Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology, 9(1): 124-129, 2021
DOI: https://doi.org/10.24925/turjaf.v9i1.124-129.3751

Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology

Available online, ISSN: 2148-127X | www.agrifoodscience.com | Turkish Science and Technology Publishing (TURSTEP)

Efficacy of Nitrification Inhibitors on Tomato Bacterial Canker and Wilt (Clavibacter Michiganensis Subsp. Michiganensis)

Aysu Tuğçe Gül[1,a,*], Sümer Horuz[1,b]

[1]*Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Erciyes University, 38039 Kayseri, Turkey*
[*]*Corresponding author*

ARTICLE INFO

Research Article

Received : 20/07/2020
Accepted : 08/09/2020

Keywords:
Bacterial canker
Nitrogen
Fertilizer
Programme
Integrated

ABSTRACT

Tomato bacterial canker and wilt is a destructive disease causing economic losses and affecting plant growth and yield. Due to the lack of disease resistant cultivars and non- effective chemicals, management of the disease is quite tricky. The aims of this study were (1) to identify *Cmm* strains isolated in different years using both classical and molecular tests, (2) to test the efficacy of ammonium sulphate fertilizers with nitrogenous inhibitors on *Cmm* disease development. Eight strains were identified as *Cmm* according to hypersensitive reaction on *Mirabilis jalapa* plant leaves, pathogenicity on tomato seeedlings and production of 614 bp on agarose gel electrophoresis. Non-nitrogenous classical ammonium sulphate as compare treatment, Dicyandiamide (DCD) and 3.5-Dimethylpyrazol glyceborate (DMPB) nitrification inhibitors included ammonium sulphate fertilizers were tested in pot experiments. Fertilizers were applied three times with one week intervals at the 100, 250 and 500 ppm doses as irrigation water and the efficacy of treatments compared with control plants. In two times repeated study, disease development inhibited from 42 to 78% and from 44 to 82% in the first and second trials, respectively. In both treatments, 500 ppm dose of all applied fertilizers was highly decreased the lesion development in plants. This study reported the effect of nitrification inhibitors on tomato bacterial canker and wilt for the first time. In conclusion, it would be beneficial to add inhibitor fertilizers to integrated control programs against tomato bacterial canker and wilt disease.

Türk Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi, 9(1): 124-129, 2021

Farklı Nitrifikasyon İnhibitörlerinin Domateste Bakteriyel Kanser ve Solgunluk (*Clavibacter Michiganensis* Subsp. *Michiganensis*) Hastalığına Etkisi

MAKALE BİLGİSİ

Araştırma Makalesi

Geliş : 20/07/2020
Kabul : 08/09/2020

Anahtar Kelimeler:
Bakteriyel kanser
Azot
Gübre
Program
Entegre

ÖZ

Domateste bakteriyel kanser ve solgunluk hastalığı ekonomik boyutta bitki gelişimini ve verimini sınırlandıran önemli bir hastalıktır. Hastalığa dayanıklı ticari çeşit bulunmaması ve kimyasal mücadelenin yetersiz olması nedeniyle mücadelesi oldukça zordur. Bu çalışmanın amaçları (1) domates bitkilerinden farklı yıllarda elde edilen *Cmm* izolatlarının klasik ve moleküler yöntemlerle tanısını yapmak, (2) domates bakteriyel kanser ve solgunluk hastalığına karşı farklı nitrifikasyon inhibitörlü gübrelerin hastalık gelişimi üzerine etkisini incelemektir.Elde edilen sekiz adet izolat *Mirabilis jalapa* yapraklarında aşırı duyarlılık, domates fidelerinde patojenite özelliği ve agaroz jelde 614 bp bant oluşturarak *Cmm* olarak tanılanmışlardır. Saksı denemeleri şeklinde yürütülen bu çalışmada karşılaştırma olarak azot inhibitörsüz normal amonyum sülfat ile yavaş salınım özelliğine sahip disiyandiamid (DCD) ve 3,5 dimetilpirazolyum gliseroborat (DMPB) azot inhibitörlü amonyum sülfat gübreleri kullanılmıştır. Denemede gübrelerin 100, 250 ve 500 ppm dozları bitkilere sulama suyu şeklinde birer hafta arayla üç kez uygulanmış ve uygulanan gübrelerin etkinliği, pozitif kontrol grubundaki bitkilerle kıyaslanarak belirlenmiştir. İki kez tekrarlanan çalışmada, birinci denemede gübreler hastalık gelişimini %42-78 oranları arasında, ikinci denemede ise %44-82 oranları arasında engellemiştir. Her iki denemede inhibitörlü ve inhibitörsüz gübrelerin 500 ppm dozları hastalığı baskılamada en etkili uygulamalar olmuştur. Bu çalışma azot inhibitörlü gübrelerin bakteriyel kanser ve solgunluk hastalığı üzerine etkisini ortaya koyan ilk çalışmadır. Sonuç olarak, domates bakteriyel kanser ve solgunluk hastalığı ile entegre mücadele programlarına inhibitörlü gübrelerin de eklenmesi faydalı olacaktır.

[a] *aysutugce44@gmail.com* *http://orcid.org/0000-0003-1925-8071* | [b] *sumer_536@yahoo.com* *https://orcid.org/0000-0002-5374-7082*

This work is licensed under Creative Commons Attribution 4.0 International License

Giriş

Domates (*Solanum lycopersicum* L.) Solanaceae familyasına ait sebzeler içinde önemli bir türdür. Tropik bölgelerde çok yıllık olarak, diğer bölgelerde ise tek yıllık bitki şeklinde yetiştirilmektedir (Abak, 2016). En çok domates üretimi yapan ülkeler içerisinde Türkiye 12 milyon 750 bin ton domates üretim miktarıyla Dünya'daki domates üretiminde üçüncü sırada yer almaktadır (FAO, 2017). Domateste önemli verim kayıplarına neden olan bakteriyel hastalıklardan biri *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* [(Smith) Davis et al.] (*Cmm*)'in neden olduğu bakteriyel kanser ve solgunluk hastalığıdır. Etmen öncelikle ksilemden girerek parankima hücreleri ve floeme doğru yayılım gösterdiği için petiollerde ve bitki gövdesinde açık sarımsı kahverengi nekrozlar şeklinde belirti oluşturur. Oluşan nekrozlar zamanla koyulaşır ve bitki gövdesinde çatlaklar oluşturarak genişleyebilir. Meyvelerde ise kuş gözü olarak adlandırılan belirtiler, 3-6 mm çapında, kremsi beyaz halelerle çevrelenmiş taba rengi veya kahverengi merkezlere sahiptir (Jones ve ark., 2014). Hastalıkla mücadelede tohum üretimi yapılan tarlalarda sık kontrollerin yapılması, fideliklerde hastalık kontrolünün dikkatli yapılması gerekir. Domates alanlarında insan faaliyetlerini kontrol etmek, sanitasyon önlemleri, ürün rotasyonu hastalığı yönetmede başvurulan başlıca önlemlerdir. Tüm bu mücadele yöntemlerinin dışında kültürel önlemler içerisinde bitki beslemenin de önemli rolü vardır (Bergmann, 1992). Kaliteli ve sağlıklı bitki üretiminde büyük payı olan gübrelemede en çok kullanılan gübreler içerisinde azotlu gübreler yer almaktadır (Maynard ve ark., 1976). Bitkiler azotlu gübreleri amonyum, amin ve nitrat formları şeklinde alabilirler, amin ve amonyum formlarındaki azotu *Nitrosomonas*, *Nitrococus* bakterileriyle nitrite (NO_2^-), sonrada *Nitrosolobus* ve *Nitrobacter* bakterileri de nitrata (NO_3^-) çevirmektedir. Ancak, volatilizasyon, denitrifikasyon ve yıkanma gibi birçok farklı sebeplerden dolayı azot kayıpları oluşmaktadır (Gök, 2019). Bu kayıpları minimum düzeye indirmek için azot korumalı gübreler geliştirilmiştir. Azot korumalı gübreler içerisinde nitrojen inhibitörlü gübreler amonyumun nitrata dönüşmesini sağlayan nitrifikasyon bakterilerinin çalışmasını engelleyip toprak koşuluna bağlı olarak 4-8 hafta boyunca azotun amonyum formda kalmasını sağlar. Bu özellikleriyle yavaş salınımlı gübreler olarak da ifade edilirler. Azotlu gübrelerin etkinliklerini arttıran ve nitrifikasyon bakterilerinin aktivitesini geciktiren pek çok inhibitör geliştirilmiştir. Bunlar: Nitrapyrin (2-chloro-6-(trichloromethyl-pyridine)), ATC (4-amino-1,2,4-6-triazole-HCl), DMPP (3,4-dimethylpyrazole phosphate), DCD (disiyandiamid) ve DMPB (3,5 dimetilpirazolyum gliseroborat) inhibitörleridir (Şahan ve ark., 2017).

Bu çalışmanın amaçları: 1-domates bitkilerinden farklı yıllarda elde edilen *Cmm* izolatlarının klasik ve moleküler yöntemlerle tanısını yapmak, 2-domates bakteriyel kanser ve solgunluk hastalığına karşı farklı nitrifikasyon inhibitörlü ve inhibitörsüz gübrelerin hastalık gelişimi üzerine etkisini iki kez tekrarlanan saksı denemeleriyle ortaya koymaktır.

Materyal ve Yöntem

Çalışmada farklı yıllarda elde edilen 8 adet *Cmm* izolatı tanılanmıştır (Çizelge 1). Besi yerleri olarak King B (KB) ve Yeast Dekstroz Kalsiyum Karbonat Agar (YDCA) kullanılmıştır (Lelliott ve Stead, 1987). Saksı denemesi şeklinde yürütülen çalışmada, 1. denemede Falcon F1 oturak domates çeşidi, 2. denemede Yükselköy F1 sırık domates çeşidi tercih edilmiştir. Her saksıda (23×21 cm boyutunda) 2300 gr kum+kil+torf (eşit oranlarda) karışımı kullanılmıştır. Bitkilere Spectro Turn 21 ticari isimli DCD inhibitörlü amonyum sülfat, Stable N-21 ticari isimli DMPB inhibitörlü amonyum sülfat ve inhibitörsüz beyaz renkli klasik amonyum sülfat (AS) gübresi uygulanmıştır.

Bakteri İzolatlarının Kültürde Geliştirilmesi ve Patojenite Testi

Gliserol içerisinde -20 °C'deki buzdolabındaki bakteri izolatları KB besi yerine üç çizgi yöntemiyle çizilerek 72 saatte geliştirilmiştir. Her bir bakteri izolatından bir öze dolusu 9 ml steril saf su içerisinde süspanse edilmiştir. Her bir süspansiyon spektrofotometrede 600 nm'de 0,2 absorbans değerine ayarlanmıştır. Her süspansiyondan steril enjeksiyonluk iğne ile 100 µl alınmış ve 4-5 gerçek yapraklı hastalığa duyarlı H-2274 domates çeşidinin gövdesine tek bir noktadan enjekte edilerek patojenite testi yapılmıştır. Bitkiler bitki yetiştirme kabinlerinde 28 °C'de %70 nemde Nisan-Haziran 2019 ayları arasında belirti gözlenene kadar bekletilmiştir.

Hastalıklı Bitkilerden Patojen Bakteri Re-İzolasyonu

Bitkilerde solgunluk, gövdede çatlama ve kanser gözlenen hastalıklı bitki örneklerinin gövdesi temiz bir bıçak yardımıyla iletim demeti boyunca kesilip, sarı veya kahverengi renk değişikliği gözlenen hasta kısımlardan doku örnekleri alınmıştır. %70 alkolle yüzey dezenfeksiyonu yapıldıktan sonra steril havanda ezilip 2-3 ml steril saf su ile homojen bir süspansiyon elde edilmiştir. Bir öze dolusu bakteri alınarak KB besi yerine üç çizgi yöntemiyle ekimleri yapılmıştır. Petriler inkübatörde 25 °C'de 3-5 gün inkübe edilerek bakterilerin gelişimi sağlanmıştır. Gelişen sarı renkteki bakteri kolonileri saflaştırılmış ve eğik YDCA besi yerlerine aşılanarak +4 °C'de ve gliserol içerisinde (%40 gliserol+nutrient broth) -20 °C'de buzdolabında re-izolatlar muhafaza edilmiştir.

KOH Testi ile Gram Reaksiyonu

Potasyum hidroksit (KOH) ile bakterilerin gram reaksiyonunu belirlemek için taze %3'lük KOH çözeltisi saf su içerisinde hazırlanmıştır. Hazırlanan KOH çözeltisinden bir-iki damla bir lam üzerine damlatılmıştır. Geliştirilen taze bakteri kolonilerinden öze ile alınarak KOH damlası içerisinde 10-15 saniye karıştırılmıştır. Öze yukarı doğru hafif hareketlerle kaldırıldığında KOH çözeltisinin viskoz bir hal alması ve uzaması pozitif, sulu bir yapı oluşması ve yukarı doğru viskoz uzama olmaması negatif reaksiyon olarak kabul edilmiştir. Karşılaştırma amaçlı kontrol olarak bir adet Gr (-) özellikte *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* ve bir adet Gr (+) özelliğe sahip *Cmm* izolatı kullanılmıştır.

Akşamsefası (Mirabilis Jalapa) Bitkisinde Aşırı Duyarlılık Testi

Petrilerde gelişen bakteri kolonilerinden bir öze dolusu alınıp 9 ml steril saf su içerisinde süspanse edilmiştir. Her birinden steril enjektörle alınan süspansiyon *M. jalapa* F1

bitkisinin yaprak damar arasına inokule edilmiştir. *M. jalapa* yapraklarında bir gün sonra oluşan su emmiş kuru alanlar aşırı duyarlılık reaksiyonu olarak kabul edilmiştir.

Tanıyı Destekleyici PCR Analizi

Moleküler test çalışması için PCR Master Mix (Promega, M7502), de-iyonize su, primerler ve bakteri DNA'sı kullanılmıştır. Moleküler tanı testi Dreier ve ark. (1995)'in bildirdiği yöntem kullanılarak yapılmıştır. Araştırıcılar tarafından bulunan patojene spesifik CMM5 (5'-GCGAATAAGCCCATATCAA-3') ve CMM6 (5'-CGTCAGGAGGTTCGCTAATA-3') primerleri kullanılarak moleküler tanı gerçekleştirilmiştir. PCR ürünü 25 µl olarak hazırlanmıştır. Hazırlanan örnekler Thermalcycler cihazına yerleştirilip belirlenen PCR programı kurularak DNA'nın çoğalması sağlanmıştır (Dreier ve ark., 1995). PCR ürünleri %1,5' lik agaroz jelde görüntülenmiştir. Bant büyüklüğünü kontrol etmek için 100 bp'lik moleküler işaretleyici (Thermo Fisher, SM 0371) kullanılmıştır. 614 bp büyüklüğündeki bant oluşumları pozitif olarak değerlendirilmiştir.

İnhibitörlü ve İnhibitörsüz Gübrelerin Domates Fidelerine Uygulanması

İnhibitörlü ve inhibitörsüz gübrelerden 117 gr tartılmış ve 2 litre suda eritilmişlerdir. Daha sonra 100 ppm dozu için 10 ml, 250 ppm için 25 ml ve 500 ppm için 50 ml gübre, saksılardaki fidelere sulama suyu şeklinde üç uygulama olarak verilmiştir. Pozitif kontrol grubundaki bitkilere sadece patojen inokule edilmiştir. Negatif kontrol grubundakilere ise sadece saf su verilmiştir. Gübreler fideler şaşırtıldıktan 1, 7 ve 14 gün sonra belirtilen oranlarda verilmiştir. Pozitif ve negatif kontrol bitkileri sadece su ile sulanmıştır.

Bitkilerin Patojen Bakteriyle Bulaştırılması

Taze olarak KB besi yerinde geliştirilen virülensliği en yüksek ME *Cmm* 6 1r kodlu bakteri izolatından steril saf su ile süspansiyon hazırlanmıştır. Bu süspansiyon spektrofotometrede 600 nm dalga boyunda 0,2 absorbans değerine ayarlanmış ve süspansiyondaki bakteri yoğunluğu petri sayım yöntemine göre $3x10^8$ hücre/ml olarak belirlenmiştir. Saksıda şaşırtılmış ve gübre uygulanmış bitkilere 3×10^8 hücre/ml yoğunluğundaki *Cmm* izolatından bitkilerin gövdelerine steril enjektörlerle tek bir noktadan 100 µl oranında inokulasyon gerçekleştirilmiştir. Patojen bakteri birinci denemede domatesler şaşırtıldıktan iki hafta sonra yani 25 Haziran 2020 tarihinde, ikinci denemede ise şaşırtmadan bir gün sonra uygulanmıştır. Pozitif kontrol grubundaki bitkilere sadece patojen inokule edilmiştir. Negatif kontrol grubundakilere ise sadece saf su enjekte edilmiştir. Pozitif ve negatif kontrol grubundaki bitkilere hiçbir gübre uygulaması yapılmamıştır.

Gübrelerin Domates Bakteriyel Kanser ve Solgunluk Hastalığına Etkisi

Denemeler Erciyes Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü'ne ait ısıtmasız serada iki saksı denemesi şeklinde kurulmuştur. Çalışmada farklı gübreler ve dozlarının hastalık üzerine etkisini belirlemek amacıyla dokuz uygulama (Amonyum sülfat 100 ppm, A. sülfat 250 ppm, A. sülfat 500 ppm, DCD 100 ppm, DCD 250 ppm, DCD 500 ppm, DMBP 100 ppm, DMBP 250 ppm, DMBP 500 ppm), pozitif ve negatif kontrol grupları olmak üzere toplamda 11 uygulama ile iki deneme kurulmuştur. Birinci deneme 10 Haziran- 20 Ağustos 2019 tarihleri arasında, ikinci saksı denemesi ise 22 Ağustos- 14 Ekim 2019 tarihleri arasında yürütülmüştür. Deneme tesadüf blokları deneme desenine göre üç tekrarlı ve her tekrarda üç bitki değerlendirilecek şekilde kurulmuştur.

Denemelerin Değerlendirilmesi

Bitkiler günlük olarak incelenip, pozitif kontrol grubundaki bitkilerde solgunluk, sararma gibi hastalığa ait belirtiler gözlenince tüm bitkiler toprak yüzeyinin hemen üst kısmından temiz bir bıçak yardımıyla kesilmiş, bitki boyları ölçülmüş ve kaydedilmiştir. Pozitif kontrol ve gübre uygulanmış bitkilerin gövdeleri boyuna kesilerek iletim demetindeki sararma, kahverengileşme renk değişimlerine bakılarak enfeksiyon boyu ölçülmüş ve kaydedilmiştir. Elde edilen bu ölçümler neticesinde lezyon boyu bitki boyuna oranlanarak % hastalık (% hastalık= (lezyon boyu bitki boyu^{-1})*100) hesaplanmıştır (Klement ve ark., 1990). Gübrelerin etkinliği, pozitif kontrol grubundaki bitkilerin hastalık düzeylerinin gübre uygulaması yapılanların hastalık düzeylerine oranıyla % Abbott formülüyle (kontrol-uygulama kontrol^{-1}*100) hesaplanmıştır. Bulunan değerlerin açı değerleri alınarak SPSS istatistik programında Tukey HSD çoklu karşılaştırma testiyle ($p\leq0,05$ önem düzeyine göre) uygulamaların arasındaki istatistiksel farklar tek yönlü ANOVA varyans analiziyle hesaplanmıştır. Sonuca göre tüm gruplar harflendirilmiş ve elde edilen sonuçların yorumu yapılmıştır.

Bulgular ve Tartışma

Domates Bitkilerinde Patojenite Testi

Domates bitkilerinin gövdesine tek noktadan inokule edilen sekiz adet bakteriyel izolat bitkilerde genel solgunluk ve kuruma, gövdede çatlama ve iletim demetinde kahverengileşmeye neden olmuştur. Hastalıklı bitkilerden yapılan re-izolasyonlarda petride gelişen sarı renkli mukoid tipte tek kolonilerden 32 adet re-izolat elde edilmiştir. Elde edilen re-izolatlar gram pozitif özelliktedir.

Akşamsefası (Mirabilis jalapa) Bitkisinde Aşırı Duyarlılık Reaksiyonu

Re-izolatlardan sekiz adedi akşam sefası bitkisinin yapraklarının iki damar arasına steril enjektör ile inokule edilmiş ve inokulasyon yerinde 24 saat sonra su emmiş ve hafif çöküк alanlar oluşmuştur. Bu durum pozitif olarak değerlendirilmiştir. Sadece saf su enjekte edilen alanda herhangi bir çökme ya da su emmiş alan oluşmamıştır ve bu sonuç negatif olarak değerlendirilmiştir

Tanıyı Destekleyici PCR Analizi

DNA izolasyonu ile *Cmm* izotlatlarından elde edilen saflaştırılmış genomik DNA'lar ve etmene spesifik primerlerle PCR çalışması yapılmıştır. Sekiz adet *Cmm* DNA' sı thermalcycler cihazında çoğaltılmış ve görüntüleme için %1,5'lik agaroz jelde iki saat süreyle 80 voltta yürütülmüştür. İzolatların tamamı 614 bp büyüklüğünde bant oluşturmuş ve *Cmm* olarak tanılanmışlardır.

Çizelge 1. Hasta domates bitkilerinden elde edilen izolatlar ve bilgileri

Table 1. Isolates from diseased tomato plants and their information

Kodu	Yıl	Yer
ME Cmm 1	2015	Erdemli Mersin
ME Cmm 6	2015	Erdemli Mersin
Mersin Cmm 2	2017	Büyük Sorgun Mersin
Demre Cmm 1a	2017	Demre Antalya
Demre Cmm 2a	2017	Demre Antalya
HT 2a Cmm	2018	Antalya
MT 1a Cmm	2018	Silifke Mersin
ÖT 2b Cmm	2018	Silifke Mersin

Çizelge 2. Gübrelerin domates bakteriyel kanser ve solgunluk hastalığına etkisi (1.deneme)

Table 2. The effect of fertilizers on bacterial canker and wilt disease in tomato (1.experiment)

Uygulamalar	Ortalama Hastalık %	Etki %
Pozitif kontrol	51,24^{a*}	-
**A. sülfat 100	26,87^{ab}	47,56
A. sülfat 250	26,3^{ab}	48,67
A. sülfat 500	11,41^{bc}	77,73
***DMPB 100	29,67^{ab}	42,09
DMPB 250	28,29^{ab}	44,78
DMPB 500	14,85^{b}	71,01
***DCD 100	25,85^{ab}	49,55
DCD 250	22,94^{ab}	55,23
DCD 500	11,43^{b}	77,69

*Tukey testine göre aynı sütunda aynı harfle gösterilen ortalamalar arasındaki fark P≤0,05'e göre önemsizdir, **Azot inhibitörsüz gübre ve dozları, ***Azot inhibitörlü gübreler ve dozları

Çizelge 3. Gübrelerin domates bakteriyel kanser ve solgunluk hastalığına etkisi (2.deneme)

Table 3. The effect of fertilizers on bacterial canker and wilt disease in tomato (2.experiment)

Uygulamalar	Ortalama Hastalık %	Etki %
Pozitif kontrol	47,99^{a*}	-
A. sülfat 100	26,70^{ab}	44,36
A. sülfat 250	10,44^{b}	78,24
A. sülfat 500	10,24^{b}	78,66
DMPB 100	20,89^{ab}	56,47
DMPB 250	13,90^{b}	71,04
DMPB 500	12,27^{b}	74,43
DCD 100	26,19^{ab}	45,42
DCD 250	8,79^{b}	81,68
DCD 500	8,56^{bc}	82,16

*Tukey testine göre aynı sütunda aynı harfle gösterilen ortalamalar arasındaki fark P≤0,05'e göre önemsizdir.

Gübrelerin Domates Bakteriyel Solgunluk Hastalığına Etkisi

Birinci Saksı Denemesi

Yürütülen ilk denemede, inhibitörlü ve inhibitörsüz gübreler *Cmm*'in gelişimini %42-78 oranında engellemiştir (Çizelge 2). İnhibitörsüz amonyum sülfat uygulanmış bitkilerde ortalama hastalık oranı %11,41-26,87, DMPB inhibitörlü gübre uygulanmış bitkilerde %14,85-29,67 ve DCD inhibitörlü gübre uygulanmış bitkilerde ise %11,43-25,85 arasında kaydedilmiştir. Gübrelerin etkinlikleri incelendiğinde inhibitörsüz amonyum sülfatın 100, 250 ve 500 ppm dozlarında etki sırasıyla %47,56, %48,67 ve %77,73 olmuştur. DMPB inhibitörlü gübrenin farklı dozlarının hastalık gelişimine etkisi 100 ppm dozda %42,09, 250 ppm'de %44,78 ve 500 ppm dozunda %71,01 etki bulunmuştur. DCD inhibitörlü gübre uygulanmış bitkilerde hastalığın engellenme oranları %49,55, %55,23 ve %77,70 olarak hesaplanmıştır. Her üç gübre uygulamasının 500 ppm uygulanmış dozlarında etki istatistiki olarak pozitif kontrolden farklı grupta yer almış ve en başarılı uygulamalar oldukları saptanmıştır.

İkinci Saksı Denemesi

Uygulanan gübreler domates bakteriyel solgunluk hastalık ilerleyişini %44,36-82,16 oranında engellemiştir. Pozitif kontrolde ortalama hastalık oranı %47,99, inhibitörsüz amonyum sülfat uygulanmış bitkilerde ortalama hastalık oranı %10,24-26,70, DMPB ve DCD inhibitörlü gübre uygulanmış bitkilerde oran %8,56-26,19 arasında değişkenlik göstermiştir. Hastalığın iletim demetindeki seyri üzerine inhibitörsüz amonyum sülfat uygulamasının üç dozu hastalığı sırasıyla %44,36, %78,24 ve %78,66 oranlarında azaltmıştır. DMPB inhibitörlü gübrenin 100 ppm dozunda etki %56,47, 250 ppm'de %71,04 ve 500 ppm dozunda etki ise %74,43 olarak bulunmuştur. DCD inhibitörlü gübre uygulanmış bitkilerde hastalığın baskılanma oranları sırasıyla %45,43, %81,68 ve %82,16 olarak hesaplanmıştır. Her üç gübre uygulamasının 250 ve 500 ppm uygulanmış dozlarında etki pozitif kontrolden farklı grupta yer almış ve en başarılı uygulamalar oldukları saptanmıştır (Çizelge 3).

Bakteriyel etmen *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in neden olduğu domates bakteriyel kanser ve solgunluk hastalığı domates üretimini ve verimi büyük oranda sınırlandıran en önemli sistemik hastalıktır. Hastalığa dayanıklılık birden fazla gen ile kontrol edildiğinden dayanıklı ticari çeşit henüz bulunmamaktadır. Bu nedenle hastalığın mücadelesinde temiz tohumluk kullanmak, hijyen ve sanitasyon önlemlerine özen göstermek, bitkiyi hastalığa karşı dayanıklı kılacak uygulamalar yapmak büyük önem arz etmektedir. Tarımsal üretimde bitkide çeşitli fizyolojik ve biyokimyasal olayların gerçekleşmesinde çeşitli elementler rol oynar. Toprakta bu elementlerin yeterli seviyelerde olması gereklidir. Bitki tarafından alınan azot miktarında farklılıklar vardır ve azotun hastalıklar üzerine olumlu ve olumsuz etkileri de çok fazladır. Örneğin azotun çeşitli hastalıklara karşı dayanıklılığı uyardığı ve artan dozlarda hastalık şiddetinin azaldığını ifade eden çalışmalar mevcutken (Devadas ve ark., 2014), aksine doz arttıkça hastalığa duyarlılığın arttığını ortaya koyan çalışmalar da bulunmaktadır (Hoffland ve ark., 2000; Dos Santos ve ark., 2009). Bu farklılıklar bitki tarafından alınan azotun formu ya da patojenin obligat ya da fakültatif olması ile alakalı olabileceği bildirilmiştir (Celar, 2003).

Bu çalışmaların dışında 1950'li yılların sonunda topraktan azot yıkanmasını ve kayıpları engelleyerek bitkinin topraktaki azottan daha uzun süre faydalanmasını sağlamak amacıyla uygulanan azota nitrifikasyon inhibitörü eklenmesi gündeme gelmiştir (Goring, 1962; Prasad ve Power, 1995). Tarım sektöründe en fazla tercih edilen iki inhibitörden biri olan DCD Avrupa'da ve pyradin inhibitörü Amerika'da kabul görmüştür. Son dönemlerde yeni bir inhibitör olarak DMPP ve Türkiye'de ilk olarak DMPB nitrifikasyon inhibitörlü gübre marketlerde yerlerini almıştır. Tarımda farklı nitrifikasyon inhibitörlü

azotlu gübrelerin daha çok bitki verimi ve kalite parametreleri üzerine etkilerini araştıran çalışmalar mevcuttur (Pasda ve ark., 2001; Gök, 2019; Uçar, 2019). Özellikle bu gübrelerin buğday ve mısırda bitki verimini ve azot kullanım etkinliğini arttırdığı (Raza ve ark., 2019), silajlık mısırda yeşil ve kuru ot verimini arttırdığı (Karagöz, 2018), mısır tane verimi, protein ve nişasta oranında artış sağladığını (Dong ve ark., 2016; Lozek ve Slamka, 2016) ortaya koyan çalışmalar bulunmaktadır.

Bitkilerde çeşitli hastalıklarla mücadelede azotlu gübrelemenin önemini vurgulayan çeşitli çalışmalar mevcut iken (Atim ve ark., 2013), azot nitrifikasyon inhibitörlü gübrelerin bitkide hastalık gelişimi ve engellenmesi üzerine ne düzeyde etkide bulunduğu ile ilgili bilimsel çalışmaya rastlanmamıştır. Bu amaçla, yürütülen bu çalışma kapsamında, farklı nitrifikasyon inhibitörlü ve inhibitörsüz azotlu gübrelerin domateste bakteriyel kanser ve solgunluk (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) hastalık gelişimine olan etkisi araştırılmıştır.

Çalışmada kullanılan iki farklı inhibitörlü ve inhibitörsüz amonyum sülfat gübreleri, domateste bakteriyel kanser ve solgunluk hastalığını baskılamada başarılı bulunmuştur. Yürütülen birinci saksı denemesinde inhibitörsüz Amonyum sülfat %47-77, DCD inhibitörlü gübreler %49-77 ve DMPB inhibitörlü gübreler %42-71 arasında hastalık gelişimini azaltmıştır. İkinci saksı denemesinde ise inhibitörsüz Amonyum sülfat %44-78, DCD inhibitörlü gübreler %45-82 ve DMPB inhibitörlü gübreler %56-74 arasında hastalığı engellemiş ve birinci saksı deneme sonuçlarıyla benzerlik göstermiştir. Yine dozlar karşılaştırıldığında inhibitörsüz ve inhibitörlü gübrelerin normal önerilen 250 ppm dozunun iki katı olan 500 ppm dozu uygulandığında hastalık oranında azalmanın birinci denemede %71-77, ikinci denemede ise %74-82 olduğu tespit edilmiştir. Bu durum domateste bakteriyel kanser ve solgunluk hastalığı ile mücadelede normal önerilen dozun arttırılmasıyla hastalık gelişimi arasında bir etkileşim olduğunu ve doz arttıkça iletim demetinde hastalık ilerleyişinin daha az olduğunu ortaya koymuştur. Denemeler saksıda yürütüldüğünden üç kez uygulanan azot toprakta kalmış ve bitki bundan faydalanabilmiştir. Bu nedenle artan dozda hastalık gelişimi de azalmıştır. Benzer şekilde Atim ve ark. (2013), potasyum, kalsiyum ve azot uygulamalarının farklı dozlarının muzda bakteriyel solgunluk hastalığına (*Xanthomonas campestris* pv. *musacearum*) etkisini incelemişlerdir. Normal önerilen dozların altındaki farklı dozlar ile önerilen dozun iki katı oranındaki dozları uyguladıklarında doz arttıkça hastalık oranının fark edilir oranda azaldığını ve buna bağlı olarak ilk hastalık belirtilerinin görülmesi için geçmesi gereken sürenin de arttığını tespit etmişlerdir. Huber ve Graham (1999), bitkilere uygulanan inorganik azot formlarının domateste *Verticillium* solgunluk hastalığında artan oranda nitrat doz uygulamalarının hastalığı tetiklediğini, artan doz amonyumun ise hastalık gelişimini yavaşlattığını ortaya koymuşlardır. Bizim çalışmamızın aksine Zimerman Lax ve ark. (2016), kavun bakteriyel meyve lekesi (*Acidovorax citrulli*) hastalığına azotlu gübrelemenin etkisini incelemiş ve nitrat formulasyonunun amonyuma göre hastalığı daha fazla azalttığını saptamışlardır. Bu durum Celar (2003) tarafından patojenin durumu, konukçu bitkinin azot ihtiyacına göre farklılık gösterebileceği vurgulanmıştır.

Domateste bakteriyel kanser ve solgunluk hastalığı tedbirler alınmazsa önemli düzeyde ekonomik kayıplara sebep olmaktadır. Bu çalışmada, domates fidelerine inhibitörsüz amonyum sülfat, DCD ve DMPB inhibitörlü amonyum sülfat gübreleri 100, 250 ve 500 ppm dozlarında üç kez uygulandıklarında domates bakteriyel kanser ve solgunluk hastalığını her üç doz %42-82 arasında azaltmıştır. İnhibitörlü gübreler ile inhibitörsüz amonyum sülfat karşılaştırıldığında, her üç gübre uygulamasının 500 ppm dozları hastalığı %70 ve üzerinde engellemiştir. Hem inhibitörlü hem de inhibitörsüz gübreler her iki denemede de hastalığı baskılamada benzer sonuçlar vermiştir. Elde edilen bulgular da dikkate alınarak çiftçiye önerilen 250 ppm dozun hastalığı azaltmada etkili olduğu ancak yetersiz kaldığı belirlenmiştir. Tavsiye edilen 250 ppm dozu ile 500 ppm dozları arasındaki diğer doz aralıklarının da özellikle tarla ya da serada çiftçi koşullarında bu hastalığa karşı denenmesi ve hastalığa en etkili dozun belirlenmesi gerekmektedir.

Azot gübrelemesi bitki gelişimi, verim ve kalite üzerine doğrudan etkisi olan bir elementtir. Bu nedenle azotun yarayışlılığını arttırmak, bitkilerin hastalık ve zararlılara dayanımını tetiklemek için çeşitli formlarda uygulanmaktadır. Bu uygulama şekillerinden biri olan inhibitörlü amonyum sülfat gübrelemesi azot yıkanmasının fazla olduğu alanlarda özellikle yavaş salınım özelliklerinden ötürü inhibitörsüz amonyum sülfat gübresine alternatif olarak domates bakteriyel kanser ve solgunluk hastalığı ile mücadelede tercih edilebilir. İnhibitörlü gübrelerin bakteriyel kanser ve solgunluk hastalığına etkisi ilk kez bu çalışma ile ortaya konmuştur. Azot inhibitörlü gübrelerin kültür bitkilerindeki diğer hastalıklara da etkisinin çalışılması önerilmektedir.

Sonuç

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis*'in neden olduğu domateste bakteriyel kanser ve solgunluk hastalığının entegre mücadelesinde sertifikalı, hastalıksız tohum-fide kullanımına özen gösterilmeli, varsa dayanıklı (tolerant) çeşit tercih edilmeli, üretim alanında sanitasyon önlemlerine dikkat edilmeli, lokal enfeksiyon ve üretim alanında bulaşmaları azaltmak için bakırlı preparatlar kullanılmalı, klasik amonyum sülfat gübrelemesinin yanı sıra farklı azot inhibitörlü gübreler hastalıkla entegre mücadele programı içine alınmalıdır. Hastalığa karşı dayanıklı ticari çeşit geliştirme ile ilgili ıslah çalışmalarına da daha fazla ağırlık verilmelidir.

Teşekkür

Bu çalışma Erciyes Üniversitesi BAP birimi tarafından desteklenen (FYL 2019 9243) yüksek lisans tez çalışmasıdır.

Kaynaklar

Abak K. 2016. Türkiye'de Domatesin Dünü, Bugünü ve Yarını. Türkiye Tohumcular Birliği Dergisi (Erciyas, M., Bağcı, AS Edits.), 17: 8-13.

Atim M, Beed F, Tusiime G, Tripathi L, van Asten P. 2013. High Potassium, Calcium, and Nitrogen Application Reduce Susceptibility to Banana Xanthomonas Wilt Caused by *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum*. Plant Disease, 97(1): 123-130.

Bergmann W. 1992. Nutritional disorders of plants: Development. Journal of Plant Nutrition Soil Science, 166: 377.

Celar F. 2003. Competition for Ammonium and Nitrate Forms of Nitrogen between Some Phytopathogenic and Antagonistic Soil Fungi. Biological Control, 28(1): 19-24.

Devadas R, Simpfendorfer S, Backhouse D, Lamb DW. 2014. Effect of Stripe Rust on The Yield Response of Wheat to Nitrogen. The Crop Journal, 2(4): 201-206.

Dong YJ, He MR, Wang ZL, Chen WF, Hou J, Qiu XK, Zhang JW. 2016. Effects of New Coated Release Fertilizer on The Growth of Maize. Journal of Soil Science and Plant Nutrition, 16(3): 637-649.

Dos Santos GR, De Castro Neto MD, De Almeida HS, Ramos LN, Sarmento RA, Lima SDO, Erasmo EAL. 2009. Effect of Nitrogen Doses on Disease Severity and Watermelon Yield. Horticultura Brasileira, 27(3): 330-334.

Dreier J, Bermpoh A, Eichenlaub R. 1995. Southern hybridization and PCR for specific detection of phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Phytopathology, 85: 462-468.

FAO, 2017. Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAOSTAT. Available from: http://www.fao.org /faostat/en/#data/QC/visualize [Accessed: 27. 12. 2019].

Goring CA. 1962. Control of Nitrification of Ammonium Fertilizers and Urea by 2-chloro-6-(trichloromethyl) pyridine. Soil Science, 93(6): 431-439.

Gök ME. 2019. DMPB Nitrifikasyon İnhibitörünün Patates Bitkisinin Verim ve Kalitesi Üzerine Etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erciyes Üniversitesi, Kayseri.

Hoffland E, Jeger MJ, Van Beusichem ML. 2000. Effect of Nitrogen Supply Rate on Disease Resistance in Tomato Depends on The Pathogen. Plant and Soil, 218(1-2): 239-247.

Huber DM, Graham RD. 1999. The Role of Nutrition in Crop Resistance. Mineral Nutrition of Crops: Fundamental Mechanisms and İmplications, 18(12): 169.

Jones JB, Zitter TA, Momol TM, Miller SA. 2014. Compendium of Tomato Diseases and Pests. Saint Paul, MN: American Phytopathological Society, 58-60.

Karagöz ŞM. 2018. Farklı Azotlu Gübre ve Dozlarının Silajlık Mısırın Verim ve Kalite Özelliklerine Etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erciyes Üniversitesi, Kayseri.

Klement Z, Mavrıdıs A, Rudolph K, Vıdaver A. 1990. Inoculation of plant tissue. In: Klement Z, Rudolph K, and Sands DC (editors). Methods in Phytobacteriology. Akademiai Kiado, Budapest, Hungary.

Lelliot RA, Stead DE. 1987. Diagnostic Procedures for Bacterial Plant Diseases. In Methods for the Diagnosis of Bacterial Diseases of Plants 58-59. Blackwell Scientific Publicati ons, 216.

Ložek O, Slamka P. 2016. Effect of Nitrogen-Sulphur Nutrition and İnhibitors of Nitrification nn The Yield and Quality of Maize Grain. Acta Fytotechnica et Zootechnica, 19(2): 45-50

Maynard DN, Barker AV, Minotti PL, Peck NH. 1976. Nitrate Accumulation in Vegetables. *In*: Advances in Agronomy (Vol. 28, pp. 71-118). Elsevier Academic Press.

Pasda G, Hähndel R, Zerulla W. 2001. Effect of Fertilizers with The New Nitrification İnhibitor DMPP (3, 4-dimethylpyrazole phosphate) on Yield and Quality of Agricultural and Horticultural Crops. Biology and Fertility of Soils, 34(2): 85-97.

Prasad R, Power JF. 1995. Nitrification İnhibitors for agriculture, Health and The Environment. Advances in Agronomy, 54: 233–281

Raza S, Chen Z, Ahmed M, Afzal MR, Aziz T, Zhou J. 2019. Dicyandiamide Application İmproved Nitrogen Use Efficiency and Decreased Nitrogen Losses in Wheat-Maize Crop Rotation in Loess Plateau. Archives of Agronomy and Soil Science, 65(4): 450-464.

Şahan S, Şahin U, Başaran M, Uzun O, Güneş A. 2017. Determination of 3, 5–Dimethylpyrazolium Glyceroborate Nitrification İnhibitor in Nitrogen Fertilizer Samples: HPLC-DAD Method Development and Validation for 3, 5–Dimethylpyrazole. Journal of Chromatography B, 1068: 277-281.

Uçar E. 2019. Farklı Nitrifikasyon İnhibitörlü Azotlu Gübrelerin Silajlık Mısırın (*Zea mays indentata*) Verim ve Kalite Özelliklerine Etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erciyes Üniversitesi, Kayseri.

Zimerman-Lax N, Shenker M, Tamir-Ariel D, Perl-Treves R, Burdman S. 2016. Effects of Nitrogen Nutrition on Disease Development Caused by *Acidovorax citrulli* on Melon Foliage. European Journal of Plant Pathology, 145(1), 125-137.