (Şekil 4.24).

RAPD-PCR çalışmaları her primer için ayrı ayrı yapılmakta ve amplifiye ürünler agaroz jelde görüntülendikten sonra, izolatlar arasında polimorfizm gösteren bantlar skor edilip (0/1) bu skor edilen bantlar üzerinden populasyon genetik analiz programında izolatların genetik yakınlıkları hesaplanmaktadır. Bu nedenle, OPB-14 primeriyle oluşturulan bant pozisyonlarında izolatlar arasında polimorfizm gözlenmediği için analize dahil edilmemiştir.

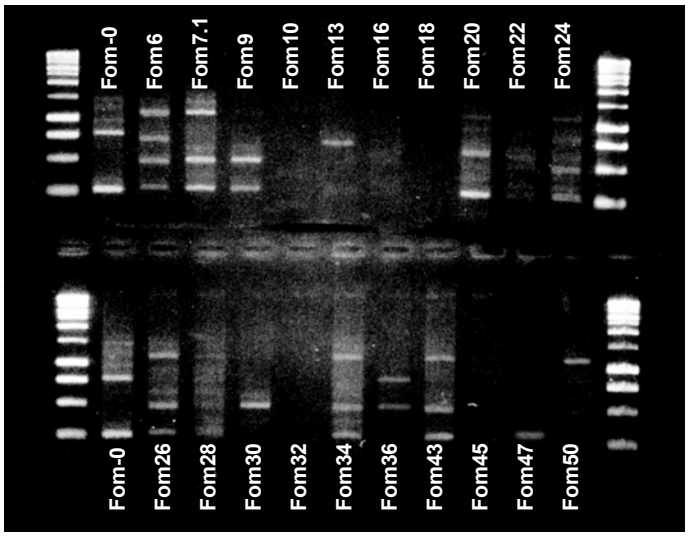


Şekil 4.24. OPB-14 primeriyle ile elde edilen RAPD-PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü

Bu çalışmada patojenik Fom izolatları arasında en fazla polimorfik bant OPB-03 ve OPB-08 primerleri kullanılarak yapılan amplifikasyonlar sonucunda gözlenmiştir (Şekil 4.25 ve 4.26).



Şekil 4.25. OPB-03 primeriyle ile elde edilen RAPD-PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü



Şekil 4.26. OPB-08 primeriyle ile elde edilen RAPD-PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü

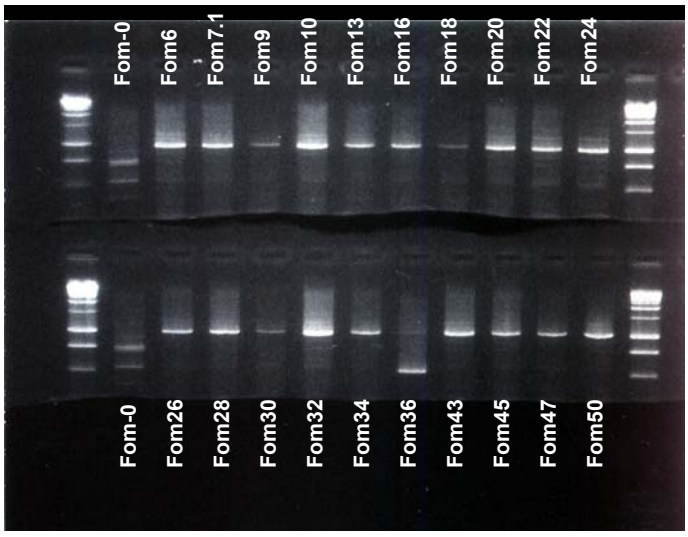
RAPD-PCR tekniği ile *F. oxysporum* f. sp. *basilici*'nin tanımlanmasında, 1.0 kb amplifikasyon ürünü veren OPB-08 primerinin en uygun primer olduğu Chiocchetti ve ark. (1999)'nın yaptıkları bir çalışmada belirtilmiştir. Bu çalışmada da, OPB-08 primeri 0.3-1.1 kb arasında reaksiyon ürünü vermiştir.

Bu çalışmada, OPB-03 primeri ile amplifikasyon sonucunda, reaksiyon ürünleri 0.4-2.0 kb arasında bant vermişlerdir. Söz konusu primerin 0.6-2.0 arasında bant verdiği bildirilmiştir (Chiocchetti ve ark., 1999).

OPB-07, OPF-05 ve OPF-10 primerleri ile amplifikasyon sonucunda oluşan DNA bantları, Şekil 4.27, 4.28 ve 4.29'da verilmiştir.

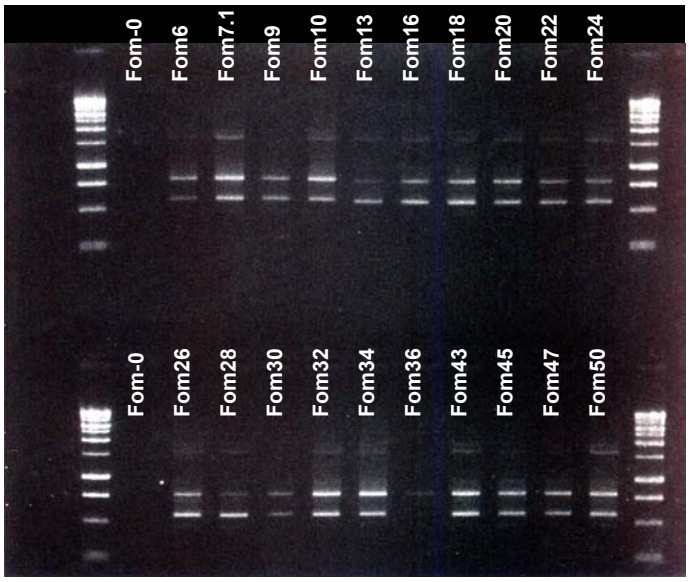
OPB-07 primeri kullanılarak yapılan RAPD-PCR işlemi sonucunda, agaroz jel elektroforez yöntemi ile bütün *Fusarium* izolatlarının amplifiye olduğu görülmüştür. Bütün izolatlardan 1 kb büyüklüğünde bant elde edilirken, Fom 36 izolatının diğer izolatlardan farklı olarak 0.5 kb büyüklüğünde bant oluşturduğu saptanmıştır.

Genel olarak koloni özellikleri ve virulensliği diğer izolatlardan çok farklı olmamasına rağmen, Fom 36 izolatının RAPD-PCR işleminde diğer izolatlardan farklı büyüklüğe sahip bant oluşturması, bu izolatın genetik olarak farklı olduğu sonucunu vermektedir.

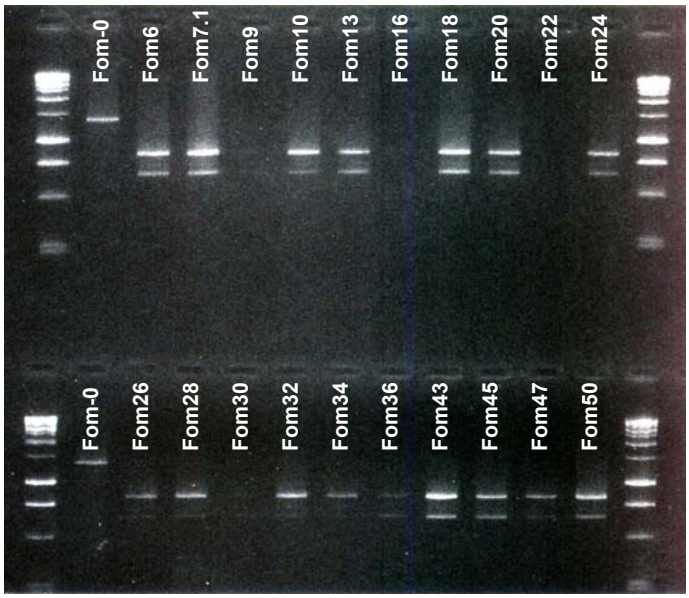


Şekil 4.27. OPB-07 primeriyle ile elde edilen RAPD-PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü

OPF-05 primeriyle amplifikasyon sonucunda, 0.6-1.1 kb büyüklüğünde iki bant gözlenmiştir. Aynı seriden OPF-10 primeriyle amplifikasyon sonucunda ise, Fom izolatlarının çoğu 0.5-0.9 kb büyüklüğünde iki bant vermiştir.



Şekil 4.28. OPF-05 primeriyle ile elde edilen RAPD-PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü



Şekil 4.29. OPF-10 primeriyle ile elde edilen RAPD-PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü

Fusarium oxysporum f. sp. *melongenae* ile ilgili çok fazla moleküler çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle, bu çalışmada kullanılan OPERON primerleri

Fusarium oxysporum'ların farklı f. sp.'lerinin moleküler karakterizasyonu çalışmalarında kullanılan primerlerden seçilmiştir.

Bu çalışmada, Amplifiye DNA fragmentlerinin büyüklüklerinin 0.3-1.1 kb arasında değiştiği belirlenmiştir. Fom izolatları, Operon kitinin B serisinden OPB-01 primeriyle 1.0 kb, OPB-03 primeriyle 0.4-2.0 kb, OPB-07 primeriyle 1.0 kb, OPB 08 primeriyle 0.3-1.1 kb ve F serisinden OPF-05 primeriyle 0.6-1.1 kb ve OPF-10 primeriyle de 0.5-0.9 kb amplifiye ürün oluşturmuşlardır.

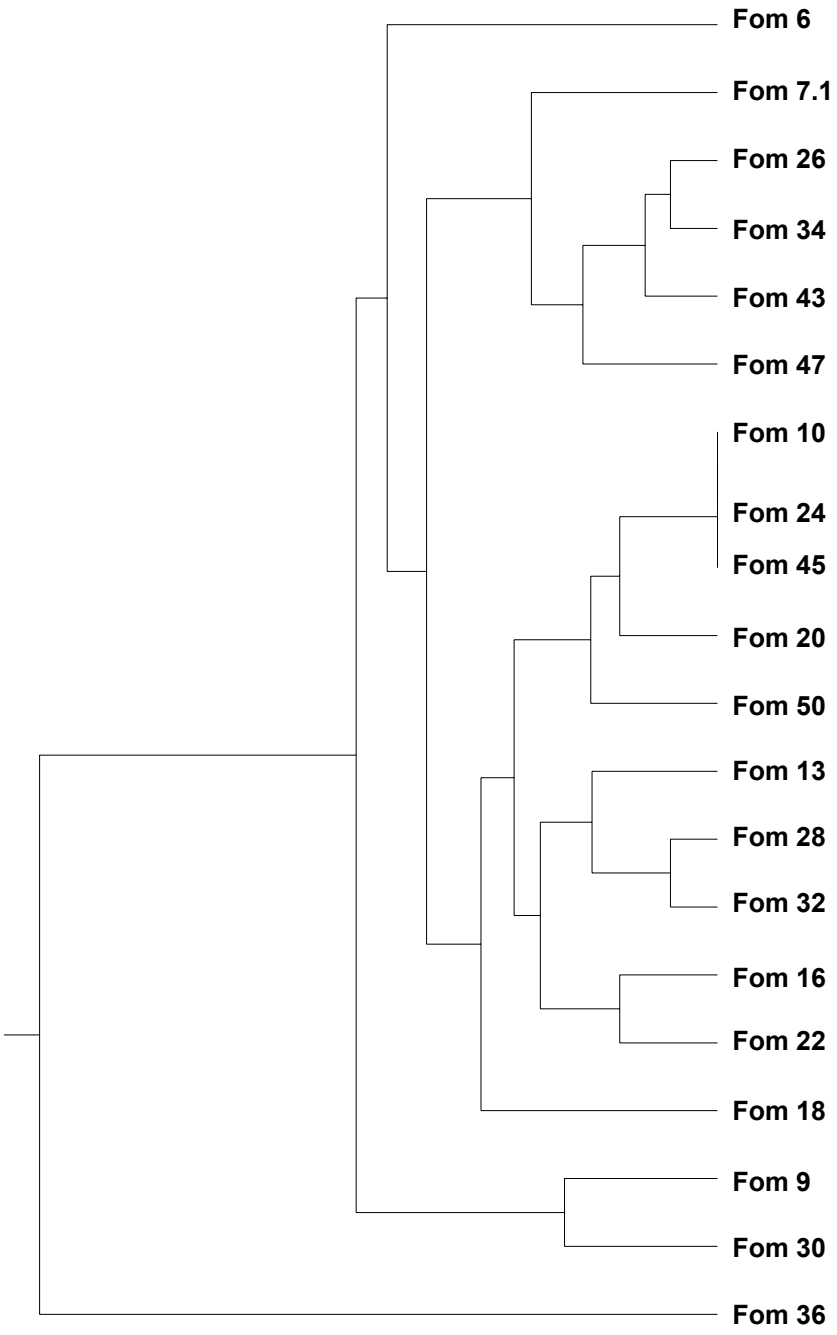
Chiocchetti ve ark. (1999), topraktan ve solgun bitkilerden izole ettikleri 30 *F. oxysporum* f. sp. *basilici* izolatı arasındaki genetik varyasyonu RAPD-PCR analizleri ile belirlenmişlerdir. Bu çalışmada da benzer şekilde Operon kiti'nin B serisine ait random primerler (OPB-01-OPB-30) kullanılmıştır. Çalışmada, amplifiye ürünlerin oluşturduğu bantların büyüklüklerinin 0.3-3.0 kb arasında değiştiği bildirilmiştir.

Assigbetse ve ark. (1994), RAPD-PCR yöntemiyle, pamuk bitkisinde 46 *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* izolatının ırklarını saptamışlardır. OPF01'den OPF14'e kadar 11 primer kullanılmış ve amplifikasyon sonucunda, 83 adet polimorfik bant elde edilmiştir. OPF-05 primerinin 590-980 bp büyüklüğünde reaksiyon ürünü verdiği bildirilmiştir. Bu çalışmada da OPF-05 primerinin benzer şekilde 600-1100 bp reaksiyon ürünü verdiği gözlenmiştir.

Benzer bir çalışmada Assigbetse ve ark. (1994), *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*'un 46 izolatının genetik yakınlığını belirlemek amacıyla 11 primerle RAPD profilleri oluşturulmuştur. Amplifikasyon sonucunda, 83 bant pozisyonu "var-yok" (0/1) şeklinde kaydedilmiş ve 46 bant polimorfik olarak belirlenmiştir.

OPF-06 primerinin kullanıldığı bir çalışmada, amplifiye DNA fragmentlerinin büyüklüklerinin 0.2-2.1 kb arasında değiştiği bildirilmiştir. Hıyar bitkisinden izole edilen *Fusarium* izolatlarının, RAPD analizleriyle genetik yakınlıklarının belirlendiği diğer bir çalışmada, OPA ve OPB kiti (01'den 20'ye kadar) ile OPF-05 primerleri kullanılmış ve bu primerlerden 10 tanesi verdikleri bant görünümlerine göre RAPD-PCR çalışmaları için seçilmiştir. Amplifikasyonların sonucunda, 121 *Fusarium oxysporum* izolatının RAPD profilleri oluşturulmuş ve amplifiye olan 107 DNA bantının 97'sinin polimorfik olduğu belirlenmiştir. Amplifiye bantların

büyüklüklerinin 0.2-2.3 kb arasında değiştiği bildirilmiştir (Vakalounakis ve Fragkiadakis, 1999).



Şekil 4.30. *F. oxysporum* f. sp. *meolongenae* (Fom) izolatlarının RAPD-PCR çalışması sonucunda genetik yakınlıklarını gösteren dendrogram

Agaroz jel elektroforez çalışmaları sonucunda her bir izolat için, oluşan değerlendirilebilir her bant, var/yok (0/1) şeklinde kaydedilmiştir. Populasyon genetik analiz programında POPGENE (v1.32), izolatlar arasındaki genetik yakınlıkları gösteren filogenetik ağaç (Dendrogram) oluşturulmuştur. Adana ve Mersin yörelerinden izole edilen 20 patojenik *Fusarium oxysporum* f. sp. *melongenae* (Fom) izolatı arasındaki genetik yakınlığı gösteren dendrogram Şekil 4.30'da verilmiştir.

Dendrogramda, izolatlar arasındaki genetik uzaklığı yatay çizgiler belirlemekte, dikeyde oluşturulan çizgiler dikkate alınmamaktadır. İzolatlar arasında, genetik açıdan varyasyon arttıkça, genetik uzaklık da artmaktadır. Dendrogramda oluşturulan uzun yatay çizgi, izolatlar arasında paylaşılan allel genlerin sayısının az olduğunu, kısa yatay çizgi ise, paylaşılan allel genlerin sayısının daha çok olduğunu göstermektedir.

Amplifikasyon ürünlerinin, populasyon genetik analiz programıyla analizi sonucunda, 4 farklı RAPD grubu belirlenmiştir.

Bu RAPD gruplarını farklı populasyonlar olarak değerlendirdiğimizde, yazlık patlıcan üretim alanlarından alınan izolatlarla kışlık patlıcan üretim alanlarından alınan izolatlar ayrı dallarda yer almışlardır. Kışlık patlıcan ekim alanlarından izole edilen izolatların RAPD grup II'de yer aldıkları belirlenmiştir. Yazlık patlıcan ekim alanlarından izole edilen izolatlar RAPD grup I, III ve IV'de yer almışlardır. Yazlık çeşitlerden (Adana Topağı ve Pala) elde edilen izolatlar arasındaki genetik varyasyonun, Faselis F_1 kışlık çeşidinden izole edilen izolatlara göre daha çok olduğu belirlenmiştir. Vejetasyon periyodunun daha uzun sürdüğü yazlık yetiştiricilikte, fungusun optimum gelişme isteklerinin daha iyi karşılanması ve aseksüel döngünün daha fazla oluşması, bireyler arasında genetik varyasyona neden olurken aynı zamanda da genetik olarak birbirinden uzak bireyler oluşturabilir (Prof. Dr. Mahinur AKKAYA[1] kişisel görüşme). Bölüm 4.2.2'de patojenite denemeleriyle Fom izolatlarının virulenslikleri belirlenmiş ve bu izolatların virulensliklerinin RAPD gruplarını destekler nitelikte, hastalık şiddetlerine göre sıralanmadıkları gözlenmiştir. *Fusarium oxysporum*'larda virulensliğin, tamamen

[1] Orta Doğu Teknik Üniversitesi Kimya Bölümü, ANKARA

farklı genler tarafından yönetildiği ve patojenite RAPD ve VCG çalışmalarının sonuçlarının birbirini desteklemediği bazı araştırıcılar tarafından bildirmiştir (Kistler, 2001; Summerel ve ark., 2001). Çizelge 4.20'de Popgene programında oluşturulan dendrogramda, Fom izolatlarının genetik yakınlıkları verilmiştir.

Mersin ili Tarsus ilçesinde, yazlık patlıcan yetiştiriciliği yapılan alanlardan izole edilen Fom 6 (Bahşiş), Fom 7-1 (Reşadiye), Fom 26 (Adanalıoğlu), Fom 34 (Alifakı), Fom 43 (Adanalıoğlu) ve Fom 47 (Kulak) izolatları RAPD grup I'de yer almışlardır. Bu izolatların genetik açıdan çok az varyasyon gösterdikleri belirlenmiştir. Bu grup izolatlar arasında, Tarsus beldesinden alınan Fom 26 ve Fom 34 izolatları 0.07 genetik yakınlık değeriyle genetik açıdan en yakın izolatlar olarak belirlenmişlerdir.

Mersin yöresinde kışlık patlıcan ekim alanlarından elde edilen izolatlar, RAPD Grup II'de yer almışlardır. Bu grupta Tarsus yöresinden izole edilen Fom 10 (Alifakı), Fom 24 (Kulak) ve Fom 45 (Kulak) izolatlarının, 0.00 genetik yakınlık değeriyle genetik varyasyon göstermedikleri belirlenmiş ve bu izolatlar birbirlerine % 100 yakınlık göstermişlerdir. Yine aynı bölgeden izole edilen Fom 28 (Köselerli) ve Fom 32 (Yunusoğlu) izolatları, 0.07 genetik yakınlık değeriyle, genetik olarak ikinci derecede birbirine yakın izolatlar olarak belirlenmiştir. Gülnar ilçesini temsil eden, Fom 16 ve Fom 22 izolatları da benzer şekilde genetik açıdan birbirlerine yakınlık göstermişlerdir. Genetik yakınlık değerlerinden, Tarsus ve Gülnar ilçelerinden elde edilen bu izolatların paylaştıkları allel genlerin sayısının fazla olduğu söylenebilir.

Adana ilinde, yazlık patlıcan yetiştirilen alanlardan alınan izolatları temsil eden Fom 9 (Ceyhan) ve Fom 30 (Kozan) izolatları, farklı bir dal oluşturarak, RAPD grup III'de yer almışlardır. Ceyhan ve Kozan izolatlarının genetik açıdan birbirlerine çok yakın oldukları belirlenmiş ve bu yakınlığın derecesi 0.24 olarak saptanmıştır.

Fom 36 (Adana/Havutlu) izolatı ise diğer izolatlardan tamamen farklı bir dal oluşturarak, RAPD grup IV'de yer almıştır. Bu izolatın genetik olarak diğer izolatlardan daha fazla varyasyon gösterdiği belirlenmiştir.

Çizelge 4.20. *F. oxysporum* f. sp. *melongenae* izolatlarının (Fom) genetik yakınlıkları

İzolatlar	Fo m6	Fom 7.1	Fo m9	Fom 10	Fom 13	Fom 16	Fom 18	Fom 20	Fom 22	Fom 24	Fom 26	Fom 28	Fom 30	Fom 32	Fom 34	Fom 36	Fom 43	Fom 45	Fom 47	Fom 50
Fom 6	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
Fom 7.1	0.34	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
Fom 9	0.69	0.69	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
Fom 10	0.56	0.34	0.69	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
Fom 13	0.34	0.56	0.69	0.34	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
Fom 16	0.69	0.44	0.56	0.24	0.44	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
Fom 18	0.44	0.44	1.25	0.24	0.44	0.34	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
Fom 20	0.56	0.34	0.44	0.15	0.34	0.44	0.44	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
Fom 22	0.69	0.69	0.34	0.24	0.44	0.15	0.56	0.44	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
Fom 24	0.56	0.34	0.69	0.00	0.34	0.24	0.24	0.15	0.24	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
Fom 26	0.44	0.24	0.34	0.44	0.69	0.56	0.85	0.44	0.34	0.44	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
Fom 28	0.56	0.56	0.69	0.34	0.15	0.24	0.44	0.56	0.24	0.34	0.44	***	***	***	***	***	***	***	***	***
Fom 30	0.85	0.85	0.24	0.56	0.85	0.44	0.69	0.85	0.24	0.56	0.44	0.56	***	***	***	***	***	***	***	***
Fom 32	0.44	0.44	0.56	0.24	0.24	0.15	0.34	0.44	0.15	0.24	0.34	0.07	0.44	***	***	***	***	***	***	***
Fom 34	0.56	0.34	0.24	0.56	0.85	0.69	1.03	0.56	0.44	0.56	0.07	0.56	0.34	0.44	***	***	***	***	***	***
Fom 36	1.54	2.64	0.85	1.03	1.03	0.85	0.85	1.54	0.56	1.03	1.25	0.69	0.44	0.85	1.03	***	***	***	***	***
Fom 43	0.34	0.15	0.44	0.34	0.56	0.69	0.69	0.34	0.44	0.34	0.07	0.56	0.56	0.44	0.15	1.54	***	***	***	***
Fom 45	0.56	0.34	0.69	0.00	0.34	0.24	0.24	0.15	0.24	0.00	0.44	0.34	0.56	0.24	0.56	1.03	0.34	***	***	***
Fom 47	0.69	0.44	0.34	0.24	0.44	0.34	0.56	0.24	0.15	0.24	0.15	0.24	0.44	0.15	0.24	0.85	0.24	0.24	***	***
Fom 50	0.56	0.56	0.44	0.15	0.34	0.44	0.44	0.34	0.24	0.15	0.44	0.34	0.34	0.24	0.34	0.69	0.34	0.15	0.24	***

Patojenik ve patojenik olmayan aynı türe ait izolatların gruplandırılmasında RAPD-PCR tekniği bir çok araştırıcı tarafından tercih edilmektedir. Bu tekniğin kullanıldığı benzer bir çalışmada, *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*'un farklı coğrafik orijinlerden izole edilen 46 izolatı arasındaki genetik varyasyon belirlenmiş ve bu izolatların üç farklı RAPD grubu oluşturduğu bildirilmiştir (Assigbetse ve ark., 1994). Fasulye ve şekerpancarı bitkilerinden izole edilen 166 *Fusarium oxysporum* izolatının RAPD analizlerinin yapıldığı bir çalışmada, fasulye ve şekerpancarında patojen izolatlar kolaylıkla ayırt edilebilmiştir. Toplam 12 adet RAPD primeriyle 105 polimorfik bant pozisyonu elde edilmiş ve izolatların genetik yakınlıkları hesaplandığında patojenik özellik gösteren izolatların, genetik olarak birbirine daha yakın oldukları belirtilmiştir (Cramer ve ark., 2003). Diğer bir çalışmada, *F. oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* ve *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* izolatlarının RAPD analizi yapılmış ve oluşturulan dendrogramda bu farklı *Fusarium oxysporum* izolatlarının iki farklı RAPD grubu belirlenmiştir (Vakalounakis ve Fragkiadakis, 1999).

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Doğu Akdeniz Bölgesi'nde, patlıcan ekim alanlarında solgunluk hastalığına, *Fusarium oxysporum* Schlecht. f. sp. *melongenae* Matuo ve Ishigami ve *Verticillium dahliae* Kleb. isimli iki fungus neden olmaktadır. Solgunluk etmenlerinin saptanması ve yaygınlık oranının ortaya konulması, kontrolü zor olan toprak kökenli bu hastalıklara karşı alınacak önlemlerin ve alternatif mücadele yöntemlerinin belirlenmesi açısından oldukça önemlidir. Bu çalışmada öncelikli olarak, Mersin ve Adana yörelerinde patlıcanda solgunluk hastalığının hastalık oranı ve şiddeti (%) saptanmıştır. Çalışmanın sonraki aşamalarında, surveyler sırasında elde edilen bölge izolatlarının patojeniteleri ve bölgede yaygın olarak yetiştirilen patlıcan çeşitlerinin bu hastalığa reaksiyonları belirlenmiştir. Bunların yanı sıra, kontrolü zor olan toprak kökenli bu hastalık etmenine karşı, bitkide dayanıklılık uyarıcı, abiyotik ve biyotik iki faktörün Fusarium solgunluk hastalığının gelişimine etkisi araştırılmıştır. Ayrıca, genetik karakterizasyonu henüz yapılmamış bu etmenin, bölge izolatlarının RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) yöntemi ile genetik varyasyonu belirlenmeye çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlar aşağıda verilmiştir;

1. Survey çalışmalarında, gözlem yapılan alanın tamamında, *Fusarium oxysporum* f. sp. *melongenae* yaygın olarak saptanırken, *Verticillium dahliae* birkaç tarlada düşük oranlarda bulunmuştur. Bu çalışma kapsamında Adana ve Mersin illeri ve çevresinde patlıcan tarımının yapıldığı alanlarda, Fusarium solgunluk hastalığının Veticillium solgunluğundan, daha yaygın olduğu ve ekonomik kayıplara neden olduğu ortaya konulmuştur.

2. Mersin ili sera ve tünelde, toplam 4575 da'lık alanı temsil eden, 77 tarlada gözlem yapılmış ve bu alanın 2625 da'lık kısmını oluşturan 52 tarlanın Fusarium solgunluk hastalığı ile infekteli olduğu belirlenmiştir. Mersin ve Adana ilinde sera, tünel ve açık alanlarda, gözlem yapılan tarlaların yaklaşık yarısının Fusarium solgunluk hastalığı ile infekteli olduğu belirlenmiştir. Mersin ilinde sera ve tünellerde ortalama hastalık oranı ve şiddeti sırasıyla, % 42.1 ve % 18.5, açık alanlarda ise, % 33.5 ve % 15.1 olarak saptanmıştır. Açıkta yetiştiriciliğin

yaygın olduğu Adana ilinde ise ortalama hastalık oranı ve hastalık şiddeti sırasıyla % 33.2 ve % 16.4 olarak saptanmıştır. Mersin yöresi sera ve tünellerde yapılan survey çalışmaları sonucunda, en yüksek hastalık oranı yaklaşık % 70'lik bir oranla Gülnar ilçesinin Sipahili beldesinde belirlenmiştir. Cam serada yetiştiricilik yapılan Gülnar, Aydıncık ve Silifke ilçelerinde patlıcan alanlarının çoğunda ekim nöbeti uygulamasına dikkat edilmediği tespit edilmiştir. Mersin ilinde 952 ha'lık alanda, açıkta patlıcan yetiştiriciliği yapılmaktadır. Bu ilde 54 tarlayı temsil eden toplam 6752 da'lık açık alanda gözlem yapılmış ve 2975 da'lık kısmını oluşturan 39 tarlanın Fusarium solgunluğu ile infekteli olduğu belirlenmiştir.

3. Adana ve yöresinde açık alanda yetiştiricilik yaygın olup, kışlık üretimde yüksek tünel tercih edilmektedir. Üreticilerden edinilen bilgilere göre kışlık üretim alanlarında, 6-7 yılda bir patlıcan tarımına yer verilmektedir Ekim nöbeti uygulanan alanlarda, Fusarium solgunluğuna neden olan toprak kökenli bu fungusun yaygın olmadığı, ancak yazlık yetiştiricilik yapılan açık alanlarda tünellerin aksine hastalığın yaygın olduğu gözlenmiştir. Bu yörede 3000 dekarlık açık alanda, toplam 57 tarlada gözlem yapılmış ve bu tarlalardan 30'unda Fusarium solgunluğu tespit edilmiştir. Bu yörede hastalığa en fazla yaklaşık % 50 hastalık yaygınlık oranıyla İmamoğlu ilçesinde rastlanmış, bunu Kozan ve Ceyhan ilçeleri izlemiştir.

4. Toplam 47 izolatın (Fom) virulensliklerinin denendiği bu çalışmada, bütün izolatların patojenik *Fusarium oxysporum* f. sp. *melongenae* olduğu belirlenmiş ve Fom izolatlarının % 75-95 hastalık şiddeti gösterdikleri saptanmıştır. Mikroskobik incelemeler sonucunda, PDA ve CDA ortamlarında, Fom izolatlarının oluşturdukları morfolojik özellikler, *Fusarium oxysporum*'ların tanı karakterleriyle aynı özellikte belirlenmiştir.

5. RAPD-PCR çalışmaları için seçilen 20 izolatın (Fom) hastalık şiddetlerine göre virulensliklerinin RAPD gruplarını destekler nitelikte olmadığı belirlenmiştir. *Fusarium oxysporum*'larda virulensliğin, tamamen farklı genler tarafından yönetildiği ve patojenite RAPD ve VCG çalışmalarının sonuçlarının birbirini desteklemediği bazı araştırıcılar tarafından bildirilmiştir.

6. Fom izolatlarının optimum gelişebildikleri sıcaklık, 20-25 ºC olarak belirlenmiştir.

7. Çeşit reaksiyonu denemelerinde, Fusarium solgunluğuna en duyarlı çeşidin % 93.75 hastalık şiddetiyle Pala patlıcan çeşidi olduğu saptanmıştır. Fusarium solgunluğuna duyarlılık yönünden Pala patlıcan çeşidini, İrena F_1, Kemer, Adana Topağı ve Faselis F_1 çeşitleri izlemiştir.

8. Bitki savunma aktivatörü ticari bir preparat olan, acibenzolar-S-methyl (ASM)'in kontrole göre *Fusarium oxysporum* f. sp. *melongenae* (Fom 10)'nin miseliyal gelişimine ve miseliyal kuru ağırlığına herhangi bir inhibitör etkide bulunmadığı belirlenmiştir. Acibenzolar-S-Methyl (ASM)'in patojen Fom 10'un miseliyal gelişimine inhibitör etki göstermemesi bu preparatın bitkide dayanıklılığı teşvik ettiği sonucunu desteklemektedir.

9. Saksı denemelerinde ASM uygulandıktan 24, 48, 72 ve 96 saat sonra patojen (Fom 10) uygulaması sonucu bitkilerde gözlenen makroskobik simptomlar, inokulasyondan sonraki 7., 11., 14., 17. ve 21. günlerde değerlendirilmiş ve bitkide patojene karşıt bir reaksiyon olarak gelişen SAR mekanizmasının en aktif olduğu optimum zaman aralığı belirlenmiştir. Bütün zaman aralıklarında hastalık şiddeti azalma gösterse de, hastalığın en yüksek oranda baskı altına alındığı uygulama zaman aralığı, ASM uygulamasından 72 saat sonra Fom 10 inokulasyonu olarak belirlenmiştir. ASM uygulamasında olduğu gibi, FOM (*F. oxysporum* f. sp. *melonis*) inokulasyonu sonucunda da uygulama zamanına bağlı olarak bitkilerde hastalığın gelişiminde farklı reaksiyonlar gözlenmiştir. FOM uygulamasından 24, 48 ve 96 saat sonraki patojen inokulasyonuyla da hastalığın gelişiminde azalma sağlanmış ancak, 72 saat sonra yapılan inokulasyonlar kadar hastalığın baskılanmasında etkin olmamıştır. Dayanıklılık uyarıcılar uygulandıktan 21 gün sonra, denemenin son hastalık değerlendirmesi yapılmış ve FOM uygulamasının, 0.53 hastalık indeksi değeriyle Fusarium solgunluk hastalığını önlemede kontrole göre % 75.47 oranında etkin olduğu belirlenmiştir. ASM uygulaması ise, 0.70 hastalık indeksi değeriyle hastalık oluşumunu azaltmada % 67.60 oranında etki göstermiştir. Patlıcan bitkilerinde Fusarium solgunluk hastalığına karşı dayanıklılık mekanizmasının uyarılmasında patojen

olmayan *Fusarium* (FOM) uygulamasının, ASM uygulamasından daha etkin olduğu belirlenmiştir. Yaprak ve vasküler renklenme simptomlarına göre yapılan hastalık değerlendirmelerinden de benzer sonuçlar alınmıştır.

10. ASM, FOM, (+) kontrol ve (-) kontrol bitkilerinden elde edilen bitki ekstraktlarının Fom'un konidi çimlenmesine etkileri araştırılmış ve çim tüpü uzunluğunu engellemede en yüksek etkiyi 25.14 µm'lik ortalama ile ASM uygulanan bitki ekstraktları göstermiş, bunu 30.50 µm'lik ortalama ile FOM uygulanan bitki ekstraktları izlemiştir. Dayanıklılık uyarıcılar uygulandıktan sonra bitkide antifungal bazı bileşiklerin sentezlenerek patojenin konidi çimlenmesini olumsuz yönde etkilediği düşünülmektedir.

11. ASM ve FOM uygulaması sonucu dayanıklılığın uyarıldığı bitkilerin infekteli dokularındaki infeksiyon ve reaksiyon yerlerinde, lignifikasyonun yoğunluğunda ve dağılımında farklılıklar belirlenmiştir. Lignin oluşumları, Hipersensitif Reaksiyon (HR) göstererek ölmüş hücreler ile bu hücrelerin etrafında bulunan ksilem demetlerinde karakteristik olarak gözlenmiştir. Patojen inokulumu verildikten sonraki 8. ve 10. günde HR artmış ve bu hücre ve dokularda, lignin boyama şiddetini de artırmıştır. FOM inokule edilen bitkilerin kök ve gövde dokularında, ligninin boyanma şiddetinin, ASM uygulanan bitkilerden daha yoğun olduğu gözlenmiştir.

12. Dayanıklılığın uyarılmasına yönelik olarak üretici yüksek tüneli ve açık alanda kurulan denemelerde, son değerlendirmenin yapıldığı 67. günde, FOM uygulaması 1.60 hastalık indeksi değeriyle hastalığın önlenmesinde % 50.61 oranında etkili olurken, ASM uygulamasının ise 2.02 hastalık indeksi değeriyle % 37.65 oranında etkili olduğu saptanmıştır. FOM uygulamasının hastalığın baskılanmasında, ASM uygulamasından daha etkin olduğu arazi denemeleriyle de belirlenmiştir.

13. Patlıcanda Fusarium solgunluğuna yönelik dayanıklılığın uyarılması çalışmalarında patojen olmayan FOM uygulamasından hem saksı hem de arazi denemelerinde başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Toprak kökenli hastalıkların kontrolündeki zorluklar göz önünde bulundurulduğunda, toprak kökenli bu

hastalığın baskılanmasında, biyotik faktör olarak FOM inokulasyonundan elde edilen başarı önem kazanmaktadır.

14. RAPD-PCR çalışmalarında OPERON serisinden 7 primer kullanılmış ve amplifikasyon sonucunda toplam 168 bant pozisyonu belirlenmiş, bunlardan 14 bantın polimorfik olduğu gözlenmiştir. Fom izolatlarının OPB-07 primeriyle amplifikasyon sonucunda bütün izolatlardan 1 kb büyüklüğünde bant elde edilirken, Fom 36 izolatının diğer izolatlardan farklı olarak 0.5 kb büyüklüğünde bant verdiği saptanmıştır. Populasyon genetik analiz programıyla oluşturulan dendrogramda 4 farklı RAPD grubu belirlenmiştir.

Bu çalışma kapsamında Doğu Akdeniz Bölgesi'nde patlıcan tarımı yapılan alanlarda Fusarium solgunluk hastalığının önemli fungal problemlerden biri olduğu belirlenmiştir. Solgunluk patojenlerinin yaygınlık oranı ile toprak ve sulama suyunda bulunan inokulum oranı ve bu inokulumun uzun yıllar canlılığını koruma özelliği arasında yakın bir ilişki bulunmaktadır. Toprakta klamidospor formunda uzun yıllar canlı kalabilen Fusarium solgunluk patojeninin ekim nöbeti uygulanmayan alanlarda çok tahripkar sonuçlara neden olduğu gözlenmiştir. Bu yörelerdeki üreticilere ekim nöbetinin önemi ve toprak kökenli patojenlerin kotrolündeki zorluklar üreticilere açıklanmalı, bunun yanı sıra, uygun sulama ve gübreleme teknikleri gibi kültürel önlemlerin kullanımı yönünde bilgiler verilmelidir.

Etkin bir kotrol yöntemi henüz bulunamayan toprak kökenli bu hastalığa karşı dayanıklılık uyarıcı biyotik (FOM) ve abiyotik (ASM) iki föktörün hastalığın baskılanmasında etkin oldukları belirlenmiştir. Özellikle patojen olmayan FOM uygulamasından elde edilen başarı gelecek için ümitvar görünmektedir. Bundan sonra yapılacak çalışmalar, biyotik ve abiyotik bu faktörlerin uygulanması sonucunda oluşan ve bitkide dayanıklılığı uyaran metabolitlerin saptanması yönünde olmalıdır. Dünyada potansiyel birçok kontrol ajanının ticari praparatı üretilerek pratikte kullanılmaktadır. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar ışığında daha sonra yapılacak çalışmalarda, patlıcanda Fusarium solgunluk hastalığına karşı etkin bulunan FOM'un biyoformülasyonunun hazırlanarak pratikte kullanıma sunulabilmesi planlanmaktadır. Bitkide dayanıklılığın uyarılması çalışmalarının yanısıra hastalıklara dayanıklılıkta ıslah çalışmalarıda ayrı bir öneme sahiptir.

Hastalıklara dayanıklı çeşitlerin elde edilmesi için, ıslah çalışmalarına ağırlık verilmesi ve ıslah edilmiş dayanıklı çeşitlerin kullanılması gerekmektedir.

Genomik yapısı bilinmeyen mikroorganizmaların moleküler karakterizasyonunda, RAPD-PCR ve AFLP teknikleri en uygun tekniklerdir. *Fusarium oxysporum* f. sp. *melongenae*'nın genomik yapısının tam olarak bilinmemesi ve günümüze kadar bu fungusa yönelik spesifik bir primerin dizayn edilmemiş olması, bu çalışmada RAPD-PCR tekniğinin tercih edilme nedenidir. Dünyada ve ülkemizde *F. oxysporum* f. sp. *melongenae*'nın moleküler karakterizasyonuna yönelik bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışma ile önemli bir literatür açığı kapatılmış ve bu konuda yapılacak çalışmalara kaynak olabilecek sonuçlar elde edilmiştir. RAPD-PCR çalışmaları sonucunda, Fom 36 izolatının genel olarak koloni özellikleri ve virulensliği diğer izolatlardan çok farklı olmamasına rağmen, söz konusu izolatın oluşturulan dendrogramda farklı bir RAPD grubunda yer aldığı ve genetik olarak diğer izolatlara uzak olduğu saptanmıştır. Buna göre, özellikle Fom 36 izolatına spesifik PCR marker elde etmek amacıyla bu izolatın klonlanması ve elde edilecek baz diziliminden yararlanarak uygun primerlerin sentezlenmesi, ileride yapılacak moleküler çalışmalar için önemli bir basamak oluşturacaktır.

Toprak kökenli patojenler değişen toprak koşullarına devamlı olarak adapte olabilme yeteneğine sahiptirler. Başarılı bir adaptasyon farklı mekanizmalarda varyasyonların elde edilmesine bağlıdır. Bu varyasyon, iki farklı streynin hifinin birleşerek bir heterekaryon oluşturarak farklı genleri bir araya getirebilmesi ile gerçekleşmektedir. Vejetatif uyumlu streynler genelikle genetik karakterleri açısından birbirinin aynı veya benzer özelliktedirler ve genetik farklılıkların belirlenmesinde kullanılırlar. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar çerçevesinde farklı bölgelerden örneklenecek Fom izolatlarının vejetatif uyum gruplarının belirlenmesi planlanmaktadır. Ayrıca üzerinde daha spesifik araştırmalar yapılması, dünyada ve ülkemizde henüz ırkları bilinmeyen bu patojenle mücadele konusunda önemli adımlar atılmasını sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

ABDEL-SATAR, M.A., KHALIL, M.S., MOHMED, I.N., ABD-ELSALAM, K.A. and VERREET, J.A., 2003. Molecular Phylogeny of *Fusarium* Species by RFLP Fingerprint. African Journal of Biotechnology, Vol. 2 (3): 51-55

ACHENBACH, L.A., PATRICK, J. and GRAY, L., 1996. Use of RAPD Markers as a Diagnostic Tool for the Identification of *Fusarium solani* Isolates that Cause Soybean Sudden Death Syndrome. Plant Dis., 80: 1228-1232.

AÇIK, L., 2002. Populasyon Genetiği (W.S. Klug, and M.R. Clumming eds.; C. Öner çeviri, ed.) Genetik Kavramlar. Palme Yayıncılık, Ankara, s.683-711.

AGRIOS, C.N., 1997. Plant Pathology, Fourth Edition. APS Press, St. Paul, Mnn., p.327-335.

AIST, J.R., 1983. Structural Responses as Resistance Mechanisms. (J.A. Bailey and B.J. Deverall eds.) The Dynamics of Host Defence. Academic Press, Sydney, p.33-70.

AKGÜL, D.S. ve CANIHOŞ, Y., 2004. Kavunda Fusarium solgunluğuna karşı Acetochlor ve Trifluralin Herbisitleri Kullanılarak Dayanıklılığın Teşviki. Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi. J. Agric. Fac. Ç.Ü., V.19 (1): 45-52.

ALEXOPOULOS, C.J., MIMS, C.N. and BLACKWELL, M., 1996. Introductory Mycology, John Willey & Sons Inc. USA 869 p.

ANONYMOUS, 2000. Food and Agriculture Organization (FAO). http://apps.fao.org

ANONYMOUS, 2001, Devlet İstatistik Enstitüsü. Tarımsal Yapı (Üretim, Fiyat, Değer), Yayın No: 2758, Ankara.

ANONYMOUS, 2004. Adana ve Mersin Tarım İl Müdürlüğü Proje ve İstatistik Şubesi Verileri.

ARDA, M., 1995. Biyoteknoloji (Bazı Temel İlkeler). Kükem Derneği Bilimsel Yayınları, 3. baskı, Ankara, No: 3, 432s.

ARI, Ş., 1999. DNA'nın Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Çoğaltılması (G. Temizkan, N. Arda, eds.) Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. BİYOGEM, Yayın No: 1, s.57-67.

ASSIGBETSE, K.B., FERNANDEZ, D., DUBOIS, M.P. and GEIGERN, J.P. 1994. Differentiation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* Races on Cotton by Random Amplified Polymorfic DNA (RAPD) Analysis. Phytopathology, 84: 622-626.

BAYSAL, Ö., SOYLU, E.M. and SOYLU, S., 2003. Induction of Defence-Related Enzymes and Resistance by the Plant Activator Acibenzolar-S-Methyl in Tomato Seedlings Against Bacterial Canker Caused by *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*. Plant Pathol., 52: 747-753.

BELABID, L., BAUM, M., FORTAS, Z., BOUZNAD, Z. and EUJAYL, I., 2003. Pathogenic and Genetic Characterization of Algerian Isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis* by RAPD and AFLP Analysis. African Journal of Biotechnology, Vol. 3 (1): 25-31.

BENHAMOU, N., 1992. Ultrastructural Detection of B-1,3-Glucans in Tobacco Root Tissues Infected by *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* Using a Gold-Complexed Tobacco B-1,3-Glucanase. Physiol. Mol. Plant Pathol., 41: 351-370.

BENNETT, M.H. and WALLSGROVE, R.M., 1994. Secondary Metabolites in Plant Defence Mechanisms. New Phytology, 44: p.321-333.

BIGGS, A.R. and MILES, N.W., 1988. Association of Suberin Formation in Uninoculated Wounds with Susceptibility to *Leucostoma cincta* and *L. persoonii* in Various Peach Cultivars. Phtytopathology, 78: 1070-1074.

BILES, C.L. and MARTYN, R.D., 1989. Local and Systemic Resistance Induced in Watermelons by formae speciales of *Fusarium oxysporum*. Phytopathology, 79: 856-860.

BOKSHI, A.I., MORRIS, S.C. and DEVERALL, B.J. 2003. Effect of Benzothiadiazole and Acetylsaliciylic Acid on B-1,3-Glucanase Activity and Disease Resistance in Potato. Plant Pathol., 52: 22-27.

BOOTH, C., 1971. The Genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England, 237p.

BORA, T. ve KARACA, İ., 1970. Kültür Bitkilerinde Hastalığın ve Zararın Ölçülmesi. Ege Üniversitesi Ziraat Fak. Yardımcı Ders Kitabı, Yayın No.167 Bornova, 43s.

BUELL, C.R., 1999. Genes Involved in Plant-Pathogen Interactions (A.A. Agrawal, S. Tüzün and E. Bent, eds.) Induced Plant Defenses Against Pathogens and Herbivores. Biochemistry, Ecology and Agriculture. APS Press St. Paul, Minnesota. p.73-93.

CACHINERO, J.M., HERVÁS, A., JIMÉNEZ-DIAZ, R.M. and TENA, M., 2002. Plant Defence Reactions Against Fusarium Wilt in Chickpea Induced by Incompatible Race-0 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* and Nonhost Isolates of *F. oxysporum*. Plant Pathol., 51:765-776.

CAI, G., ROSEWICH G.L., SCHNEIDER, R.W., KISTLER, H.C., DAVIS, R.M., ELIAS, K.S. and MIYAO, E.M., 2003. Origin of Race-3 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* at a Single Site in California. Ecology and Population Biology, APS Press, Phytopathology, 1014-1022.

CANIHOŞ, Y. and BEYNON, J., 1996. Identification of Genes Which are Spesifically Expressed in the Compatible Interaction Between Lettuce and *Bremia lactucae*. The Journal of Turkish Phytopathology, 25(1-2): 1-9.

_____, 1997. Effect of Herbicides on Verticillium Wilt of Cotton and Induction of Phytoalexin Gossypol Production by Host Cells. J. Plant Dis. and Protec. 104(5): 516-522.

CAPELLI, C., POLVERARI, A., STRAVATO, V. M., 1993. *Fusarium oxysporum* f. sp. *melongenae* on the Eggplant. Informatore-Fitopatologica, 43(10): 51-54.

_____, STRAVATO, V.M., ROTINO, G.L. and BUONAURIO, R., 1995. Source of Resistance Among *Solanum* spp. to an Italian Isolate of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melongenae*. *IXth* Eucarpia Meeting on Genetics and Breeding of Capsicum & Eggplant. Budhapest (Hungary), 21-25 August, 221-224.

CARON, M., FORTIN, J.A. and RICHARD, J., 1986. Effect of *Glomus intraradices* on Infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersisci* Tomatoes over a 12-Week Period. Can. J. Bot., 64: 552-556.

CHELKOWSKI, J., BATEMEN, G.L. and MIROCHA, C.H.J., 1999. Identification of Toxigenic *Fusarium* Species Using PCR Assay. J. Phytopathology, 147: 307-311.

CHEN, Z., SILVA, H. and KLESSIG, D.F., 1993. Active Oxygen Species in the Induction of Plant Systemic Acquired Resistance by Salicylic Acid. Proceeding of the National Academy of Sciences USA, 262: 1883-1885.

CHIOCCHETTI, A., GHIGNOSE, S., MINUTO, A., GULLINO, M.L., GARIBALDI, A. and MIGHELI, Q., 1999. Identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *basilici* Isolated from Soil, Basil Seed and Plants by RAPD Analysis. Plant Dis., 83:576-581.

COHEN, R., RIOV, J., LISKER,N. and KATAN, J., 1986. Involvement of Ethylene in Herbicide-Induced Resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. Phytopathology, 76: 1281-1285.

_____, Y., 1994. Local and Systemic Control of *Phytophthora infestans* in Tomato Plants by DL-3-Amino-n-Butanoic Acids. Phytopathology, 84: 55-59.

_____, BLAIER, B., SCHAFFER., A.A. and KATAN, J., 1996. Effect of Acetochlor Treatment on Fusarium Wilt and Sugar Content in Melon Seedlings. European J. Plant Pathol., 102: 45-50.

COLE, D.L. 1999. The Efficacy of Acibenzolar-S-Methyl, an Inducer of Systemic Acquired Resistance, Against Bacterial and Fungal Diseases of Tobacco. Crop Protec.,18:267-273.

CRAMER, R.A., BRYNE P, F., BRICK, M.A., WICKLIFFE, E. and SCHWARTZ, H.F. 2003. Characterization of *Fusarium oxysporum* Isolates from Common Bean and Sugar Beet Using Pathogenicity Assay and Random-Amplified Polymorphic DNA Markers. J. Phytopathology, 151: 352-360.

DANN, E. K. and DEVERALL B.J., 2000. Activation of Systemic Disease Resistance in Pea by an Avirulent Bacterium or Benzothiadiazole, but not by a Fungal Leaf Spot Pathogen. Plant Pathol., 49; 324-332.

DARLING, D.C. and BRICKELL, P.M., 1994. Nucleic Acid Blotting: The Basics. Oxford University Press Inc., New York, 111p.

DELEN, N. and YILDIZ, M., 1982., Fungicide Resistance of some Fungal Pathogens Isolated from Greenhouses in Turkey. J. Turk. Phytopath., 11 (1-2): 33-40.

DESJARDINS, A.E. and PROCTOR, R.H., 2001. Biochemistry and Genetics of *Fusarium* Toxins (B.A. Summerel, j.F. Leslie, D. Backhouse, W.L. Bryden, and L.W. Burgess, eds.). *Fusarium*. Paul E. Nelson Memorial Symposium. APS Pres, St. Paul, Minn., p.50-69.

DEVERALL, B.J. and DANN, E.K., 1995. Induced Resistance in Legumes. (R. Hammerschmidt and J. Kuc, eds.) Induced Resistance to Disease in Plants. Kluwer Academic Publishers, London, p.1-30.

DICKINSON, C.H. and LUCAS, J.A., 1982. Plant Pathology and Plant Pathogens. (Basic Microbiology; 2nd, V.6, J.F. Wilkinson ed.) Blackwell Scientific Publicatios, London, 229p.

DIETRICH, R.A., DELANEY, T.P., UKNESS, S.J., WARD, E.R., RYALS, J.A. and DANGL, J.L., 1994. *Arabidopsis* Mutants Simulating Disease Resistance Response. The Plant Cell, 77: 565-577.

DIXON, R.A., 1986. The Phytoalexin Response: Elicitation, Signalling and Control of Host Gene Expression. Biological Reviews, 61: 239-291.

_____, and HARRISON, M.J., 1990. Activation, Structure, and Organisation of Genes Involved in Microbial Defence in Plants. Advances in Genetics. 28: 165-234.

DONG, H. and COHEN, Y., 2001. Ekstracts of Killed *Penicillium chrysogenum* Induce Resistance Against Fusarium Wilt of Melon. Phytoparasitica, 29(5): 421-430.

_____, WEIJIANG, L., ZHANG, D. and TANG, W., 2003. Differential Expression of Induced Resistance by an Aqueous Extract of Killed *Penicillium chrysogenum* Against Verticillium Wilt of Cotton. Science Direct. Crop Protection, 22: 129-134.

EBEL, J., 1986., Phytoalexin Synthesis: The Biochemical Analysis of the Induction Process. Annu. Rev. Phytopathol., 24: 235-264.

_____, COSIO, E.G., 1994. Elicitors of Plant Defense Responses. International Review of Cytology, 148: p.1-36.

ELEKÇİOĞLU, H., CANIHOŞ, Y., ÖZGÖNEN, H. and SÖĞÜT, M.A., 2000. Induction of Resistance on Eggplants Against Verticillium Wilt Disease and Root-Knot Nematodes Using Biotic and Abiotic Factors. Integrated Control in Protected Crops. Mediterrenean Climate IOBC wprs Bulletin, 23 (1): 63-69.

EL-KHADEM, M. and PAPAVIZAS, G.C., 1984. Effect of the Herbicides EPTC and Linuron on Cotton Diseases Caused by *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. Plant Pathol., 33: 411-416.

ERZURUM, K. and MADEN, S., 1995. Evoluation of Various Treatments of Inducing Resistance to Fusarium Wilt on Melon. J. Turk. Phytopathol., 24(3): 121-134.

FRIEDRICH, L., LAWTON, K., RUESS, W., MASNER, P., SPECKER, N., RELLA, M.G., MEIER, B., DINCHER, S., STAUB, T., MÉTRAUX, J.P., KESSMANN, H. and RYALS, J., 1996. A Benzothiadiazole Derivative Induces Systemic Acquired Resistance in Tobacco. The Plant Journal 10: 61-70.

FUCHS, J.G., LOCCOZ, Y. M. and DÉFAGO, G., 1997. Nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Strain Fo47 Induces Resistance to Fusarium Wilt in Tomato. Plant Dis., 81: 492-496.

_____, MOËNNE-LOCCOZ, Y. and DÉFOGO, G. 1999. Ability of Nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47 to Protect Tomato Against Fusarium Wilt. Biological Control. Academic Press, 14 (2): 105-110.

GAFFNEY, T., FRIEDRICH, L., VERNOJI, B., NEGROTTO, D., UKNESS, N.G., WARD, S., KESSMAN, E. and RYALS, J., 1993. Requirement of Salicylic Acid for the Induction of Systemic Acquired Resistance, Science, 261: 754-756.

GAHAN, P.B., 1984. Plant Histochemistry and Cytochemistry. Academic Press, London. 291p.

GESSLER, C. and KUC, J., 1982. Induction of Resistance to Fusarium Wilt in Cucumber by Root and Foliar Pathogens. Phytopathology, 72: 1439-1441.

GOODMANN, R.N. and NOVACKY, A.J., 1994. The Hypersensitive Reaction in Plants to pathogens. APS Press, St. Paul. Minn., 244p.

GORDON, T. R., OKOMOTO, D. and JACOBSON, D. J., 1989. Colonization of Muskmelon and Nonsusceptible Crops by *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* and Other Spesies of *Fusarium*. Phytopathology, 79: 1095-1100.

_____ and MARTYN, R.D., 1997. The Evolutionary Biology of *Fusarium oxysporum*. Annu. Rev. Phytopathol., 35: 111-128.

GOTH, R. W. and WEBB, R. E., 1981. Sources and Genetics of Host Resistance in Vegetable Crops. (M.E. Mace, A.A. Bell, and C.H. Beckman, eds.), Fungal Wilt Diseases of Plant Academic Press, London, p.377-409.

GÖRLACH, J., VOLRATH, S., KNAUF-BEITER, G., HENGY, G., BECKHOVE, U., KOGEL, K.H., OOSTENDORP, M., STAUB, T., WARD, E., KESSMAN, H. and., RYALS, J., 1996. Benzothiadiazole, a Novel Class of Inducers of Systemic Acquired Resistance, Activates Gene Expression and Disease Resistance in Wheat The Plant Cell, 8: 629-643.

GRINSTEIN, A., LISKER, N., KATAN, J. and ESHEL, Y., 1984. Herbicide-Induced Resistance to Plant Wilt Disease. *Physol. Plant pathol*. 24: 347-356.

HAHLBROCK, K. and SCHEEL, D., 1987. Biochemical Responses of Plant to Pathogens. (I. Chet, ed.) Innonative Approaches to Plant Disease Control. John Wiley & Sons. Inc., Canada, p.229-254.

HAMMERSCHMIDT, R. and KUC, J., 1995. Induced Resistance to Disease in Plants. Kluwer Academic Publishers, London, 182p.

_____ and SMITH-BECKER, J.A., 1999. The Role of Salicylic Acid in Disease Resistance (A.A Agrawal, S. Tüzün, and E. Bent, eds.) Induced Plant Defenses Against Pathogens and Herbivores. APS Press, St. Paul, Minn., p.19-36.

HARIS, D.C., YANG, J.R. and RIDOUT, M.S. 1993. The Detection and Estimation of *Verticillium dahliae* in Naturally Infested Soil. Plant Pathol., 42: 238-250.

HAUGAARD, H. COLLINGE D. B. and LYNGKJAER M.F., 2002. Mechanisms Involved in Control of *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* in Barley Treated with Mycelial Extracts from Cultured Fungi. Plant Pathol., 51: 612-620.

HAWKSWORTH, D.L., KIRK, P.M., SUTTON, B.C. and PEGLER, D.N., 1995. Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi. 8th edition. C.A.B., International, Wallingford. 616p.

HILLOCKS, R. J., 1992. Fusarium Wilt. (Hillocks, R. J., ed), Cotton Diseases C.A.B., International, UK, p.127-160.

HORNBY, D. and FITT, B.D.L., 1981. Effects of Root Invading Fungi on Structure and Function of Cereal Roots. (P.G. Ayres ed.) Effects of Disease on the Physiology of the Growing Plant. Cambridge University Press, Cambridge p.101-130.

HWANG, B.K., SUNWOO, Y.J., KIM, J.Y. and KIM, B.S., 1997. Accumulation of B-1,3-Glucanase and Chitinase Isoforms, and Salicylic Acid in the DL-B-Amino-n-Butyric Acid Induced Resistance Response of Pepper Stems to *Phytophthora capsici*. Physiological and Molecular Plant Pathol., 51: 305-322.

INGHAM, J.L., 1981. Phytoalexin Induction and its Taxonomic Significance in the Leguminosae (sub-family Papilionoideae). (R.M. Polhill and P.h.R. Raven, eds.) Advances in Legume Systematics. Royal Botanic Gardens, Key, p.599-626.

ISAAC, S., 1992. Fungal-Plant Interactions. Chapman & Hall, London, 418p.

ISHII, H., TOMITA, Y., HORIO, T., NARUSAKA, Y., NAKAZAWA, Y., NISHIMURA, K. and IWAMOTO, S., 1999. Induced Resistance of Acibenzolar-S-Methyl (CGA 245704) to Cucumber and Japanese Pear Diseases. Eur. J. Plant Pathol., Kluwer Academic Publishers, 105: 77-85.

KANG Z. and BUCHENAUER, H., 2000. Ultrastructural and Immunocytochemical Investigation of Pathogen Development and Host Responses in Resistant and Susceptible Wheat Spikes Infected by *Fusarium culmorum*. Physiol. Mol. Plant Pathol., 57: 255-268.

_____ and BUCHENAUER, H., 2001. Ultrastructural Studies on the Mode of Action of Fluorescent Pseudomonads Alone and in Combination with Acibenzolar-S-Methyl Effective Against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in Tomato Plants. Zeitschrift fur Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz. 108 (5): 513-529.

_____ and BUCHENAUER, H., 2003. Immunocytochemical Localization of Cell Wall-Bound Thionins and Hydroxyprolin-Rich Glicoproteins in *Fusarium culmorum*-Infected Wheat Spikes. J. Phytopathol., 151: 120-129.

KARMAN, M., 1971., Bitki Koruma Araştırmalarında Genel Bilgiler. Denemelerin Kuruluşu ve Değerlendirme Esasları. T.C. Tarım Bakanlığı Zirai Mücadele ve Zirai Karantina Genel Müdürlüğü Yayınları. Bornova, İzmir, 279s.

KASHYAP, V., MANDAOKAR, A.D. and SHARMA, R. P., 2003. Genetic Engineering for the Improvement of Eggplant (*Solanum melongenae* L.) AgBiotech Newsand Information, 10: 329-332.

KATAN, T., 1997. Vegetative Compatibility in Populations of *Verticillium*-an Overview. (E.J. Tjamos, R.C. Rowe, J.B. Heale and D.R. Fravel, eds.) Advances in *Verticillium* Research and Disease Management. APS Pres. St. Paul, Mnn., p.69-86.

_____ and Di PRIMO, P., 1999. Current Status of Vegetative Compatibility Groups in *Fusarium oxysporum*: Supplement. Phytoparasitica, 24:1-5.

KAUSS, H., FRANKE, R., KRAUSE, K., CONRATH, U., JEBLICK, W., GRIMMING, B. and MATERN, U., 1993. Conditioning of Parsley (*Petroselinum crispum* L.) Suspension Cells Increases Elicitor-Induced Incorporation of Cell Wall Phenolics. Plant Physiol., 102: 459-466.

KAYRIN, L., AKSOY, K., TULİ, A., ÇÜRÜK, M.A., ve ATİLLA, G., 2003. Tanıda DNA Teknikleri. Çukurova Üniversitesi Biyokimya Anabilim Dalı, VI. Biyokimya Yaz Okulu, Adana, 64s.

KELLY, A., ALCALA-JIMENEZ, A.R., BAINBRIDGE, B.W., HEALE, J.B., PEREZ-ARTES, E. and JIMENEZ, R.M., 1994. Use of Genetic Fingerprinting and Random Amplified Polymorfic DNA to Characterize Pathotips of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* Infecting Chickpea. Phytopathology, 84: 1293-1298.

KESSMANN, H., STAUB, T., HOFMANN, C., MAETZKE, T., HERZOG, J., WARD, E., UKNES, S. and RYALS, J., 1994. Induction of Systemic Acquired Disease Resistance in Plants by Chemicals. Annu. Rev. Phytopathol., 32 : 439-459.

KISTLER, H.C., 2001. Evolution of Host Specificity in *Fusarium oxysporum* (B.A. Summerel, J.F. Leslie, D. Backhouse, W.L. Bryden and L.W. Burgess, eds.). *Fusarium*. Paul E. Nelson Memorial Symposium. APS Pres, St. Paul, Minn., p. 70-82.

KLESSIG, D.A. and MALAMY, J., 1994. The Salicylic Acid Signal in Plants. Plant Mol. Biol. 26: 1439-1458.

KUC. J., 1987. Immunization and its Applicability for Disease Control. (I. Chet ed.) Innovative Approaches to Plant Disease Control. John Willey & Sons, New York, p.255-274.

KURAMAE, E.E. and De SOUZA, N.L., 2002. Variabilidade Genética Entre formae speciales de *Fusarium oxysporum* e Raças 1 e 2 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Através de RAPD e Sequências de Regioes ITS e rDNA. Acta Scientiarum, 24(5): 1481-1485.

LARKIN, R.P., HOPKINS, D.L. and MARTIN, F.N., 1996. Suppression of Fusarium Wilt of Watermelon by *Fusarium oxysporum* and other Microorganisms Recovered from a Disease Suppressive Soil. Phytopathology, 86: 812-819.

LAWRENCE, C.B., JOOESTEN, M.H.A.J. and TÜZÜN, S., 1996. Differential Induction of Pathogenesis-Related Proteins in Tomato by *Alternaria solani* and Association of a Basic Chitinase Isozyme with Resistance. Physiol. Mol. Pathol., 48: 361-377.

LAWTON, K.A., FRIEDRICH, L., HUNT, M., WEYMAN, K., DELANEY, T., KESSMANN, H., STAUB, T. and RYALS, J., 1996. Benzothiadiazole Induces Disease Resistance in *Arabidopsis* by Activation of the Systemic Acquired Resistance Signal Transduction Pathway. The Plant Journal, 10: 71-82.

LECOQ, H., BLANCARD, F., BERTRAND, P., GLANDARD, A., MOLOT et MAS, P., 1991. Techniques d'Inoculation Artificielle du Melon Avec Differents Agents Pathogénes Pour la Sélection de Variétés Resistances. I. N. R. A. Domaine Saint Maurice BP 94 84143 Montfavet Cedex.

LEE, Y. K., HONG, J. K., HIPPE-SANWALD, S. and HWANG, B. K., 2000. Histological and Ultrastructural Comparisons of Compatible and DL-ß-Amino-n-Butyric-Acid-Induced Resistance Responses of Pepper Stems to *Phytophthora capsici*. Physiol.Mol. Plant Pathol., 57: 269-280.

LIU, L., KLEOPPER, J.W. and TÜZÜN, S., 1995. Induction of Systemic Resistance in Cucumber Against Fusarium Wilt by Plant-Promoting-Rhizobacteria. Phytopathology. 85: 695-698.

LOUWS, F.J., WILSON, M., CAMPBELL, H.L., CUPPELS, D.A., JONES, J.B., SHOEMAKER, P.B., ŞAHIN, F. and MILLER, S., 2001. Field Control of Bacterial Spot and Bacterial Speck of Tomato Using a Plant Activator. Plant Dis., 85: 481-488.

LOW, P.S. and MERIDA, J.R., 1996. The Oxidative Burst in Plant Defense: Function and Signal Transduction. Physiologia Plantarum, 96: 533-542.

MANSFIELD, J.W., 1990. Recognition and Response in Plant/Fungus Interactions (R.S.S. Frasser, ed.) Spring-Verlag, Berlin, p.31-52.

MARLEY, P.S. and HILLOCKS R.J., 1996. Effect of Root-Knot Nematodes (*Meloidogyne* spp.) on Fusarium Wilt in Pigeonpes (*Cajanus cajan*). Field Crop Research, 46:15-20.

MARTYN, R. D., BILES, C.L. and DILLARD, E. A., 1991. Induced Resistance to Fusarium Wilt of Watermelon under Simulated Field Conditions. Plant Dis., 75: 874-877.

MELOUK, H.A., 1992. *Verticillium*. (L.L. Singleton, J.D. Mihail, and C.M. Rush eds.) Methods for Research on Soilborne Phytopathogenic Fungi. APS Press, St. Paul, MnN., p.175-179.

MERCIER, J., ROUSSEL, D., CHARLES, M. T. and ARUL, J., 2000. Systemic and Local Responses Associated with UV and Pathogen Induced Resistance to *Botrytis cinerea* in Stored Carrot. Phytopathology, 90: 981-986.

MOCHIZUKI, H., SAKATA, Y., YAMAKAWA, K., NISHIO, T., KOMOCHI, S., NARIAKAWA, T. and MONMA, S., 1997. Eggplant Parental Line 1 and Eggplant Breeding Line Resistant to Fusarium Wilt. Bulletin of the National Research Institue of Vegetables, Ornamental Plants and Tea. Series A. Vegetables and Ornamental Plants. No: 12, p. 85-90.

NEI, M., 1978. Estimation of Average Heterozygosity and Genetic Distance from a Small Number of Individuals. Genetics, 89: 583-590.

NELSON, A.J., TOUSSOUN, T.A. and MARASAS, W.F.O., 1983. *Fusarium* Species. The Pennsylvania State University Press University Park and London, 190p.

_____, DIGNANI, M.C. and ANAISSIE, E.J., 1994. Taxonomy, Biology, and Clinical Aspects of *Fusarium* Species. Clin. Microbiol. Rev., 7: 479-504.

_____, ELIAS K.S., ARÉVALO E. G., DARLINGTON, L.C. and BAILEY, B.A., 1997. Genetic Characterization by RAPD Analysis of Isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. Associated with an Emerging Epidemic in Peru. Phytopathology, 87: 1220-1225.

NICHOLSON, P., and HAMMERSCHMIDT, R., 1992. Phenolic Compounds and Their Role in Disease Resistance. Annu. Rev. Phytopathol., 30: 369-389.

_____, 2001. Molecular Assays as Aıds in the Detection, Diagnosis and Quantification of *Fusarium* Species in Plants. (B.A. Summerel, J.F. Leslie, D. Backhouse, W.L. Bryden, and L.W. Burgess, eds.). *Fusarium*. Paul E. Nelson Memorial Symposium. APS Pres, St. Paul, Minn., p.176-191.

NIKI, T., MITSUHARA, I., SEO, S., OHTSUBO, N. and OHASHI, Y., 1998. Antagonistic Effect of Salicylic Acid and Jasmonic Acid on the Expression of Pathogenesis-Releated (PR) Protein Genes in Wounded Mature Tobacco Leaves. Plant Cell Physiol., 39: 500-507.

OZERETSKOVSKAYA, O.L., 1995. Induced Resistance in the *Solanaceae*. (R. Hammerschmidt and J. Kuc, eds.) Induced Resistance to Disease in Plants. Kluwer Academic Publishers, London, p.31-62.

ÖĞÜŞ, A., 2002. DNA Replikasyonu ve Rekombinasyonu. (W.S. Klug, and M. R. Clumming, eds.; C. Öner çeviri, ed.) Genetik Kavramlar. Palme Yayıncılık, Ankara, s.321-347.

ÖZER, N. and SORAN, H., 1991. *Fusarium* Genus and *Fusarium* Species Isolated from the Cultivated Plants in Turkey. J. Turk. Phytopathol., 20:69-80.

PEEVER, T.L., CANIHOŞ, Y., OLSEN, L., IBANEZ, A., LIU, Y.C. and TIMMER, L. W., 1999. Population Genetic Structure and Host Specificity of *Alternaria* spp. Causing Brow Spot of Minneola Tangelo and Rough Lemon in Florida. Phytopathology 89: 851-860.

PEGG, G.F. and BRADY, B.L., 2002. Werticillium Wilts. CABI Publishing, CAB International, UK. 552p.

RAMUSSEN, J.B., HAMMERSCHMIDT, R. and ZOOK, M.N., 1991. Systemic Induction of Salicylic Acid Accumulation in Cucumber After Inoculation with *Pseudononas syringae* pv. *syringae*. Plant Physiol., 97: 1342-1347.

RASKIN, I., 1992. Role of Salicylic Acid in Plants. Annual Review of Plant Physiology and Plant Mol. Biol., 43: 439-463.

RAUPACH, G.S. and KLOEPPER, J.W., 2000. Biocontrol of Cucumber Diseases in the Field by Plant Growth Promoting Rhizobacteria with and without Methyl Bromide Fumigation. Plant Dis., 84: 1073-1075.

RICHMOND, S., ELLISTON, J.E. and KUC, J., 1979. Penetration of Cucumber Leaves by *Colletotrichum lagenarium* is Reduced in Plants Systemically Protected by Previous Infection with the Pathogen. Physiol. Plant Pathol. 14: 329-338.

RICKWOOD, D. and HAMES, B.D., 1990. Gel Electrophoresis of Nucleic Acids. A Practical Approach, 2nd. Oxford University Press, New York. 311p.

RIZZA F., MENNELA, G., COLLOINER, C., SHACHAR, D., KASHYAP, V., RAJAM, M.V., PRESTERA, M. and ROTINO, L.G., 2002. Androgenic Dihaploids from Somatic Hybrids Between *Solanum melongena* and *Solanum aethiopicum* Group Gilo as a Source of Resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *melongenae.* Springer-Verlag.

SACKS, W., R., HALBROCKS, K. and SCHELL, D., 1993. Characterization of a Glycoprotein Elicitor from *Phytophthora megasperma* (B. Fritig, M. Legrant eds.) Mechanisms of Plant Defense Responses. Kluwer Academic Publisher, London, p.144-147.

SAMBROOK, E., FRITSCH, F. and MANIATIS, T., 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manuel, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

SHIRASU, K., NAKAJIMA, H., RAJASEKHAR, V.K., DIXON, R.A. and LAMB, C., 1997. Salicylic acid Potentiates an Agonist-Dependent Gain Control that Amplifies Pathogen Signals in the Activation of Defense Mechanisms. The Plant Cell, 9: 261-270.

SNYDER, W.C. and SMITH, S.N., 1981. Current Status (Mace M.E., Bell, A.A., and Beckman, C. H.) Fungal Wilt Diseases of Plant, Academic Press, London, p.25-48.

SOYLU, E.M., 1999. Mildiyö Etmeni (*Peronospora parasitica*) ve Konukçusu *Arabidopsis thaliana* Arasındaki İlişkilerin Sito ve Histokimyasal Yöntemlerle İncelenmesi. Akdeniz Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Doktora Tezi. 160s.

STASWICK, P.E. and LEHMAN, C.C., 1999. Jasmonic Acid-Signaled Responses in Plants. (A.A. Agrawal, S.Tüzün and E. Bent, eds.) Induced Plant Defenses Against Pathogens and Herbivores. Biochemistry, Ecology and Agriculture. APS Press St. Paul, Minn., p.117-136.

STEEKELENBURG, N.V., 1976. Fusarium Wilt of Eggplant in the Netherlands J. Plant Pathol., 82: 5, 191-192.

STERMER, B.A., 1995. Molecular Regulation of Systemic Induced Resistance. (R. Hammerschmidt and J. Kuc, eds.) Induced Resistance to Disease in Plants. Kluwer Academic Publishers, London. p.111-139.

STOLTZENBURG, M.C., AIST, J.R. and ISRAEL, H.W., 1984a. The Role of Papillae in Resistance to Powdery Mildew Conditioned by the Ml-o Gene in Barley. I: Correlative Evidence. Physiological Plant Pathology, 25: 337-346.

_____, AIST, J.R. and ISRAEL, H.W., 1984b. The Role of Papillae in Resistance to Powdery Mildew Conditioned by the Ml-o Gene in Barley. II: Experimental Evidence. Physiological Plant Pathology, 25: 347-361.

STONER, M.F., 1981. Ecology of *Fusarium* in Noncultivated Soils. (P.E. Nelson, T.A. Toussoun and R.J. COOK, eds.) *Fusarium* Diseases, Biology, and Taxonomy. The Pennsylvania State University Pres, University Park., p. 276-286.

STRAVATO, V.M. and CAPELLI, C., 2000. Genetic Diversity in *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis.* Diseases of Cucurbitaceous and Solanaceous Vegetable Crops the Mediterranean Region. OEPP/EPPO Bulletin 30(2): 247-249.

SUMMEREL, B.A., LESLIE, J.F., BACKHOUSE, D., BRYDEN, W.L. and BURGESS, L.W., 2001. *Fusarium*, Paul E. Nelson Memorial Symposium. APS Press, St. Paul, Minnesota, p.1-192.

SUNWOO, J. Y., LEE, Y.K. and HWANG, B.K., 1996. Induced Resistance Against *Phytophthora capsici* in Pepper Plants in Respose to DL-B-Aminobutryric Acid. European Journal of plant Pathology, 102: 663-670.

SWARUP, V., 1995. Genetics Resources and Breeding of Aubergine (*Solanum melongena* L.). Acta Horticulture, 412, November 1995, Solanacea for Fresh Market, p.71-79.

ŞENİZ, V., 1992. Domates, Biber ve Patlıcan Yetiştiriciliği. Tarımsal Araştırmaları Geliştirme Vakfı (TAV) Yalova. Yayın No: 26, 174s.

TALLY, A., OOSTENDORP, M., LAWTON, K., STAUB, T. and BASSI, B., 1999. Commercial Development of Elicitors of Induced Resistance to Pathogens. (A.A. Agrawal, S.Tüzün and E. Bent, eds.) Induced Plant Defences Against Pathogens and Herbivores. Biochemistry, Ecology and Agriculture. APS Press St. Paul, Minnesota., p.357-369.

THRANE, U., 2001. Development in the Taxonomy of *Fusarium* Species Based on Secondary Metabolites. (B.A. Summerel, J.F. Leslie, D. Bachouse W.L. Bryden and L.W., Burgess, eds.). *Fusarium*. Paul E. Nelson Memorial Symposium. APS Pres, St. Paul, Minn., p.29-49.

TÜZÜN, S., NESMITH, W., FERRISS, R.S. and KUC, J., 1986. Effects of Stem Injections with *Peronospora tabacina* on Growth of Tobacco and Protection Against Blue Mold in the Field. Phytopath., 76:938-983.

_____, RAO, M.N., VOGELLI, L., SCHARDLE, C.L. and KUC, J., 1989. Induced Systemic Resistance to Blue Mold: Early Induction and Accumulation of Chitinase, ß-1,3-Glucanase and Other Pathogenesis-Releated Proteins in Immunizer Tobacco. Phytopath., 79: p.979-983.

_____ and KLOEPPER, J., 1995. Practical Application and Implementation of Induced Resistance. (R. Hammerschmidt and J. Kuc, eds.) Induced Resistance to Disease in Plants. Kluwer Academic Publishers, London. p.152-168.

_____, GAY, P.A., LAWRENCE, C.B., ROBERTSON, T.L. and SAYLER, R.J., 1997. Biotechnological Application of Inheritable and Inducible Resistance to Disease in Plants. (P.M. Gresshoff ed.) Technology Transfer of Plant Biotechnology. CRS Press, Inc., New York, p.25-40.

_____ and BENT, E., 1999. The Role of Hydrolytic Enzymes in Multigenic and Microbially-Induced Resistance in Plants. (A.A. Agrawal, S. Tüzün., and E. Bent eds.) Induced Plant Defenses Against Pathogens and Herbivores. Biochemistry, Ecology and Agriculture. APS Press, St. Paul, Minn., p.95-115

VAKALOUNAKIS, D.J., and FRAGKIADAKIS, G.A., 1999. Genetic Diversity of *Fusarium oxysporum* Isolates from Cucumber: Differentiation by Pathogenicity, Vegetative Compatibility and RAPD Fingerprinting. Phytopath., 89:161-168.

VALLET, C., CHABBERT, B., CZANINSKI, Y. and MONTIES, B., 1996. Histochemistry of Lignin Deposition During Sclerencyma Differentiation in Alfalfa Stems. Annals of Botany, 78:625-632.

VAN LOAN, L.C., BAKKER, P.A.H.M. and PIETERSE, C.M.J., 1998. Systemic Resistance Induced by Rhizosphere Bacteria. Annu. Rev. Phytopathol., 36:453-483.

VANCE, G.P., KIRK, T.K. and SHERWOOD, R.T., 1980. Lignification as a Mechanism of Disease Resistance. Annual Review of Phytopathology, 18: 259-288.

VELOSO, M.M., MELO, E.M.P.F., JORGE-SILVA, M.L. and BRAVO, M.A., 2000. Genetic Diversity in *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. Diseases of Cucurbitaceous and Solanaceous Vegetable Crops the Mediterranean Region. OEPP/EPPO Bulletin 30 (2):195-197.

VOS, P.H.R., BLEEKER, M., REIJANS, M., VAN DE LEE, T., HORNES, M., FRIJTERS, A., POT, J., PELEMAN, J.,KUIPER, M. and ZABEAU, M., 1995. AFLP: A New Technique for DNA Fingerprinting. Nucl. Acids Res. 23:4407-4414.

WALTMÜLLER, T., FEGEL, M. and EBEL, J., 1993. Enhancement of β-Glucan and Hepta-β-Glucoside Elicitor Activity in Soybean Protein Kinase Inhibitor K-252A. (B. Fritig, M. Legrant, eds.) Mechanisms of Plant defence responses.

WELLER, D.M., 1988. Biological Control of Soilborne Plant Pathogens in the Rhizosphere with Bacteria. Ann. Rev. Phytopathol., 26:379-407.

WILHELM, S., SAGEN, J. E. and TIETZ, H., 1974. Resistance to Verticillium Wilt in Cotton: Sources, Techniques of Identification, Inheritance Trends, and the Resistance Potential of Multiline Cultivars. Phytopathology, 64: 924-931.

WILLIAMS, J.G.K., KUBELIK, A.R., RAFALSKI, J.A. and TINGEY, S.V., 1990. DNA Polymorphisms Amplified by Arbitrary Primers are Useful as Genetic Markers. Nucleic Acids Res. 18:6531-6535.

WINDELS, C.E., 1992. *Fusarium*. (L.L. Singleton, J.D. Mihail and C.M. Rush eds.) Methods for Research on Soilborne Phytopathogenic Fungi. APS Press, St. Paul, Mnn., p.115-129.

WOO, S. L., ZOINA, A., DEL SORBO, G., LORITO, M., NANNI, B., SCALA, F. and NOVIELLO, C., 1996. Characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* by Pathogenic Races, VCGs, RFLPs and RAPD. Phytopathology, 86:966-973.

YEH, F.C., YANG, R.C. and BOYLE, T., 1999. POPGENE Version 1.32. Quick User Quide. Microsoft Window-Based Freeware for Population Genetic Analysis.

YÜCEL, S., 1989. Domates Fusarium Solgunluğuna (*Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Syn. and Hans.) Adana Zirai Mücadele Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Araştırma Yayınları Serisi, No:64, Adana..

_____, 1994. Akdeniz Bölgesi Örtü Altı Sebze Alanlarında Görülen Fungal Hastalıklar. Adana Zir. Müc. Ens. Müd. Bitki Kor. Bül., Cilt:34 No: 1-2.

_____, ELEKÇİOĞLU, İ.H., CAN, C., GÖZEL, U., SÖĞÜT, M., ÖZARSLAN, M. and AKSOY, E., 2001. The Second Year Result of Methyl Bromide Alternatives in the Eastern Mediterranean. Annual International Research Conference on Methly Bromide Alternatives and Emissions Reductions. International Drive Orlando, Florida.

ÖZGEÇMİŞ

1972 yılında Ankara'da doğdum. İlköğrenimimi Nevşehir'de, orta ve lise öğrenimimi de Niğde'de tamamladım. 1990 yılında, Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü'nde Lisans öğrenimime başladım ve 1994 yılında mezun oldum. Süleyman Demirel Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü'ne 1995 yılında, Araştırma Görevlisi olarak atandım. 1997 yılında Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitimime başladım. "Elma Phyllosphere Mikoflorası'nın Karaleke Hastalığı Etmeni *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint.'e Antagonistik Etkilerinin Saptanması" isimli yüksek lisans tezimi 2000 yılında tamamladım. Aynı yıl aynı enstitüde doktora programına başladım. Nisan-Eylül 2005 tarihleri arasında Sokrates/Erasmus Programı dahilinde Hohenheim Üniversitesi, Phytomedizin Enstitüsü'ne 6 ay süreyle görevlendirildim. Bu enstitüde "Studies on Formation, Isolation and Analysis of Fumonisin B_1 and B_2 Produced by *Fusarium moniliforme*" konulu projede görev aldım. 1995 yılından beri Bitki Koruma Bölümünde Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktayım. Evli ve bir çocuk annesiyim.

EKLER

EK 1. *In vitro* ve *In vivo* Denemelerde Kullanılan Ortamlar ve Stok Solüsyonlar

1. Patates Dekstroz Agar (PDA)

200 gr ..... Patates
20 gr ..... Dekstroz
20 gr ..... Agar
Toplam Hacim ..... 1000 ml

2. Czapek's Dox Agar (CDA)

20 gr ..... Sukroz
4 gr ..... KNO_3
2 gr ..... NaH_2PO_4
1 gr ..... $MgSO_4$ $7H_2O$
0.5 gr ..... KCl
0.1 gr ..... $FeSO_4$
15 gr ..... Agar
Toplam Hacim ..... 1000 ml

3. FOM için Sentetik Sıvı Ortam İçeriği

Solüsyon A

100 gr ..... $CaNO_3$
25 gr ..... KNO_3

Solüsyon B

25 gr ..... $MgSO_4$

Solüsyon C

2.5 gr ..... KPO_4

Solüsyon D

25 gr ..... Sitrik Asit
25 gr ..... Malik Asit

Oligoelementler

40 gr ..... Demirsequestrin

3 gr ..... $MgSO_4$

3 gr ..... $CuSO_4$

3 gr ..... $ZnSO_4$

6 gr ..... Boraks

Yukarda belirtildiği şekilde stok solüsyonlar hazırlandıktan sonra;

20 ml ..... Solüsyon A

20 ml ..... Solüsyon B

20 ml ..... Solüsyon C

1 ml ..... Solüsyon D

1 ml ..... Oligoelementler

50 gr ..... Sakkaroz

5 gr ..... Malt

Bütün solüsyonlardaki oranlar, 1 litre distile su için belirtilmiştir (Lecoq ve ark., 1991).

4. Lignin İçin Boyamada Kullanılan Kimyasallar (Phloroglucinol/HCl Testi)

Klorofili uzaklaştırmak için 1 gr Phloroglucinol 100 ml methanol (% 100)

Dokuları şeffaflaştırmak için 250 gr Kloralhidrat 100 ml distile su

Preparat hazırlamada, HCl ve Gliserol

EK 2. DNA Ekstraksiyonunda Kullanılan Kimyasallar ve Solüsyonlar

Aşağıda verilen kimyasal ve solüsyonların hazırlanmasında kaynak olarak "Molecular Cloning" esas alınmıştır (Sambrook ve ark., 1989). Hazırlanan stok solüsyondan çalışma stoklarının hazırlanmasında $M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$ formülü kullanılmıştır. (**M_1:** stok konsantrasyon, **V_1:** stoktan alınması gereken miktar, **M_2:** çalışma çözeltisi konsantrasyonu, **V_2:** çalışma çözeltisi miktarı).

Lysis Buffer (50 mM EDTA, 100 mM Tris, % 3 SDS, 100 μg/ml proteinaz K, % 1 sodyum bisulfit ($NaHSO_3$) (w/v))

Kimyasallar	**Stok Solüsyon**	**Son Konsantrasyon**
EDTA (0.5 M; pH 8.0)	18.61 gr/100 ml	10 ml (50 mM)
Tris (1M; pH 8.0)	12.11 gr/100 ml	10 ml (100 mM)
SDS	20 gr/100 ml	15 ml (% 3)
Proteinaz K	1 gr/100 ml	1 ml (100 μg)
$NaHSO_3$ (% 39)		2 ml
Toplam Hacim		**100 ml**

Potasyum asetat (CH_3COOK) (8 M)

78.50 gr Potasyum asetat 60 ml distile su içerisinde çözünmüş, hacim 100 ml'ye tamamlamış ve otoklav edilip (121 °C'de 15-20 dak.) 4 °C'de saklanmıştır.

Sodyum Klorür (NaCl) (5 M)

29.2 gr NaCl 100 ml distile su içerisinde çözünmüş, otoklav edilmiş ve 4 °C'de saklanmıştır.

% 70'lik Etanol

70 ml % 99'luk etanol ile 29 ml su karıştırılarak % 70'lik etanol hazırlanmıştır.

Fenol-Kloroform-isoamylalkol (25:24:1)

50 ml ..... Fenol

48 ml ..... Kloroform

2 ml ..... Isoamylalkol

Toplam Hacim ..... 100 ml

Kloroform/Isoamylalkol (24:1)

48 ml ..... Kloroform

2 ml ..... Isoamylalkol

Toplam Hacim ..... 50 ml

Fenol (Sıvı): Equilibrated buffer ilave edildikten sonra, manyetik karıştırıcıda 4 saat bekletilmiş ve fenolik faz ayrıştırılmıştır. DNA ekstraksiyon çalışmalarında dip kısımda bulunan bu fenolik faz kullanılmıştır.

Uyarı: Fenol ve Kloroform değme ve solunum yoluyla etkili tehlikeli kimyasallardır. Çalışma mutlaka çeker ocakta yürütülmeli ve kullanım sırasında eldiven ve maske giyilmelidir.

RNase (10 mg/ml)

10 mg RNaz 10 mM Tris HCl ve 15 mM NaCl solüsyonunda çözülmüştür. Daha sonra su banyosunda 100 °C'de 15 dak bekletilerek DNaz aktivitesinin kaybolması sağlanmıştır. Stok solüsyon porsiyonlanarak -20 °C'de saklanmıştır.

PEG solüsyonu

PEG (% 50) ..... 8 ml

NaCl (5 M) ..... 10 ml

dH_2O..... 2 ml

Toplam Hacim ..... 20 ml

TE Buffer (Tris-EDTA)

0.12 gr (pH 8.0) ..... Tris (10 mM)

0.037 gr (pH 8.0)..... EDTA (1 mM)

Toplam Hacim ..... 100 ml

Uyarı: DNA ekstraksiyon ve PCR çalışmaları mümkün olduğu kadar steril koşullarda ve buz üzerinde hazırlanmalı ve mutlaka eldiven giyilmelidir.

EK 3. PCR ve Agaroz Jel Elektroforez Çalışmalarında Kullanılan Kimyasallar ve Solüsyonlar

Primer Sulandırma: Molbiol marka primerler ürün bilgileri (Product Description)'nden 100 µM (100 pmol) oranı esas alınarak sulandırılmıştır. Primerlerin 100 pmol'lük stok konsantrasyonlarından 10 pmol'lük çalışma stokları hazırlanmıştır.

DNA Derişim Hesabı: DNA derişim hesabında kullanılan formül aşağıda verilmiştir (Sambrook ve ark., 1989; Kayrın ve ark., 2003).

DNA Derişimi (µg/ml) = OD_{260} X Seyreltme Faktörü X 50*

µg/ml = OD_{260} X 100 X 50

*1 cm ışık yollu küvette 1 OD'ye karşılık gelen µg/ml biriminden DNA miktarı

Saf DNA için; 260 nm/280 nm = 1.8

DNA'ların 260 nm absorbans değerleri üzerinden 100 ng/µl (0.1 µg/µl) çalışma stokları hazırlanmıştır.

Amplifikasyonda reaksiyon bileşenleri

DNA (100 ng/µl)..... 1 µl
Master Mix (2X) ..... 12.5 µl
Primer (10 pmol)..... 1.5 µl
Su ..... 10 µl
Toplam Hacim ..... 25 µl

10X TBE (Tris-Borik Asit-EDTA) Buffer (pH 8.0)

10.8 gr ..... Tris Baz ..... 0.9 M
5.5 gr ..... Borik Asit ..... 0.9 M
0.74 gr ..... Na_2EDTA ..... 0.02 M

Agaroz Jel (% 2) Tankının Hazırlanması

Jel tankının hacmi belirlenerek, 2 gr Agaroz tartılmış ve 100 ml 1X TBE içerisinde 3-5 sn kaynatılmıştır. Jel, 45-50 °C'ye kadar soğutulmuş ve jel tankına dökülerek yaklaşık 30 dak donması sağlanmıştır. Katılaşan jel elektroforez tankına alınmış ve üzerini kapatacak şekilde 1X TBE buffer (Running Buffer) dökülmüştür. Kuyucuk oluşturmak için yerleştirilen tarak dikkatli bir şekilde çıkartılarak, jel DNA örneklerinin yüklenmesine ve elektroforeze hazır hale getirilmiştir.

DNA Örnekleri (PCR Ürünü)'nin Yüklenmesi

Marker (1 kb)	4 µl Marker + 2 µl Loading Buffer (Loading Dye)
DNA Örneği	10 µl PCR Ürünü + 4 µl Loading Buffer

Loading Buffer: DNA örneklerinin yüklenmesi kolaylaştıran boyar maddedir.

Marker: DNA örneklerinin bant sıralarının moleküler ağırlıklarını gösterir.

Ethidium Bromid (EtBr): Jeldeki DNA bantlarının boyanabilmesi için, EtBr'in 10 mg/ml olacak şekilde stok solüsyonu hazırlanmıştır

Ethidium Bromid: EtBr, ışığa duyarlı bir kimyasal olduğu için renkli cam şişede stok solüsyonları hazırlanmıştır. Fluaresan bir madde olarak DNA ve RNA bazlarına kuvvetlice bağlanmakta UV ışık altında parlak görüntü vermektedir.

Uyarı: EtBr son derece mutajen bir maddedir. Tartım ve kullanım sırasında mutlaka eldiven ve maske giyilmelidir ve laboratuvarda çevreyi kontamine etmeden dikkatli bir şekilde çalışılmalıdır.

EK 4. *Fusarium oxysporum* f. sp. *melongenae* (Fom) izolatlarının farklı sıcaklıklarda koloni gelişimleri

İzolat No	Koloni çapı (cm)				
	Sıcaklık (°C)	3. Gün	6. Gün	9.Gün	12. Gün
Fom 6	20	2.3	4.6	6.7	7.3
	25	2.2	4.6	5.4	7.9
	30	1.6	3.7	4.9	6.2
Fom 7-1	20	2.5	4.3	6.2	7.2
	25	2.9	5.1	6.3	7.6
	30	1.6	3.6	5.3	6.7
Fom 9	20	1.7	3.9	6.2	7.4
	25	2.1	4.2	5.5	7.3
	30	1.7	3.1	4.1	6.1

EK 4'ün devamı

Fom 10	20	3.1	6.1	7.0	7.8
	25	3.1	5.4	7.2	7.9
	30	3.3	6.6	8.1	8.0
Fom 13	20	2.4	4.2	6.4	7.1
	25	2.5	4.2	6.0	7.6
	30	1.5	2.2	3.8	5.0
Fom 16	20	2.1	4.5	6.4	7.4
	25	2.7	5.2	7.1	7.8
	30	2.2	4.4	5.2	7.3
Fom 18	20	2.2	4.1	6.2	7.6
	25	2.4	4.9	6.6	7.9
	30	2.0	5.0	6.4	7.5
Fom 20	20	2.1	4.6	6.5	7.4
	25	3.0	4.8	6.0	7.6
	30	2.4	4.9	6.4	7.5
Fom 22	20	2.4	3.7	5.6	7.0
	25	2.9	5.0	6.3	7.4
	30	2.2	4.0	5.0	6.9
Fom 24	20	2.5	5.3	7.3	8.3
	25	3.3	5.2	6.7	7.6
	30	3.0	3.2	6.5	7.3
Fom 26	20	2.2	4.3	6.9	7.9
	25	2.5	4.7	6.8	7.7
	30	1.8	3.9	4.9	7.0
Fom 27	20	2.5	4.6	7.2	8.1
	25	2.4	4.2	6.1	6.7
	30	2.2	4.8	5.5	7.2
Fom 28	20	2.8	4.3	7.0	8.1
	25	2.7	2.1	6.9	8.0
	30	1.7	4.5	6.0	7.8
Fom 30	20	2.1	3.9	6.5	8.1
	25	2.2	4.9	6.8	7.3
	30	2.0	4.9	6.8	7.5
Fom 32	20	2.0	4.5	6.8	8.0
	25	2.2	4.7	6.4	7.9
	30	2.2	4.4	5.7	7.0
Fom 34	20	2.3	4.4	7.1	7.9
	25	2.1	4.8	6.5	7.3
	30	2.0	4.6	6.5	6.6
Fom 36	20	2.0	5.2	7.3	7.6
	25	2.1	4.9	6.4	7.9
	30	1.9	4.3	5.1	6.5
Fom 43	20	2.7	4.8	7.4	8.1
	25	2.3	4.3	5.7	6.3
	30	1.6	3.3	4.6	6.2
Fom 45	20	2.4	5.4	7.2	7.2
	25	3.0	5.2	6.2	7.1
	30	3.3	6.2	7.2	8.6
Fom 47	20	3.0	5.4	7.3	8.4
	25	2.4	5.0	6.7	7.9
	30	2.0	3.5	4.9	6.6
Fom 50	20	2.9	4.2	7.0	8.1
	25	2.7	5.0	6.1	7.5
	30	2.1	4.1	5.4	7.0

EK 5. Fom izolatlarının PDA ortamında belirlenen morfolojik özellikleri

İzolat No	Koloni Rengi	Koloni Çapı (mm)	Mikrokonidi (μm)	Makrokonidi (μm)
Fom 6	Beyaz, mor	85.00	8.0-10.0 x 11.0-13.0	28-30 x 32-44
Fom 7.1	Beyaz, mor	83.00	7.0-8.5 x 9.5-10.0	30-35 x 40-45
Fom 9	Beyaz, mor	70.00	6.0-7.5 x 8.5-10.0	30-31 x 38-40
Fom 10	Beyaz, mor	90.00	8.0-10.0 x 14.4-16.0	28-30 x 32-24
Fom 13	Beyaz	71.00	8.0-8.8 x 10.5-12.0	30-31 x 42-44
Fom 16	Beyaz, mor	73.00	6.0-6.8 x 7.6-8.5	26-32 x 42-48
Fom 18	Beyaz, mor	75.00	6.0-6.8 x 10-13.2	27-30 x 41-45
Fom 20	Beyaz, mor	76.00	7.0-10.0 x 12.5-14.0	28-30 x 42-46
Fom 22	Beyaz, soluk pembe	73.00	5.0-6.4 x 7.2-8.8	24-26 x 40-45
Fom 24	Beyaz, pembe	84.00	8.0-9.2 x 10.0-12.8	26-28 x 42-47
Fom 26	Beyaz	82.00	6.5-8.0 x 11.0-13.6	29-34 x 36-38
Fom 28	Beyaz	75.00	6.5-8.0 x 10.0-10.8	23-32 x 44-48
Fom 30	Beyaz, mor	80.00	4.0-8.0 x 12.0-14.0	29-32 x 42-45
Fom 32	Beyaz, pembe	90.00	6.0-8.1 x 10.0-12.0	30-33 x 38-43
Fom 34	Beyaz, mor	75.00	6.0-7.2 x 10.0-12.0	22-24 x 36-38
Fom 36	Beyaz, pembe	71.00	6.0-8.4 x 11.0-12.8	28-32 x 35-44
Fom 43	Beyaz	80.00	7.0-7.6 x 9.0-11.2	27-28 x 40-42
Fom 45	Beyaz	85.00	6.0-8.5 x 12.4-14.0	34-36 x 38-46
Fom 47	Beyaz	90.00	5.6-8.0 x 10.0-12.0	30-34 x 36-38
Fom 50	Beyaz	90.00	5.0-8.8 x 10.0-12.8	28-32 x 41-49

EK 6. Fom izolatlarının CDA ortamında belirlenen morfolojik özellikleri

İzolat No	Koloni Rengi	Koloni Çapı (mm)	Mikrokonidi (μm)	Makrokonidi (μm)
Fom 6	Beyaz. soluk pembe	80.00	10-12 x 14-16	38-40 x 44-48
Fom 7.1	Beyaz. soluk pembe	85.00	10-12 x 14-16	32-35 x 38-40
Fom 9	Beyaz	70.00	12-14 x 16-18	35-40 x 44-48
Fom 10	Beyaz. mor	85.00	08-10 x 14-16	34-36 x 40-42
Fom 13	Beyaz. pembe	71.00	12-14 x 13-16	36-40 x 44 49
Fom 16	Beyaz. mor	80.00	10-12 x 14-16	35-40 x 45-48
Fom 18	Beyaz. pembe	75.00	11-12 x 13-16	30-35 x 40-48
Fom 20	Beyaz. mor	80.00	10-12 x 14-16	30-35 x 38-40
Fom 22	Beyaz. soluk pembe	85.00	10-12 x 13-14	38-40 x 44-49
Fom 24	Beyaz. mor	85.00	08-10 x 12-14	35-38 x 42-44
Fom 26	Beyaz. soluk pembe	85.00	11-12 x 13-16	36-40 x 44-45
Fom 28	Beyaz.	75.00	12-14 x 14-16	35-40 x 44-48
Fom 30	Beyaz.	75.00	13-15 x 16-18	36-40 x 40-45
Fom 32	Beyaz. pembe	75.00	12-14 x 13-16	30-35 x 40-45
Fom 34	Beyaz.	90.00	12-13 x 14-16	30-34 x 40-44
Fom 36	Beyaz. pembe	70.00	08-10 x 12-14	28-30 x 35-40
Fom 43	Beyaz.	90.00	11-13 x 16-17	32-40 x 40-45
Fom 45	Beyaz. mor	85.00	10-11 x 12-13	30-35 x 38-45
Fom 47	Beyaz. mor	90.00	12-14 x 16-17	35-40 x 45-48
Fom 50	Beyaz. soluk pembe	85.00	10-11 x 12-13	36-40 x 44-48