T.C
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİTKİ YAPRAK AKTİVATÖRÜ OLARAK MİKRONİZE $CaCO_3$ 'ÜN KABAK SARI MOZAYİK VİRÜSÜ (*ZUCCHINI YELLOW MOSAIC VIRUS, POTYVİRUS*) ÜZERİNE ETKİSİ

Gökhan Buğra ÖZCAN

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

ŞANLIURFA
2015

Prof. Dr. Mehmet Ertuğrul GÜLDÜR danışmanlığında, Gökhan Buğra ÖZCAN'ın hazırladığı "**Bitki yaprak aktivatörü olarak mikronize $CaCO_3$'ün Kabak Sarı Mozayik Virüsü (Zucchini Yellow Mosaic Virus, Potyvirus) üzerine etkisi**" konulu bu çalışma 20/02/2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalı'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

İmza

Danışman : Prof. Dr. Mehmet Ertuğrul GÜLDÜR …….……

Üye : Doç. Dr. Ertan YANIK ……..……

Üye : Yrd. Doç.Dr. Muharrem Arap KAMBEROĞLU ……..……

Bu Tezin Bitki Koruma Anabilim Dalında Yapıldığını ve Enstitümüz Kurallarına Göre Düzenlendiğini Onaylarım.

Prof. Dr. Sinan UYANIK
Enstitü Müdürü

Bu Çalışma HÜBAK Tarafından Desteklenmiştir.
Proje no: 1170

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

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖZET i
ABSTRACT ii
TEŞEKKÜR iii
ŞEKİLLER DİZİNİ iv
ÇİZELGELER DİZİNİ v
1. GİRİŞ 1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 6
3. MATERYAL ve YÖNTEM 11
3.1. Materyal 11
3.1.1. Çalışma Materyali Hakkında Bilgiler 11
3.1.2. Mekanik İnokulasyon Çalışmalarında Kullanılan Materyal 11
3.1.3. Dayanıklılığın Uyarılması Çalışmalarında Kullanılan Materyal 12
3.2. Yöntem 12
3.2.1. ZYMV İle Bulaşık Bitki Örneklerinin Temin Edilmesi ve Çoğaltılması 12
3.2.2. Mekanik İnokulasyon Yöntemi 12
3.2.3. Serolojik Çalışmalar 13
3.2.3.1. DAS-ELISA Testi 13
3.2.4. Dayanıklılığın Uyarılması Çalışmaları 14
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA 20
4.1. Araştırma Bulguları 20
4.1.1. Mekanik İnokulasyon Çalışmaları ve Temin Edilen Hazır İzolatın Çoğaltılması 20
4.1.2. ELISA Testleri 24
4.1.3. Dayanıklılığın Uyarılması Çalışmaları 24
4.1.4. Verim Ortalamalarının İstatiksel Olarak Değerlendirilmesi 25
4.2. Tartışma 26
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER 27
5.1. Sonuçlar 27
5.2. Öneriler 28
KAYNAKLAR 29
ÖZGEÇMİŞ 33
EKLER 34

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

BİTKİ YAPRAK AKTİVATÖRÜ OLARAK MİKRONİZE $CaCO_3$'ÜN KABAK SARI MOZAYİK VİRÜSÜ (*ZUCCHINI YELLOW MOSAIC VIRUS, POTYVİRUS*) ÜZERİNE ETKİSİ

Gökhan Buğra ÖZCAN

Harran Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Bitki Koruma Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mehmet Ertuğrul GÜLDÜR
Yıl: 2015, Sayfa: 36

ZYMV, kabakgil üretim alanlarında ekonomik zararlara neden olan en önemli virüslerden birisidir. Çalışma; Mikronize $CaCO_3$ bitki aktivatörünün ZYMV mücadelesinde kullanım olanaklarının araştırılması amacıyla yürütülmüştür. İlk olarak virüsle enfekteli bitkiler temin edilmiş ve bu örnekler sağlıklı bitkiler üzerine mekanik inokülasyonlar yapılarak çoğaltılmıştır. Bitki aktivatörü uygulandıktan sonra ZYMV inoküle edilen gruplardaki bitkilerde sadece ZYMV'nin inoküle edildiği ve ZYMV inokülasyonlarından sonra aktivatör uygulanan gruplardaki bitkilere göre simptom çıkış süresinin geciktiği saptanmıştır. Ayrıca ZYMV'nin olmadığı koşullarda sadece aktivatör uygulanan bitkilerin kontrol grubundaki bitkilere göre çok daha iyi geliştiği saptanmıştır.

ANAHTAR KELİMELER: ZYMV, Mikronize Kalsit, Aktivatör

ABSTRACT

MSc Thesis

EFFECT OF MICRONISE $CaCO_3$ AS A PLANT ACTIVATOR AGAINST ZUCCHINI YELLOW MOSAIC VIRUS (ZYMV, POTYVIRUS)

Gökhan Buğra ÖZCAN

Harran University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Plant Protection

Supervisor: Prof. Dr. Mehmet Ertuğrul GÜLDÜR
Year: 2015, Page: 36

Zucchini Yellow Mosaic Virus (ZYMV) is one of the most important virus causing economical losses in cucurbit production fields. The study was carried out in order to investigate, possibility using of micronize calcite as plant activators in control of ZYMV. Firstly, plants that infected virus were assured and these samples were replicationed with mechanic inoculations on the healthy plants. After plant activator is applied, it is founded that in plant activator applied groups had showed simptoms later than the plant groups that only ZYMV inoculated. Also, it was determined that plant group which is applied plant activator had showed better developing than control groups.

KEY WORDS: ZYMV, Micronize calcite , Activator

TEŞEKKÜR

Çalışmalarımın yürütülmesinde bilgi ve deneyimleri ile beni yönlendiren ve hiçbir zaman desteğini esirgemeyen değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Mehmet Ertuğrul GÜLDÜR'e, çalışmalarımın her aşamasında büyük bir özveri ile bana yardımcı ve destek olan eşim Zir. Yük. Müh. Müge ÖZCAN'a ve Araştırma Görevlisi Eray ŞİMŞEK'e teşekkür ederim.

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 3.1. Mekanik inokülasyon çalışmaları 12
Şekil 3.2. Aktivatör uygulama çalışmaları 15
Şekil 3.3. Sağlıklı kontrol grubu bitkileri 16
Şekil 3.4. İkinci grubta ZYMV infekteli bitkiler 16
Şekil 3.5. Üçüncü grup bitkileri 17
Şekil 3.6. Dördüncü grup bitkileri 18
Şekil 3.7. Beşinci grup bitkileri 19
Şekil 4.1. Kabak meyvelerinde deformasyon ve siğiller 20
Şekil 4.2. Kabak bitkisi yapraklarında deformasyon ve iplikleşme 21
Şekil 4.3. Kabak bitkisi yapraklarında deformasyon ve iplikleşme ve kabarcıklar 21
Şekil 4.4. Kabak bitkisi yaprağında kabarcıklar 22
Şekil 4.5. Kabak bitkisi yaprağında mozayik ve kabarcıklar 22
Şekil 4.6. Kabak bitkisi yaprağında iplikleşme ve deformasyon 22
Şekil 4.7. Kabak bitkisi yaprağında deformasyon ve damar açılması 23
Şekil 4.8. Kabak bitkisi yaprağında mozayik ve damar açılması 23
Şekil 4.9. MEGAMİNERAL uygulanan ve uygulanmayan kontrol grubu bitkileri gelişimi arasındaki fark 25
Şekil 4.10. Tesadüf Parselleri Deneme Desenine göre farklı verim zamanlarında gruplar için ayrı ayrı veTek Yönlü Varyans Analizi 26

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 4.1. Farklı verim zamanlarında elde edilmiş kabak verim değerleri ortalamaları 25

1. GİRİŞ

İnsan sağlığı ve beslenmesinde çok önemli bir yere sahip olan vitamin ve mineral maddeleri içeren sebzeler ülkemizde yoğun olarak üretilmektedir. Bunlar içerisinde kabakgiller (Kabak, kavun, karpuz ve hıyar) ve domates üretimi başı çekmektedir.

2014 yılı verilerine göre; Türkiye de, sebze üretimi toplam 26,563 milyon ton'dur. Ayrıca ülkemizde yaklaşık 2.778.964 dekar kabakgil (kavun, karpuz, hıyar ve kabak) üretim alanı bulunmakta ve bu alanda yaklaşık 7,774 milyon ton düzeyinde kabakgil üretilmektedir. Türkiye, Dünyada Cucurbitaceae familyasına ait sebzelerin en fazla üretildiği ülkelerden biri olma özelliğine sahiptir (TÜİK, 2014).

Bitki virüs hastalıkları, diğer bitkilerde olduğu gibi, özellikle diğer hastalık etmenlerinden farklı olarak kimyasal mücadelesi olmamaları nedeni ile kabakgil yetiştiriciliğini tehdit eden en önemli problemlerden biri olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu hastalık etmenleri bitkilerin normal gelişme düzenini bozmakta, anormal meyve oluşumuna neden olarak pazarlanabilir ürün miktarını düşürmekte veya meyve oluşumunu tamamen engelleyerek ekonomik anlamda büyük kayıplar meydana getirmektedir.

Kabakgillerde Kabak Sarı Mozayik Virüsü (Zucchini Yellow Mosaic Virus, ZYMV), Hıyar Mozayik Virüsü (Cucumber Mosaic Virus, CMV), Kabak Mozayik Virüsü (Squash Mosaic Virus, SqMV), Karpuz Mozayik Virüsü II (Watermelon Mosaic Virus II, WMV II), Papaya Ring Spot Virus (PRSV) başta olmak üzere zararlı 32 adet virüs ve virüs benzeri hastalık etmeni rapor edilmiştir (Lisa ve Lecoq, 1984 ve Purcifull ve ark., 1984).

Kabak Sarı Mozayik Virüsü (ZYMV), kabakgil yetiştiriciliğini tehdit eden ve ekonomik olarak büyük ürün kayıplarına yol açan en önemli virüslerden bir tanesidir (Lovisolo, 1980).

ZYMV, potyvirüs üyesi, kıvrımlı ipliksi partiküllere sahip ve 750 nm uzunlukta yaklaşık 9600 nükleotidli tek iplikçikli RNA içermektedir. Bu virüs hastalığı, bulaşık bitkilerde bodurluk, kloroz, deformasyon, mozayik, genç sürgünlerde iplikleşmeye ve çiçek azalmasına neden olmakta ve buna bağlı olarak da ürün kayıplarına yol açmaktadır (Blua ve Perring, 1992).

Özellikle meyve ve yapraklarda şiddetli deformasyonlara neden olan bu virüs hastalığı sonucu, bazı ülkelerde %80'leri aşan ürün kayıpları meydana gelmiş ve kabakgil üretiminde sınırlamalar olmuştur (Al-Shahwan, 1990; Stobbs ve Van Schagen, 1990).

ZYMV *Aphis gossypii* ve *Myzus persicae* olmak üzere Aphididae takımından birçok yaprak biti ile non-persistent olarak etkin bir şekilde yayılmaktadır. (Lisa ve Lecoq, 1984; Ullman, 1991). Vektörlere karşı pestisit uygulanması, arazinin malç veya U.V yansıtmalı plastik örtülerle kaplanması, transgenik bitki hatlarının kullanılması gibi yöntemler hastalığı belirli oranlarda azaltmaktadır (Summers ve ark., 1995; Clought ve Hamm, 1995).

Virüs hastalıkları ile mücadelede kültürel önlemler, kimyasal ve fiziksel savaşım, karantina ve biyoteknolojik yöntemler kullanılmıştır. Günümüzde bunlara alternatif olabilecek kontrol yöntemleri üzerinde çalışmalar yoğunlaşmıştır. Özellikle bitkinin savunma mekanizmasının uyarılması esasına dayanan Sistemik Kazandırılmış Dayanıklılık (SAR; Systemic Acquired Resistance) yöntemi viral etmenler içinde ön plana çıkmaya başlamıştır. Doğal savunma sistemini harekete geçiren bu teşvik edicilere bitki aktivatörü denilmektedir. Aktivatörler; bitkilerin doğal savunma sistemlerini aktive eden, besin maddelerinden daha iyi yararlanmalarını sağlayan, stres koşulları ve benzeri dış etmen ve etkenlerden korunması için yardımcı olan ve/veya verimini ve ürün kalitesini olumlu yönde etkileyen doğal ve/veya kimyasal güçlendirici, direnç arttırıcı, toprak yapısını düzenleyici özellikleri olan ve bu özelliklerden birini veya birkaçını bir arada taşıyan maddelerdir. 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, 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 kullanılmaktadır. 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).

Salisilik asit birçok bitkide oluşan ve uyarılmış dayanıklılıkta sinyal görevi yapan fenolik bir bileşiktir. Bitkilerde patojenler tarafından gerçekleştirilen enfeksiyonlardan sonra SA'da artış gözlendiği bilinmektedir (Yang ve ark.,1997). TMV'ye dayanıklı tütün bitkilerinde, TMV inoküle edilmiş yapraklarda SA düzeyinin 50 kat arttığı saptanmıştır. Bu oran enfekteli olmayan yapraklarda 10 kat olmuştur (Malamy, 1990). Diğer bir çalışma da SA ya da diğer benzoik asitlerin uygulanmasından sonra tütün bitkisinde dayanıklılığın uyarıldığı ve PR-proteinlerinin arttığı saptanmıştır (White, 1979).

ABD' de yapılan bir çalışmada, tarla denemeleri ile insektisitler, Acibenzolar-S-Methyl, siyah ve UV yansıtmalı malçların, çiçek thripslerinin canlı populasyonu ve TSWV 'nin yayılma oranı üzerine etkileri belirlenmiş ve mukayese edilmiştir. Araştırmada, UV yansıtmalı malç sistemi ile thripslerin kolonizasyonu ve bunun sonucu olarak TSWV'nin ilk infeksiyonunun azaldığı ve siyah polietilen malçtan daha etkili olduğu rapor edilmiştir (Momol ve ark., 2004).

ASM uygulaması ile elde edilen SAR' ın bir sonucu olarak uygulama yapılan bitkilerde dayanıklılık mekanizması oluşmuştur. Başlangıçta elde edilen sonuçlarda SAR, ASM uygulamalı tütün bitkilerinde patojene bağlı proteinler (PR)' in seviyesini arttırmıştır. ASM ve/veya İmidaclorip uygulamasının tarla koşulları altında TSWV' nin zararını önemli ölçüde azalttığı saptanmıştır (Mandal ve ark.,2001).

Teşvik edicilerin uygulanmasıyla bitkilerde biyokimyasal savunma reaksiyonları oluşarak, lokalize hücre ölümü (HR; Hypersensitive Reaction), lignifikasyon ve papilla oluşumu, patogeneze bağlı proteinlerin (PR) sentezi ile fitoaleksinlerin sentezi ve birikimi şeklinde çeşitli savunma mekanizmaları harekete geçirilmektedir. Bunlar içerisinde, lokalize hücre ölümü (HR) sonucunda, patojenin büyümesi sınırlanmakta ve böylelikle konukçu bitki patojene karşı dayanıklı hale gelmektedir. Diğer bir ifade ile HR, patojen infeksiyonu sonucu patojenin girdiği noktadan itibaren konukçu bitki hücrelerinin hızla ölerek nekrotik bir durum alması sonucu patojenin bitki içerisinde yayılamaması olarak da ifade edilmektedir (Momol ve ark., 2004).

Bitkilerde aktivatörler kullanılarak, savunma mekanizmalarının virüslere karşı harekete geçirilmesi ve bunun pratikte uygulanabilirliği üzerine çeşitli araştırmalar yapılmış ve bitki aktivatörlerinin Tütün Mozayik Virüsü (TMV), Hıyar Mozayik Virüsü (CMV), Domates Lekeli Solgunluk Virüsü (TSWV) gibi bazı virüslerin infeksiyonu, hastalık şiddeti ve yaygınlığı üzerine etkisi ile diğer bazı kültürel uygulamalarla mukayese edilerek virüslerin mücadelesinde kullanılma olasılığı araştırılmıştır (Smith-Becker ve ark., 2003; Momol ve ark., 2004).

Megamineral (nanoteknolojik kalsit); kalsitin mekanik olarak aktifleşmesi sırasında ortaya çıkan doğal bir mineral tozu olup içeriğinde % 50 oranında CaO, % 1 oranında MgO, % 0,2 oranında Fe_2O_3 ve % 0,4 oranında SiO2 ihtiva etmektedir. pH aralığı da yaklaşık 7-10 arasındadır. Tortul ve deniz kökeni olan kalsit mekanik aktifleşme yoluyla mikro ve nano boyutlara parçalanmaktadır. Böylece parçalanan bu toz suda kolayca süspanse olmakta ve bu şekliyle bitkisel kültürlerin yapraklarına

püskürtülerek kullanılabilmektedir. Bitkilerin yaprak ve diğer dokuları üzerine püskürtülen nanoteknolojik kalsit hemen hücreyi ve hücredeki parçaların yapımını destekleyerek fizyolojik süreçleri olumlu bir şekilde etkilemektedir. Bitki dokularının yüzeyleri üzerine uygulanan Nanoteknolojik Kalsiyum Karbonat ($CaCO_3$) gözeneklerden geçerek hücreler arasında kalsiyum oksit (CaO) ve karbondioksit (CO_2) olarak çözümlenir. Buradaki karbondioksit hemen fotosentez sürecine dahil olur. Böylece güneş ışığının da etkisiyle su ve karbondioksit yardımıyla organik bileşikler oluşur. Fotosentez yoğunluğu çoğunlukla ışık ve CO_2 konsantrasyonunun yoğunluğuna bağlı olduğu için nanoteknolojik kalsit bitkilerde karbondioksiti optimum oranda sağlayarak fotosentez sürecine olumlu etkiler sağlamaktadır (www.megamineral.com.tr, 2014).

Nanoteknolojik kalsitin özellikle bitkilerdeki gözeneklerin açılma ve kapanma süreci üzerine de dokulardaki karbondioksit konsatrasyonundaki artışa bağlı olarak olumlu etkilerinin olduğu bilinmektedir. Dolayısıyla bitkilerde kurak dönemlerde ve nemin çok az olduğu dönemlerde hücrelerdeki suyun ekonomik kullanılmasını da sağlamaktadır (www.megamineral.com.tr, 2014).

Megamineral kullanılan bitkilerde ürünlerde polifenol sayısında da artış sağladığı bilinmekte bu da ürünlerin görünümü, aroması ve kokusuyla birlikte dayanıklılığını da önemli ölçüde arttırmaktadır (www.megamineral.com.tr, 2014).

Çalışmada, özetle bitkilerde hastalıklara karşı dayanıklılığı ve bitkinin gelişmesini teşvik eden aktivatörlerden, nanoteknolojik kalsit ($CaCO_3$)'in, kabak bitkisi üzerinde ZYMV infeksiyonu, simptom çıkışı ve hastalık oranı üzerine etkisi araştırılmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

ZYMV, ilk olarak 1981 yılında İtalya'da saptanmış (Lisa ve ark., 1981) ve daha sonra dünyanın kabakgil yetiştirilen birçok ülkesinden rapor edilmiştir (Nameth ve ark., 1983; Lesemann ve ark., 1984; Lisa ve Lecoq, 1984; Davis, 1986; Dolores ve Valdez, 1988). Ülkemizde ise, ilk olarak 1984 yılında Davis ve Yılmaz tarafından saptanmış ve daha sonra kabakgillerde ekonomik olarak önemli kayıplara neden olan en yaygın virüslerden biri durumuna geldiği bildirilmiştir. (Yılmaz ve ark. 1992; Yılmaz ve ark, 1994).

Adana ve İçel illeri ile çevresinde örtü altı ve açık alanlarda yetiştirilen kabakgillerden elde edilen ZYMV izolatının (ZYMV-FM) biyolojik, serolojik ve moleküler yöntemler ile saptanması, tanılanması ve bu izolat kullanılarak bitki aktivatörlerinin ZYMV mücadelesinde kullanım olanaklarının araştırılması amacıyla yürütülen çalışma da toplanan ZYMV izolatlarından bir tanesinin karakterizasyonu yapılarak ZYMV-FM olarak kodlanmış ve ACTİGARD, MASSENGER ve ISR-2000 bitki aktivatörleri ile yapılan dayanıklığın uyarılması çalışmalarında (saksı ve arazi) kullanılmıştır. Çalışma sonucunda, ACTİGARD uygulandıktan 48 saat, MASSENGER ve ISR-2000 uygulandıktan 72 saat sonra ZYMV-FM bulaştırılan bitkilerde, kontrol bitkilere göre simptom çıkış süresinde gecikme olduğu saptanmıştır (Çalışkan ve Kamberoğlu, 2010).

ZYMV, diğer potyvirüslerde olduğu gibi yaprak bitleri ile non-persistent olarak taşınmaktadır (Lisa ve ark., 1981; Lecoq ve ark., 1991). *M. persicae* ve *Aphis gossypii* ZYMV'nin en önemli vektörleri olarak bildirilmiştir (Lisa ve Lecoq, 1984; Purcifull ve ark., 1984; Castle ve ark., 1992). Bunlardan başka ZYMV'nin *Macrosiphum euphorbiae, Aphis citricola, Aphis craccivora, Aphis spiraecola* ve *Acyrthosiphon pissum* vektörleriyle de değişik oranlarda taşındığı tespit edilmiştir (Adlertz, 1987).

Summers ve ark. (1995) ve Clough ve Hamm (1995) ZYMV ile mücadele etmek için, vektörlere karşı kimyasal mücadele, arazinin malç veya plastik örtülerle

kaplanması şeklindeki uygulamaların ve transgenik bitki hatları kullanılmasının infeksiyonu belirli oranlarda azaltabildiğini bildirmişlerdir.

Yapılan survey çalışmalarında ELISA testi ile testlenen 75 örneğin 58 tanesinde ZYMV infeksiyonu saptanmıştır (Yılmaz ve ark., 1992; Yılmaz ve ark., 1994). Daha sonra, Fransa' da bu virüsün zayıf bir izolatı bulunmuş (Lecoq ve ark., 1991) ve ülkemizde de ZYMV ile mücadele amacıyla cross protection çalışmalarında kullanılmıştır (Yılmaz ve ark.,1994).

2003 yılında Pakistan' da kavun yetiştirilen alanlarda ZYMV infeksiyonları sonucu; bitkilerde sararma, yaprak kıvırcıklığı ve deformasyon, damar açılması ve kontrol dışı gelişmeler gözlenmiş, % 100'lere varan ürün kayıplarına neden olmuştur. 2004 yılında benzer simptomlar ve kayıplar ortaya çıkmıştır. Etmenin saptanması amacıyla, birkaç bölgeden infekteli bitki örnekleri toplanmış ve CMV ve ZYMV'ye karşı DAS-ELISA yöntemi ile testlenmiştir. Örneklerin toplandığı bölgelerde kavun tarlalarına yakın yerlerde yetiştirilen domateslerde düşük oranda CMV saptanmış, fakat kavunda rastlanmamıştır. ZYMV, kavun bitkilerinden indikatör bitkiler üzerine (kavun, hıyar ve *Nicotiana benthamiana*) mekanik inokulasyon yöntemi ile taşınmış ve aşılama yapılan kavun fidelerinin genç yapraklarında ZYMV' nin tipik simptomları meydana gelmiştir. Yaygın kabakgil potyvirüslerinden Watermelon Mosaic Virus (WMV)' ün konukçusu olan *Nicotiana benthamiana*' da herhangi bir infeksiyona rastlanmamıştır. Bu kavunda hastalığa sebep olan virüsün ZYMV olduğunu doğrulamıştır. ZYMV, Pakistan' da kuzeybatı bölgesinde toplanan örnekler üzerinde % 15 oranında saptanmış ve daha önce rapor edilmesine rağmen bu çalışmada infekteli kavun bitkileri rapor edilmemiştir (Malik ve ark., 2006).

Zucchini Yellow Mosaic, *Potyvirus* (ZYMV) ilk olarak 1973 yılında İtalya' da saptanmış ve 1981 yılında da tanımlanmıştır. Son on yıl içerisinde tüm kıtalarda teşhis edilmiş ve kabakgil yetiştiriciliğinde ekonomik anlamda en önemli virüslerden biri olmuştur. ZYMV, hem yaprak bitleriyle non-persistent olarak, hem de yazlık kabaklarda tohum ile taşınabilmekte ve geniş alanlara çok hızlı bir şekilde

yayılabilmektedir. ZYMV izolatlarının biyolojik değişkenliği ile ilgili olarak; konukçu çeşitliliği, simptomatolojik ve yaprak bitiyle taşınabilirliği göz önüne alınmıştır. En son yapılan çalışmalarda moleküler ve serolojik özellikleri göz önüne serilmeye çalışılmıştır. Çapraz korunma yöntemi ile zayıf ırkının ZYMV' nin şiddetli ırkına karşı etkili olduğu gözlenmiştir. Dayanıklı genler uygulanarak iyi agronomikal karakteristikler ile yetiştiriciliklere yenilik getirebilecek kabakgil germplasmaları elde edilmiştir (Desbiez ve ark., 1997).

Yardımcı ve ark., (2004) kabakgil üretim alanlarında, ZYMV simptomlarını gösteren yaprak ve meyve örnekleri toplamışlar ve mekanik inokulasyon yöntemi ile test bitkilerine aşılamışlardır. Bu bitkilerden double-stranded RNA (dsRNA)' lar CF-11 selüloz kromotografi yöntemi ile saflaştırılmıştır. Aynı araştırıcılar, ZYMV'nin hastalık oranını, Isparta' da gezdikleri 20 kabakgil tarlasında hastalık simptomu gösteren bitkiler üzerinden hesaplamışlar ve kabakgil tarlalarında % 62.70 oranında, ZYMV infeksiyonu saptamışlardır.

Nanoteknolojik kalsit günümüzde birçok ülkede etkin bir şekilde kullanılmıştır ve kullanılmaya devam edilmektedir. Örneğin Fransa ve Türkiye de Tahıllarda (buğday, arpa) yapılan uygulamalarda artan fotosentez sonucu olarak %20-25 verim artışı ve hasatta 10 gün erkencilik; Hırvatistan, Fransa ve Türkiye de şeker pancarında yapılan uygulamalarda şeker oranında %1,5-3, verimde %25'lere varan artış, kabaklarda yapılan uygulamalarda da verimde %30-50 artış olduğu tespit edilmiştir (www.megamineral.com.tr, 2014).

Türkiyede Toprak ve Su kaynakları Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü arazilerinde şeker pancarları üzerinde 2011 yılında yapılan denemelerde şeker pancarı ekimi yapılan 40 da araziden 2 da Nanoteknolojik kalsit uygulaması için ayrılmış ve oluşturulan bu parsellere aynı oranda ve zamanda su ve kimyasal gübre verilmiştir. Uygulama yapılan parselde 15 gün arayla 4 sefer sabahın erken saatlerinde ve mümkün olduğunca yaprak altlarına gelecek şekilde Nanoteknolojik kalsit uygulaması yapılmıştır. Uygulamalar sonrasında Nanoteknolojik kalsit uygulanan parseldeki bitkilerin daha sağlıklı ve iyi gelişmiş oldukları

gözlemlenmiştir. Alınan sonuçlara göre Nanoteknolojik kalsit uygulanmayan alanda dekardan 9.027kg ürün hasat edilmişken, uygulama yapılan parselde dekardan 12.720kg ürün hasat edilmiştir. Ayrıca Nanoteknolojik kalsit uygulanan ve uygulanmayan parsellerden alınan şeker pancarı örneklerinde kuru madde ve şeker oranı da karşılaştırılmıştır. Uygulama yapılmayan alandan alınan şeker pancarlarında kuru madde oranı %13 iken, uygulamanın yapıldığı alandakilerde %15,5 kuru madde oranı bulunmuştur. Şeker oranlarına bakıldığında ise uygulama yapılan parselde %13,46, yapılmayan parselde ise şeker oranı %13,48 olarak bulunmuş ve şeker oranı bakımından pek de fark olmadığı sonucu elde edilmiştir (www.megamineral.com.tr, 2014).

Bitkilerde dayanıklığı teşvik edici maddelerden biri olan Acibenzolar-S-methyl (ASM) uygulamasının Hıyar Mozaik Virüs (CMV)'üne karşı etkinliğinin ortaya konulması amacıyla tütün bitkileri (Nicotiana tabacum ''Samsun'' ve Nicotiana rustica) üzerine saksı denemeleri yürütülmüş, SAR mekanizmasının tetiklendiği optimum zaman aralığını saptamak için ASM uygulanan (0,2 mg/ml) tütün bitkilerine bu uygulamadan 24,48,72 ve 96 saat sonra CMV inoküle edilmiş ve SAR mekanizması, ASM uygulamasından 48 saat sonra inoküle edilen tütün bitkilerinde ortaya çıkmıştır. Uygulama yapılan bu bitkilerde, kontrol bitkilerine kıyasla sadece simptom çıkış zamanında gecikme gözlenmiş, infeksiyon şiddeti ve simptom tipinde herhangi bir farklılık olmamıştır. ASM uygulanan tütün bitkilerinde teşvik edilmiş dayanıklılıktan dolayı meydana gelen lignin sentezi ile H2O2 birikiminin varlığı histokimyasal boyamalar ile de saptanmıştır (Çalışkan ve Kamberoğlu, 2009).

Harran üniversitesinde Özalp ve Yanık (2013) tarafından pamukta yapraktan uygulanan bitki aktivatörünün pamuk bitkisinde Thrips spp. ve Tetranychus spp. Populasyonlarına ve kütlü pamuk verimi üzerine olan etkisini belirlemek amacıyla yürütülen çalışmada sonuç olarak yaprak gübresi olan bitki aktivatörünün Thrips spp. ve Tetranychus spp. populasyon yoğunluğuna istatiksel olarak etkisinin olmadığı fakat bitki aktivatörünün uygulandığı parselde kütlü pamuk verimi yönünden istatistiki olarak önemli derecede verim artışının (%59,9) olduğu tespit edilmiştir.

Nanoteknolojik kalsit bitkiye atılır atılmaz, bitki üzerindeki reseptörler, bir patojen veya stres varlığındaki gibi sinyal gönderirler ve istilacı organizmanın veya stres faktörlerinin etkilerini en aza indirerek savunma sistemini aktif hale getirir. Kalsit aynı zamanda savunma sinyallerinin iletiminde de önemli bir rol oynar. Bitki, kimyasal bazen de fiziksel savunma sistemlerini oluşturmaya başlar. Böylece bitki daha sonraki muhtemel bir patojen ve stres faktörüne karşı en üst düzeyde alarmda kalarak kendini en iyi biçimde savunabilir. Kalsit uygulandığında hücrede 1nmol/l düzeyinde bulunan sitoplazmik kalsiyum oranı 1mol/l düzeyine ulaşır. Böylece hücrenin dış yüzeyindeki negatif yük ile iç yüzeyindeki pozitif yük arasındaki fark nedeniyle Ca gibi iyonlar hücre içine akarak hücre içerisindeki aliminyum, bakır, çinko ve sodyum toksititesini en aza indirger (Nayyar, 2003).

Chaowen ve ark. (2001)' nın Çin'de sarımsak ekimi yapılan alanlarda virüsleri kontrol altına almak amacıyla yaptıkları çalışmada, üç farklı gübreleme protokolü ve bitki aktivatörü olan Harpin-EA uygulamışlar ve yapılan denemeler sonucunda; elde edilen veriler, gübreleme yada Harpin-EA uygulamasının sarımsak virüsleri üzerine etkisiz olduğunu göstermiş ve uygulamadaki bu başarısızlığın iklim ve uygulama dozlarından dolayı meydana geldiği bildirilmiştir.

Marais ve ark. (1985), tarafından Kaliforniya' da bahçe denemelerinde yapılan Crop-Set uygulamasında Mineola tangelo ağaçlarında meyve boyutlarında ve meyve veriminde %18'lik artış gözlendiğini bildirmişlerdir. Yaprak analizleri sonucu, Crop-Set uygulanan ağaçlarda uygulanmayan kontrol grubundakilere göre nitrojen, fosfor, potasyum, magnezyum, bakır ve bor miktarının daha yüksek olduğunu saptanmıştır. Bu bulgular, bitki ekstratı içeren Crop-Set' in toprakta besin maddelerinin mineralizasyonu arttırdığını gösteren araştırmaları desteklemektedir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Çalışma Materyali Hakkında Bilgiler

Bu tez çalışmasının farklı aşamalarında kullanılan ZYMV izolatı hazır olarak Adana Biyolojik Mücadele Araştırma İstasyonundan temin edilmiştir. Çalışma, Mersin ili Anamur ilçesinde belirlenen arazide yürütülmüştür.

3.1.2. Mekanik İnokulasyon Çalışmalarında Kullanılan Materyal

Mekanik inokulasyon çalışmalarında, araştırma istasyonundan hazır olarak temin edilen ve ZYMV ile bulaşık olduğu bilinen kabakgil bitkilerinden alınan bitki dokuları materyal olarak kullanılmıştır.

Arazi çalışmalarında ilgili kabak bitkileri üzerine ZYMV'nin bulaştırılması amacıyla mekanik inokulasyonlar yapılmıştır.

Çalışmada kullanılan bitkilerin üzerine yapılan mekanik inokulasyon çalışmalarında, havan ve havaneli, cam spatül, fosfat tampon çözeltisi, mercaptoethanol, karborandum tozu ve çeşme suyu kullanılmıştır.

Mekanik inokulasyon çalışmalarında kullanılan kabak bitkilerinin de tohumlarının ekilmesi ve fidelerin yetiştirilmesi için kum, toprak ve torf karışımı (1:1:1), plastik küvetler, plastik viyoller, mikro ve makro besin elementleri içeren gübreler ve zaman zaman herhangi bir zararlı ve hastalık etmenine karşı insektisit ve fungisitler kullanılmıştır.

3.1.3. Dayanıklılığın Uyarılması Çalışmalarında Kullanılan Materyal

Dayanıklılığın uyarılması çalışmalarında, Nanoteknolojik kalsit bitki aktivatörü materyal olarak kullanılmıştır. Nanoteknolojik Kalsit Megamineral firmasından temin edilmiştir.

3.2. Yöntem

3.2.1. ZYMV İle Bulaşık Bitki Örneklerinin Temin Edilmesi ve Çoğaltılması

Çalışmada kullanılan ZYMV-FM izolatı kabak bitkisiyle bulaşık halde hazır olarak Adana Biyolojik Mücadele Araştırma İstasyonundan temin edilmiştir. Bulaşık kabak bitkileri torbalarda buz kutuları içerisinde uygun koşullarda donmuş olarak alınarak daha sonra çalışmalar için inokülasyonlarda kullanılmak üzere önceden yetiştirilen kabak bitkilerine mekanik inokülasyon yoluyla infekte edilmiş ve çoğaltılmıştır.

3.2.2. Mekanik İnokulasyon Yöntemi

Arazi çalışmalarında kullanılacak kabak bitkilerine ZYMV-FM' nin bulaştırılması, Mandal ve ark. (2001)'e göre aşağıdaki şekilde yapılmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Mekanik inokülasyon çalışmaları

ZYMV-FM ile bulaşık bitkilerden alınan bitki dokuları, 1: 5 oranında 2-Mercaptoethanol ve/veya %1' lik sodyum sülfit içeren 0.02 M Fosfat tampon çözeltisi (pH; 7.0) içeren steril porselen havanda ezilmiş ve bitki özsuyu daha önceden karborandum tozu serpilmiş test bitkilerinin yapraklarına bulaşık süngerinin sert kısmı kullanılarak mekanik olarak inokule edilmiştir. Birkaç dakika beklendikten sonra inokule edilen yapraklar çeşme suyu ile yıkanmıştır.

İnokule edilen bitkiler ZYMV simptomları bakımından periyodik aralıklarla kontrol edilmiştir.

3.2.3. Serolojik Çalışmalar

Serolojik çalışmalardatüm arazi denemelerinde kullanılan tüm gruplardaki bitkiler Double Antibody Sandwich (DAS) ELISA yöntemi ile ZYMV, CMV, SqMV, PRSV ve WMV' e karşı testlenmiştir.

3.2.3.1. DAS-ELISA Testi

DAS-ELISA çalışmaları, Clark ve Adams (1977) tarafından bildirilen yönteme göre yapılmıştır. Çalışmada kullanılan sulandırma oranları ELISA kitlerinin temin edildiği firma kitine göre yapılmış ve uygulanmıştır.

1. Testlenen virüse spesifik γ-globulin, kaplama tamponu içerisinde belirli oranda sulandırılarak, ELISA pleytlerine her çukura 100 µl konulmuştur.

2. Pleytler, 30 °C'de 4 saat inkübasyona tabi tutulduktan sonra, yıkama tamponu ile her yıkama 3'er dakika olacak şekilde 3 kere yıkanmıştır.

3. Ekstraksiyon tampon çözeltisinde 1/10 oranında hazırlanmış olan bitki ekstraktından her kuyuya 100'er µl konulmuş ve pleytler +4 °C'de bir gece inkübasyona bırakıldıktan sonra yıkama tamponu ile yukarıdaki şekilde yıkanmıştır.

4. Konjugat tamponu çözeltisi içerisinde sulandırılmış olan enzimle işaretli γ-globulinden (Konjugate) her kuyuya 100'er µl konulmuş ve 30°C' de 5 saat inkübasyondan sonra pleytler yıkama tamponu ile yukarıdaki şekilde tekrar yıkanmıştır.

5. Son olarak pleytlerin herbir kuyusuna substrate tampon çözeltisinde 1mg/ml olacak şekilde hazırlanan substrattan 100'er µl ilave edilmiş ve pleytler 30-60 dakika oda sıcaklığında ışıksız ortamda bekletildikten sonra ELISA okuyucuda okunmuştur.

Yapılan ELISA testlerinde herbir örnek için ikişer kuyu kullanılmış ve her bir ELISA pleytinde birer adet pozitif (infekteli), negatif (sağlıklı) ve buffer kontrol bulunmasına dikkat edilmiştir. ELISA testleri sonunda, ELISA kuyucusunda negatif kontrol için 405 nm'de okunan absorbans değerinin en az iki katı ve daha fazla absorbans değeri veren örnekler pozitif olarak kabul edilmiştir (Barba ve Riccioni, 1993; Helguera ve ark., 2002).

ELISA testlerinde kullanılan tampon çözeltiler ve bunların hazırlanması Ek 1'de verilmiştir.

3.2.4. Dayanıklılığın Uyarılması Çalışmaları

Bitki aktivatörü kullanılarak kabak bitkilerinin uyarılması ve bunun ZYMV' ye karşı mücadelede kullanılma olasılığının ortaya konulması amacıyla yapılan dayanıklılığın uyarılması çalışmalarında kabak bitkileri kullanılmış ve Aktivatör uygulanacak gruplardaki bitkiler üzerine 2-4 yapraklı döneme geldikleri zaman bitki nanoteknolojik kalsit ile uygulamalar yapılmıştır.

Kullanılan bitki aktivatörünün etkinliği ZYMV-FM ile bulaşık olan veya olmayan bitki sayısı ile simptom çıkış süreleri dikkate alınarak saptanmıştır.

Arazi denemesi süresince klasik yetiştiricilik işlemleri uygulanmıştır. Sulamalar salma sulama ve damlama sistemiyle gerçekleştirilmiş ve bitkiler

şaşırtıldıktan bir ay sonra sulamadan hemen önce üre uygulanmıştır. Şaşırtmadan on beş gün sonra topraktaki kaymak tabakasını kırmak amacıyla çapalama işlemi gerçekleştirilmiştir. Deneme kurulan arazinin tamamı homojen olduğundan çalışmalar Tesadüf Parselleri Deneme Desenine göre yürütülmüştür. Deneme 5 tekerrürlü ve her tekerrür de 5' er bitki olacak şekilde kurulmuştur. Sonuçların değerlendirilmesi Minitab 16 Programında Tek Yönlü Varyans Analizine göre yapılmıştır.

Nanoteknolojik kalsit 3g/lt dozunda denemedeki bitkilerin 2-3 yapraklı döneminde yeşil aksama püskürtme şeklinde uygulanmıştır (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Aktivatör uygulama çalışmaları

Bu denemede oluşturulan gruplar;

1-) Birinci grupta sadece sağlıklı kabak bitkileri yetiştirilmiştir.

-Arazi denemelerinde kullanılacak, viyollere tohum olarak atılan, sağlıklı kabak fideleri 2-4 yapraklı döneme geldiklerinde, viyollerden parseldeki esas yerlerine dikilmişler ve 7-25 gün süre ile ZYMV simptomlarının varlığı, simptomların çıkış zamanı ve hastalık oranı takip edilmiştir (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Sağlıklı kontrol grubu bitkileri

2-) İkinci grupta kabak bitkileri üzerine sadece saf ZYMV inokule edilmiştir.

-Arazi denemelerinde kullanılacak kabak fidelerine viyollerde iken 2-4 kotiledon yapraklı dönemde virüs inokülasyonu yapılmış ve fideler eğme içerisine şaşırtılmıştır.

-Uygulama yapılan bitkilerde; 7- 25 gün süre ile ZYMV simptomlarının varlığı, simptomların çıkış zamanı ve hastalık oranı takip edilmiştir (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. İkinci grubta ZYMV infekteli bitkiler

3-) Üçüncü Grupta kabak bitkileri üzerine virüs inokule edildikten sonra hastalık etmenlerine karşı dayanıklılığı teşvik edici olarak Nanoteknolojik Kalsit uygulanmıştır.

-Bu gruptaki bitkiler üzerine 2-4 kotiledon yapraklı dönemde virüs inokule edildikten 3gün sonra hastalık etmenlerine karşı dayanıklılığı teşvik edici olarak Nanoteknolojik Kalsit 3gr/lt dozda uygulanmıştır. İlk uygulamadan 7 gün sonra ise kabak fidelerinin yeşil aksamına, 7'şer gün arayla 3 kez püskürtme şeklinde uygulanmıştır.

-Viyollerdeki bitkiler ilk aktivatör uygulamasından sonra esas arazideki yerlerine şaşırtılmıştır.

-Fakat daha sonra aktivatörün etkisini arttırmak amacıyla planlanan uygulamanın dışında bu gruptaki bitkiler üzerine yine sprey şeklinde 3gr/lt Nanoteknolojik Kalsit uygulaması yapılmıştır.

-Uygulama yapılan bitkilerde; 7- 25 gün süre ile ZYMV simptomlarının varlığı, simptomların çıkış zamanı ve hastalık oranı takip edilmiştir (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Üçüncü grup bitkileri

4-) Dördüncü Grupta Kabak Bitkileri üzerine bitki aktivatörü 3 gün arayla uygulanmış ve son uygulamadan sonra 72 saati takiben aynı kabak bitkileri üzerine, biyolojik ve moleküler tanısı yapılmış saf ZYMV mekanik inokulasyon yöntemi ile bulaştırılmıştır.

-Sağlıklı kabak fideleri 2-4 yapraklı döneme geldiklerinde, viyollerden parseldeki esas yerlerine dikilmişlerdir.

-Seradaki yerlerine şaşırtılan grubumuzdaki bitkiler üzerine hastalık etmenlerine karşı dayanıklılığı teşvik edici olarak düşünülen Nanoteknolojik Kalsit 3gr/lt dozda, 3 gün arayla, 3 uygulama halinde uygulanmıştır. Son uygulamadan 72 saat sonra biyolojik ve moleküler tanısı yapılmış saf ZYMV mekanik inokulasyon yöntemi ile bulaştırılmıştır. Uygulama yapılan bitkilerde; 7- 25 gün süre ile ZYMV simptomlarının varlığı, simptomların çıkış zamanı ve hastalık oranı takip edilmiştir (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. Dördüncü grup bitkileri

5-) Beşinci grupta kabak bitkileri üzerine virüs inokülasyonu yapılmadan, yine 7 gün arayla bitki aktivatörü 3 uygulama halinde uygulanmıştır.

-Bu gruptaki bitkilere de virüs inoküle edilmeden, yine 7 gün arayla bitki aktivatörü 3 uygulama halinde uygulanmıştır. Bitkiler 2-4 kotiledon yapraklı

dönemde ilk uygulamadan hemen sonra eğmedeki yerlerine şaşırtılmışlardır (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. Beşinci grup bitkileri

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. Araştırma Bulguları

4.1.1. Mekanik İnokulasyon Çalışmaları ve Temin Edilen Hazır İzolatın Çoğaltılması

Öncelikle araştırma istasyonlarından temin edilen biyolojik, serolojik ve moleküler tanısı yapılmış ZYMV-FM kodlu izolatı çalışmanın her aşamasında kullanılabilmesi için mekanik inokülasyon yoluyla çoğaltılmıştır.

Çalışmalarda farklı dönemlerde tekrarlanan mekanik inokulasyon çalışmaları sonunda kabak bitkileri yapraklarında deformasyon, mozayik, kloroz ve damar bantlaşması simptomları ile birlikte genel bir gelişme geriliğine neden olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.1., Şekil 4.2. ve Şekil 4.3.).



Şekil 4.1. Kabak meyvelerinde deformasyon ve siğiller



Şekil 4.2. Kabak bitkisi yapraklarında deformasyon ve iplikleşme



Şekil 4.3. Kabak bitkisi yapraklarında deformasyon ve iplikleşme ve kabarcıklar

Kabak bitkisinde bu simptomlar çok şiddetli ve belirgin olarak ortaya çıkmış ve ileriki aşamalarda bunlara ilaveten yapraklarda ayakkabı bağı simptomu da ortaya çıkmıştır (Şekil 4.4., Şekil 4.5., ve Şekil 4.6.).



Şekil 4.4. Kabak bitkisi yaprağında kabarcıklar



Şekil 4.5. Kabak bitkisi yaprağında mozayik ve kabarcıklar



Şekil 4.6. Kabak bitkisi yaprağında iplikleşme ve deformasyon

Mekanik inokulasyon yöntemi ile sadece ZYMV-FM bulaştırılan ve ZYMV inokülasyonundan sonra aktivatör uygulanan grublarda kabak bitkileri üzerinde simptomlar, inokulasyonun yapıldığı tarihten sonraki 15-18 gün içerisinde ortaya çıkmıştır. Ancak aktivatörün önce uygulanarak arkasından ZYMV'nin inoküle edildiği grupta ilk simptomların görülmesi inokülasyondan sonra 20 günü bulmuştur.

ZYMV bulaştırılan kabak bitkilerinin yapraklarında damar açılması ile başlayan simptomlar mozayik, sararma, şiddetli deformasyon ve ayakkabı bağı simptomları şekline dönüşerek devam etmiştir (Şekil 4.7., Şekil 4.8.).



Şekil 4.7. Kabak bitkisi yaprağında deformasyon ve damar açılması



Şekil 4.8. Kabak bitkisi yaprağında mozayik ve damar açılması

4.1.2. ELISA Testleri

Bunlardan başka, arazi denemelerinde tüm kabak kabak bitkilerinden simptom gösterenler ve göstermeyenlerden alınan bitki dokuları da ELISA yöntemi ile testlenmiş; Simptomlarında gözlendiği; sadece ZYMV inoküle edilen, ZYMV inoküle edildikten sonra aktivatörün uygulanan, aktivatör uygulandıktan sonra ZYMV inoküle edilen tüm bitkilerde ZYMV-FM'nin varlığı ortaya konulmuştur.

Simptom göstermeyen kontrol grubu ve sadece aktivatörün uygulandığı bitkilerden alınan bitki dokularınan yapılan ELISA testleri sonucunda ise herhangi bir infeksiyon varlığı saptanmamıştır. Böylece, mekanik inokulasyon çalışmalarında elde edilen tüm sonuçlar ELISA testleri ile doğrulanmıştır.

4.1.3. Dayanıklılığın Uyarılması Çalışmaları

Nanoteknolojik Kalsit'in ZYMV' ye karşı etkisinin belirlenmesi amacıyla yapılan arazi denemelerinde kontrol olarak kullanılan kabak bitkileri üzerine herhangi bir uygulama yapılmadan gelişimleri gözlenmiştir.

Buna göre; Nanoteknolojik Kalsit uygulandıktan sonra ZYMV inoküle edilen gruptaki bitkilerde sedece ZYMV inoküle edilen ve ZYMV inokülasyonundan sonra aktivatör uygulanan gruplardaki bitkilere göre simptom çıkış süresi ortalama 3-5 gün daha geç olmuştur.

Sonuç olarak; bitki aktivatörünün ZYMV inokulasyonunun öncesinde yapılan uygulamalarında ilk simptomların çıkışını belli bir süre geciktirdiği, ZYMV zararına olumlu çok bariz bir etkisinin olmadığı fakat ZYMV inokülasyonu ve Nanoteknolojik Kalsit uygulaması yapılmayan kontrol grubundaki bitkilere bakıldığında da sedece Nanoteknolojik Kalsit uygulanan bitkilerde büyüme, gelişme ve meyve kalitesi üzerine gözle görülebilir olumlu etkilerinin olduğu saptanmıştır (Şekil 4.9)



Şekil 4.9. MEGAMİNERAL uygulanan ve uygulanmayan kontrol grubu bitkileri gelişimi arasındaki fark

4.1.4. Verim Ortalamalarının İstatiksel Olarak Değerlendirilmesi

Deneme kurulan arazinin tamamı homojen olduğundan çalışmalar Tesadüf Parselleri Deneme Desenine göre yürütülmüştür.

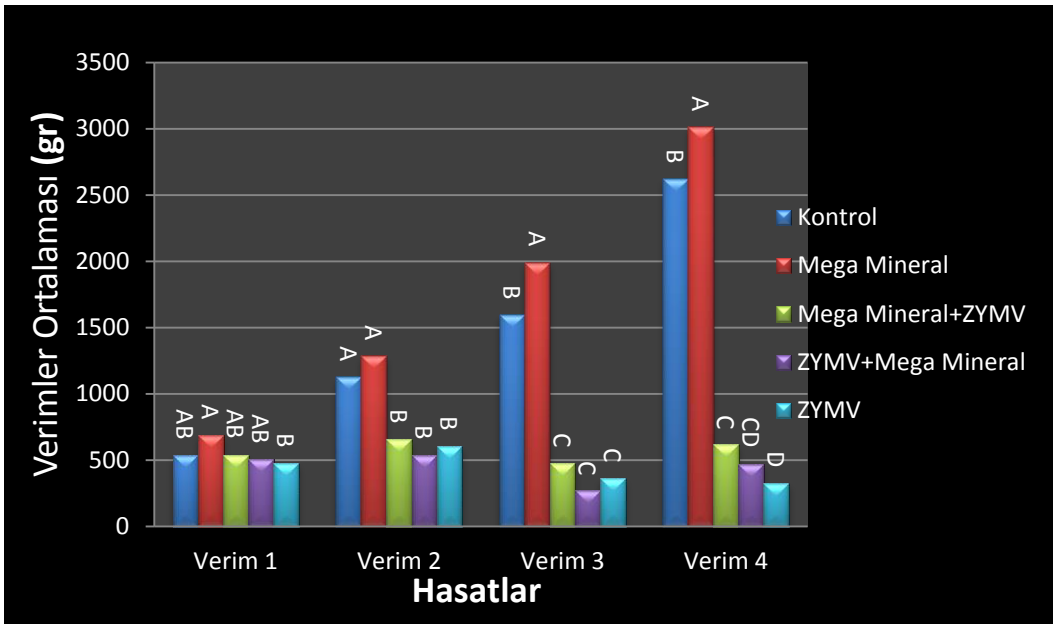
Deneme 5 tekerrürlü ve her tekerrür de 5' er bitki olacak şekilde kurulmuştur. Sonuçların değerlendirilmesi Minitab 16 Programında Tek Yönlü Varyans Analizine göre yapılmıştır.

Analiz çalışmalarında, aşağıda Çizelge 4.1.'de yer alan, grupların farklı verim zamanlarında elde edilmiş kabak verim değerleri ortalamaları kullanılmıştır.

Çizelge 4.1. Farklı verim zamanlarında elde edilmiş kabak verim değerleri ortalamaları

	Verim 1	Verim 2	Verim 3	Verim 4	Toplam Verim
Kontrol	537.6	1125.6	1594	2620	5877.2
Mega Mineral	688.6	1282.4	1988.6	3009.2	6968.8
Mega Mineral+ZYMV	539.6	657.4	479	616.2	2292.2
ZYMV+Mega Mineral	505	536.6	268.2	471.2	1781
ZYMV	474.8	604.2	361.8	322	1762.8

Her verim zamanı için ayrı ayrı olacak şekilde, gruplardaki bitkilerin ortalama verimleri analiz edildiğinde o verim zamanlarında gruplar arasında yaklaşım oranları grafiksel olarak aşağıdaki gibidir.



Şekil 4.10. Tesadüf Parselleri Deneme Desenine göre farklı verim zamanlarında gruplar için ayrı ayrı ve Tek Yönlü Varyans Analizi

4.2. Tartışma

Varyans analizi sonuçları değerlendirildiğinde çıkarılabilecek kesin sonuçlar şu şekildedir;

- ZYMV'nin olmadığı koşullarda, sadece aktivatör uygulanan gruptaki bitkilerin verim ortalamaları; 1.Verim zamanında 688,6 gr, 2.Verim zamanında 1282,4 gr, 3.Verim zamanında 1988,6 gr, 4.Verim zamanında ise 3009,2 gr olarak ölçülmüştür. Bu verim değerleri her verim zamanında, diğer gruplardaki bitkilerin ortalamaları ile kıyaslandığında bu gruptaki bitkilerin verimlerinin diğer gruplara göre çok daha yüksek olduğu saptanmıştır. Bu da aktivatörün virüsün olmadığı koşullarda bitki verimi üzerine çok olumlu etkilerinin olduğunu göstermektedir.

- Aktivatör uygulandıktan sonra ZYMV inokülasyonu yapılan gruplarda da yine tüm verim zamanları için ortalamalar değerlendirildiğinde, sadece ZYMV inokülasyonu yapılan ve ZYMV inokülasyonu sonrasında aktivatör uygulanan gruplara göre verim ortalamaları hep daha yüksek elde edilmiştir. Bu fark bitkinin özellikle 4.verim zamanında çok daha net görülmüştür.

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

Kabakgil üretimi içinde zarar veren virüs hastalıklarından en önemlilerinden biri ZYMV'dir. Uzun yıllardan beri bu virüs hastalığı ülkemizde kabakgil yetiştiriciliği açısından oldukça önemlidir ve bu önemi son yıllarda da gittikçe artmaktadır. Vektörü olan yaprak bitleri aracılığıyla etkili bir şekilde çok geniş alanlara kolayca taşınabilmesi ve tüm kabakgiller ile bazı yabancı otlar dahil olmak üzere çok geniş konukçu dizisine sahip olması bu hastalık etmeninin önemini daha da arttırmaktadır.

Kabak alanlarında, ekonomik anlamda büyük kayıplara neden olan ZYMV'ye karşı mücadele edebilmek için çeşitli kültürel önlemler alınmalıdır. Bu virüs etmeninin çıkışı ve yayılmasının (mekanik yollarla veya vektörler aracılığıyla) engellenmesine yönelik olarak alınabilecek bu önlemlerin belirlenmesi için, öncelikle hastalık etmeninin saptanması ve kesin tanısının yapılarak yaygınlık oranının ortaya konulması gerekmektedir.

Bu çalışma, bitki yaprak aktivatörü olarak mikronize $CaCO_3$'ün ZYMV üzerine etkisinin araştırılması amacıyla yapılmıştır.

ZYMV ile bulaşık ve bu virüsün karakteristik simptomlarını (yapraklarda deformasyon, mozayik ve iplikleşme, meyvelerde siğil oluşumu ve deformasyon) gösteren virüslü kabak bitkileri Araştırma İstasyonundan temin edilerek mekanik inokülasyon yoluyla 20 bitki üzerinde çoğaltılmış ve yine denemenin her aşamasında mekanik inokülasyon çalışmalarında materyal olarak kullanılmıştır.

Arazi denemelerinde; bitki aktivatörünün uygulamasından sonra yapılan ZYMV inokulasyonlarında simptom çıkış süresinin, sadece ZYMV infekte edilen ve ZYMV inokülastonundan sonra aktivatör uygulanan gruplardaki simptomlara göre 3-5 gün geciktiği saptanmıştır. Bu çalışmada; kabakgil yetiştiriciliğini sınırlayan ve

etkin mücadele yöntemi bulunmayan ZYMV'nin inoküle edilen bitkilerde saptanması ve tanılanması başarı ile uygulanmıştır. Bitki aktivatörü uygulama zamanının ZYMV simptom çıkışında süre olarak az da olsa etkisinin olduğu fakat infeksiyonlar görüldükten sonra infeksiyonun şiddeti üzerinde etkisinin çokta ümit var nitelikte olmadığı, arazi denemelerindeki kontrol grubu ve sadece bitki aktivatörü uygulanan gruptaki bitkiler incelendiğinde ise; ZYMV infeksiyonu olmayan koşullarda, aktivatörün bitki büyüme, gelişmesine ve meyve kalitesi üzerine çok olumlu etkilerinin olduğu da belirlenmiştir.

Bitkilerde aktivatörler kullanılarak dayanıklılığın uyarılması yöntemi bakteriyal, fungal ve özellikle diğer mücadele yöntemlerinin yetersiz kaldığı viral hastalıklara uygulanabilir. Bahsedilen dayanıklılık bitkide varolan mekanizmadan kaynaklandığı için insan sağlığına ve çevreye olumsuz bir etkisi yoktur.

Uyarılmış dayanıklılık bitkinin pek çok mekanizmasının değişimi ile kazanıldığı için kalıcıdır. Patojenin bu dayanıklılığı kırması söz konusu değildir.

5.2. Öneriler

ZYMV virüsüyle mücadelede bitki aktivatörü olarak nanoteknolojik kalsit bitkiler araziye şaşırtılmadan önce ve şaşırtıldıktan sonra üreticiler bilgilendirilerek, uygulanması önerilmelidir.

Nanoteknolojik kalsit ZYMV'e karşı bir dayanıklılık kazandırması ve verimde somut bir artışa neden olduğundan kabak üretim aşamalarında en az 7 günde bir uygulama yapılmalıdır.

Gelecekte yapılması planlanan çalışmalarda da bitki aktivatörünün en uygun uygulama zamanının belirlenmesi, ZYMV ve vektörlerle inoküle olabilen diğer virüsler için aktivatör uygulamasının etkinliği olup olmayacağının ortaya konulması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

ADLERTZ, W.C.,PURCIFULL, D.E., SIMONE, G.W., and HIEBERT, E., 1987. Zucchini Yellow Mosaic Virus: A Pathogen of Squash and other Cucurbits in Florida. Proc. Fla. State Hortic. Soc, 96:72-74.

AL-SHAHWAN, I.M., 1990. First Report of Zucchini Yellow Mosaic Virus in Cucurbits in The Central Region of Saudi Arabia. J. King Saud Univ., Agric. Sci, 2:251-260.

BARBA, M. and RICCIONI, L., 1993. Improvement of Diognostic Methods to Detect Plum Pox Virus in Apricot Plants. Agriculture, s.139- 141.

BLUA, M.J., and PERRING, T.M., 1992. Alatae Production and Population Increaseof Aphid Vectors on Virus-infected Host Plants.Oecologia, 92:65-70.

CASTLE, S.J., PERRING, T.M., FARRAR, C.A., and KISHABA, A.N., 1992. Field And Laboratory Transmission of Watermelon Mosaic Virus II and Zucchini Mosaic Virus by Various Aphids Species. Phytopathol, 82:235-240.

CHAOWEN, L., YUNGLIANG, P., YIBING, C., JINGJING, H., HONGLI, J., EVERAARTS, A., and KUMAR, P., 2001. Effects of Fertilization and Messenger®. Application on Garlic Yield and Diseases in Pengzhou District.Vegsys EU 5 Framework INCO2 Funded Research Project, Contact No : ICA4CT-2001-10054.

CLARK, M.F. and ADAMS, A.N., 1977. Characteristics of the Microplate Method of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Plant Viruses. Journal of General Virology, 34:475-483.

CLOUGHT, G. H., and HAMM, P.B., 1995. Coat Protein Transgenic Resistance to Watermelon Mosaic and Zucchini Yellow Mosaic Virus in Squash and Cantaloupe. Plant Dis, 79:1107-1109.

ÇALIŞKAN, A. F. ve KAMBEROĞLU, M. A., 2010. Kabak Sarı Mozaik Virüsü (Zucchını Yellow Mosaic Vırus, ZYMV)'nün Tanısı ve Bitki Aktivatörleri Kullanılarak Mücadele Olanaklarının Araştırılması, Ç.Ü Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana. 22:3.

ÇALIŞKAN, A. F. ve KAMBEROĞLU, M. A., 2009. Acibenzolar-S-Methyl (ASM) Uygulamasının Hıyar Mozayik Virüs (Cucumber mosaic virüs, CMV)'ü Üzerine Etkisi , Türkiye 3. Bitki Koruma Kongresi, 15-18 Temmuz 2009, Van., s.167.

DAVIS, R.F., 1986. Partial Characterization of Zucchini Yellow Mosaic Virus Isolated From Squash in Turkey. Plant Dis, 70: 735-738.

DESBIEZ, C., and LECOQ, H., 1997. Zucchini Yellow Mosaic Virus. Inra. Station de Pathologie Vegetale, 84143 Montfavet Cedex, France. Plant Pathology, 46:809-829.

DOLOREZ, L.M., and VALDEZ, R.B., 1988. Identification of squash viruses and screening for resistance. Philipp. Phytopathol, 24:43-52.

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

HAMMERSCHMIDT, R. 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., s.19-36.

HOLLINGS, M., and BRUNT, A.A., 1981. Potyviruses. Handbook of Plant Virus Infection: Comparative Diagnosis. Elsevier/ Nort Holland., s.731-807.

HELGUERA, P.R., DOCAMPO, D.M., NOME, S.F. and DUCASSE, D.A., 2002. Enhanced Detection of Prune Dwarf Virus in Peach Leaves by İmmunocapture- Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction with Nested Polymerase Chain Reaction (IC-RT-PCR Nested PCR). J.Phytopathology, 150: 94-96. Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin. http://www.megamineral.com.tr, (Erişim Tarihi:05.01.2015)

LECOQ, H., LEMAIRE, J.M., and WIPF-SCHEIBEL, C., 1991. Control of Zuccihini Yellow Mosaic Virus in Squash by Cross Protection. Plant Dis. 75:208-211.

LESEMANN, D.E., MAKKOUK, K.M., KOENING, R., and SAMMAN, E.N., 1984. Natural İnfection of Cucumbers by Zucchini Yellow Mosaic Virus in Lebanon. Phytopathol. Z., 108:304-313

LISA, V., and LECOQ, H., 1984. Zucchini Yellow Mosaic Virus. No:282 in: Descriptions of Plant Viruses. Commonw. Mycol. Inst./Assoc. Appl. Biol., Kew, Surrey, England., s.4.

LISA, V., BOCCARDO, G., D'AGOSTINO, G., DELAVALLE, G., and D'AQUILIO, M., 1981. Characterization of a Potyvirus That Causes Zucchini Yellow Mosaic Virus. Phytopath., 71:667-672.

LOVISOLO, O., 1980. Acta Horticulturae., 88:33-82.

MALAMY, İ.,D.F. Klessing, İ. Raskin, 1990. Salicylic acid and plant disease resistance., The Plant Journal 2:643-654.

MALIK, A.H., MANSOOR, S., IRAM, S., BRIDDON, W.R., and ZAFAR, Y., 2006. A Severe Outbreak of Melon Disease Caused by Zucchini Yellow Mosaic Virus in the Punjab Province of Pakistan. Plant Pathology., 55: 285p.

MANDAL, B., PAPPU, H.R., and CSINOS A.S., 2001. Suppressive Effect of Acibenzolar-S-Methyl(ASM) on Tomato Spotted Wilt Virus. Department of Plant Pathology, University of Georgia.

MARAIS and KOTZE., 1985. Fidanlıklarda Yaprak Bitleriyle Taşınan Virüslere Karşı Koruma Amaçlı Yapılan Hafif Türlü Virüs Aşılamaları ve Bitki Aktivatörlerinin Etkileri.

MOMOL MT., LOCKHART BEL, DANKERS H, ADKİNS S, 2004.*Canna yellow mottle virus* detected in canna in Florida. Online. *Plant Health Progress doi*:10:1094.

MURPHY, F.A.; FAUQUET, C.M.; BISHOP, D.H.L.; GHABRIAL, S.A.; JARVIS, A.W.; MARTELLI, G.P.; MAYO, M.A.; and SUMMERS, M.D., 1995. Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Archives of Virology, Supplement 10.

NAYYAR, H., 2003. Calcium as Environmental Sensor in Plants. Current Science., 84-7: 892-902.

NAMETH, S.T., DODDS, J.A., and PAULUS, A.O., 1983. A New Potyvirus Assocşated with Severe Disease of Cantaloupe (*Cucumis Melo*) in Souther California. (Abstr.) Phtytopah., 73:793.

PURCIFULL, D.E., ADLERZ, W.C., SIMONE, G.W., HIEBERT, F., and CHRISTIE S.R., 1984. Serological Relationships and Partial Charecterization on Zucchini Yellow Mosaic Isolated from Squash in Florida. Plant Dis., 98:230-233.

SMİTH-BECKER J., KEEN N.T., BECKER J.O. 2003. Acibenzolar-*S*-methyl induces resistance to *Colletotrichum lagenarium* and cucumber mosaic virus in cantaloupe. Crop Prot. 22:769–774.

STOBBS, L. W., and VAN SCHAGEN, J.G., 1990. First Report of Zucchini Yellow Mosaic Virus in Squash in Arkansan. Plant Dis., s.70-78.

SUMMERS, C.G., STAPLETON, J.J., NEWTON, A.S., DUNCAN, R. A., and HART, D., 1995. Comparison of Sprayable and Film Mulches in Delaying the Onset of Aphid-Transmitted Virus Diseases in Zucchini Squash. Plant Dis., 79:1126-1131.

TÜİK, 2014. Türkiye kabakgil ekim alanları ve üretimi istatistikleri. http://tuikapp.tuik.gov.tr/bitkiselapp/bitkisel.zul (Erişim Tarihi:15.02.2015).

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.

TÜZÜN, S. 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. s.152-168.

TÜZÜN, S 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., s.95-115

ÖZALP, F. ve YANIK,E., 2014. Şanlıurfa İlinde Pamuk Bitkisinde Thrips spp. ve Tetranychus spp.'nin Populasyon Yoğunluğuna Bitki aktivatörünün Etkisinin Belirlenmesi, Şanlıurfa., ULLMAN, E. D., CHO, J.J. and GERMAN, T.L., 1991. Occurrence and Distribution of Cucurbit Viruses in the Hawaiian Islands. Plant Dis., 75:367-370.

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

WHİTE, R.F.,1979. Asetyl saliciylic acid (aspirin) induced resistance to tobacco mosaic virus in tobacco. Virology 99:410-412.

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.

YANG, Y., J. SHAH, D. F. KLESSİNG, 1997. Signal perception and transduction in plant defense responss. In: Genes and Development II:1621-1639. Cold Spring Herbor Labaratory Press ISSN 0890-9369/85.00

YARDIMCI, N. ve KORKMAZ, S., 2004. Studies on Spread and Identification of Zucchini Yellow Mosaic Virus Disease in the North-West Mediterranean Region of Turkey by Biological Indexing and Double-Stranded RNA Analysis. Plant Pathology Journal, 3 (1):1-4.

YILMAZ, M.A., ABAK, K., LECOQ, H., BALOĞLU, S., SARI, N., KESİCİ, S., ÖZASLAN, M., and GÜLDÜR, M.E., 1994. Control of Zucchini Yellow Mosaic Virus (ZYMV) in Cucurbits by ZYMV-WK Strain. 9th Congress of Mediterranean Phytopathological Union-Kuşadası-Aydın-Türkiye., s.353-356

YILMAZ, M.A., LECOQ, H., ABAK, K., BALOĞLU, S., ve SARI, N., 1992. Türkiye'de Kabakgil Sebze Türlerinde Zarara Yapan Virüsler. Türkiye I. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi, İzmir. 2:439-442.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı **:** Gökhan Buğra ÖZCAN
Uyruğu **:** T.C.
Doğum Yeri ve Tarihi **:** Anamur-20/07/1985
Telefon **:** 5376238425
e-mail **:** bugragokhann@hotmail.com

EĞİTİM

Derece		Adı	İlçe/İl	Bitirme Yılı
Lise	:	Anamur Anadolu Lisesi	Anamur/MERSİN	2003
Üniversite	:	Ankara Üni., Ziraat Fakültesi	Merkez/ANKARA	2007
Yüksek Lisans:		Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilimdalı	Haliliye/ŞANLIURFA	2015

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görevi
2009-	Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı	Ziraat Müh.

YABANCI DİLLER

İngilizce

EKLER

EK 1 ELISA Testinde Kullanılan Tampon Çözeltiler

1. Phosphate Buffered Saline (PBS), pH 7.4 (Fosfat tampon çözeltisi)

8.0 gr	NaCl
0.2 gr	KH_2PO_4
2.9 gr	$Na_2HPO_4.12H_2O$ veya
	2.3 gr $Na_2HPO_4.7H_2O$
	1.44. gr $Na_2HPO_4.2H_2O$
	1.15 gr Na_2HPO_4 (anhdrous)
0.2 gr	KCl
0.2 gr	NaN_3

Yukarıda miktarları verilen kimyasallar 1 litre saf suda eritilip pH' sı 0.1 N NaOH veya 0.1 N HCl ile ayarlanmış ve 4 ºC' de saklanmıştır.

2. Coating Buffer pH 9.6 (Kaplama tampon çözeltisi)

1.59 gr	Na_2CO_3
2.93 gr	$NaHCO_3$
0.2 gr	NaN_3

Yukarıda miktarı verilen kimyasallar 1 litre saf suda eritilip pH' sı ayarlanmış ve 4 ºC' de saklanmıştır.

3. Washing Buffer (Yıkama tampon çözeltisi)

Bir litre PBS tamponu 0.5 ml Tween- 20 ilave edilerek hazırlanmıştır.

4. Sample Extraction Buffer (Örnek tampon çözeltisi)

Bir litre yıkama tamponu çözeltisi içine 20 gr Polyvinylpyrolidone (PVP-40) ilave edilerek hazırlanmıştır.

5. Enzyme Conjugate Buffer (Konjugat tampon çözeltisi)

Bir litre örnek tampon çözeltisine 2 gr ovalbumin (egg albumin) ilave edilerek hazırlanmıştır.

6. Substrat Buffer pH 9.8 (Substrat tampon çözeltisi)

97 ml Diethanolamine 800 ml saf su içine ilave edildikten sonra 0.2 gr NaN_3 konmuş ve HCl ile pH 9.8' e ayarlanarak 1 litreye tamamlanmıştır.

EK 2

Analysis of Variance for verim1, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Uygulamalar	4	135740	135740	33935	3,43	0,027
Error	20	197856	197856	9893		
Total	24	333597				

P< 0,05 Önemli

Analysis of Variance for verim2, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Uygulamalar	4	2291367	2291367	572842	23,82	0,000
Error	20	480942	480942	24047		
Total	24	2772309				

P< 0,01 Çok Önemli

Analysis of Variance for verim3, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Uygulamalar	4	12627077	12627077	3156769	124,36	0,000
Error	20	507699	507699	25385		
Total	24	13134775				

P< 0,01 Çok Önemli

Analysis of Variance for verim4, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Uygulamalar	4	33583613	33583613	8395903	614,32	0,000
Error	20	273338	273338	13667		
Total	24	33856951				

P< 0,01 Çok Önemli

One-way ANOVA: verim1; verim2; verim3; verim4

Source	DF	SS	MS	F	P
Factor	3	9529157	3176386	6,09	0,001
Error	96	50097632	521850		
Total	99	59626789			

P< 0,01 Çok Önemli