

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**BAL KABAĞINDA KABAK SARI MOZAİK VİRUS'UNA KARŞI BAZI BİTKİ  
AKTİVATÖRLERİNİN ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ**

**Ahmad HEKMAT KASHTBAN**

**BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI**

**ANKARA  
2010**

**Her hakkı saklıdır**

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### BAL KABAĞINDA KABAK SARI MOZAİK VİRUS' UNA KARŞI BAZI BİTKİ AKTİVATÖRLERİNİN ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

Ahmad HEKMAT KASHTBAN

Ankara Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Bitki Koruma Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. İ. Özer ELİBÜYÜK

Bu çalışmada bal kabaklarında Kabak sarı mozaik virüsüne (*Zucchini yellow mosaic virus*, ZYMV) karşı bazı bitki aktivatörlerinin etkisi belirlenmeye çalışılmıştır. Ankara'da 2010 yılında yapılan surveyler sonucunda ZYMV, DAS-ELISA yöntemi ile hastalık belirtilerini gösteren bal kabaklarında saptanmıştır. Çalışmada Kazan ilçesi bal kabaklarından izole edilen ZYMV izolatu (ZYMV K19) kullanılmıştır.

Çalışmada acibenzolar-s-methyl (Actigard) ve ISR-2000 bitki aktivatörlerinin değişik dozlarda kontrollü sera koşullarında ZYMV'nin sebep olduğu hastalığa karşı etkinlikleri belirlenmiştir. Bal kabakları Actigard ve ISR-2000 uygulandıktan 72 ve 96 saat sonra ZYMV ile enfekte edilmiştir. Bu bitkiler kontrol bitkilerine göre semptom çıkış süresi, bitki boyu ve yaprak genişliği bakımından bitki çiçeklenme aşamasına gelene kadar takip edilmiş ve elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Actigard 1.5 mg/80 ml, 3 mg/80 ml, 6 mg/80 ml, 8 mg/80 ml, 12 mg/80 ml ve 16 mg/80 ml dozlarında uygulanmış ve 6 mg/80 ml ve 8 mg/80 ml dozları virüs semptomlarını 5-21 gün geciktirmiştir. ISR-2000 ise denenen konsantrasyonlarda virüs semptomları üzerine olumlu ya da olumsuz bir etkiye bulunmamış, ancak bitki gelişimi üzerine olumlu etki yaratmıştır.

Aktivatör uygulanan bitkilerde teşvik edilmiş dayanıklılıktan dolayı meydana gelen lignin sentezi ile H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (hidrojenperoksit) birikimi yapılan histokimyasal boyamalar ile değerlendirilmiştir. ISR 2000 bal kabaklarında lignin oluşumunu Actigard' a göre daha çok, Actigard ise H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oluşumunu ISR 2000'e göre daha çok teşvik etmiştir.

**Temmuz 2011, 45 sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** ZYMV, bitki aktivatörleri, ELISA, kavun, histokimyasal boyama

## ABSTRACT

Master Thesis

### DETERMINATION OF EFFECTS OF SOME PLANT ACTIVATORS TO ZUCCHINI YELLOW MOSAIC *POTYVIRUS* IN PUMPKINS

Ahmad HEKMAT KASHTBAN

Ankara University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Plant Pathology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. İ. Özer ELİBÜYÜK

In this study, the effects of some plant activators against *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) in pumpkins were determined. In the results of surveys conducted in Ankara in 2010, ZYMV was detected in symptomatic pumpkins by DAS-ELISA tests. In the study, ZYMV was isolated from the pumpkins in Kazan district of Ankara.

The plant activators acibenzolar s-methyl (Actigard) and ISR-2000 were used in this study. Effects of the activators were determined under controlled greenhouse conditions in respect to their different concentrations. Pumpkin seedlings were treated by acibenzolar s-methyl and ISR-2000 and then the treated pumpkins were inoculated by ZYMV 72 and 96 h after activator treatments. Both of ZYMV infected and control plants, in respect to symptom expression time, plants lengths and leaf width up to the plants flowering period were monitored. The data analyzed by using statistical methods. Actigard was sprayed on pumpkins at doses of 1.5 mg/80 ml, 3 mg/80 ml, 6 mg/80 ml, 8 mg/80 ml, 12 mg/80 ml, and 16 mg/80 ml. The doses of 6 mg/80 ml ve 8 mg/80 ml were delayed ZYMV symptoms for 5-21 days by comparing to positive controls. However, ISR-2000 was not affected the symptom expression in the treated concentrations while it positively affected the plant growth.

Histochemical staining was applied to determine lignification and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in the plants due to systemic inducing resistance triggered by the activators. ISR 2000 induced high degree of lignification than Actigard. However, Actigard stimulated high levels of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production than ISR 2000.

**July 2011, 45pages**

**Key Words:** ZYMV, plant activators, ELISA, pumpkin, histochemical staining

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmasının yapılması sürecinde yardımlarını esirgemeyen ve çalışmalarımı titizlikle yönlendiren Danışman Hocam Doç. Dr. İ. Özer ELİBÜYÜK’eteşekkür ederim. Ayrıca çalışmalarım sırasında yakın ilgi ve desteğini gördüğüm Dr. Mine GÜL ŞEKER’e ve çalışmalarımızda kullandığımız sera bölmesini bize sağlayan Prof. Dr. M. Oktay GÜRKAN’a da teşekkür ederim.

Ahmad HEKMAT KASHTBAN

ANKARA, Temmuz 2011

## İÇİNDEKİLER

|                                                                                             |      |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| ÖZET.....                                                                                   | i    |
| ABSTRACT .....                                                                              | ii   |
| TEŞEKKÜR .....                                                                              | iii  |
| SİMGELER DİZİNİ .....                                                                       | vi   |
| ŞEKİLLER DİZİNİ .....                                                                       | vii  |
| ÇİZELGELER DİZİNİ .....                                                                     | viii |
| 1.GİRİŞ .....                                                                               | 1    |
| 2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR .....                                                                   | 4    |
| 2.1 Yurt Dışında Yapılan Çalışmalar .....                                                   | 4    |
| 2.2 Türkiye’de Yapılan Çalışmalar .....                                                     | 7    |
| 3. MATERYAL VE METOD .....                                                                  | 8    |
| 3.1 Materyal .....                                                                          | 8    |
| 3.1.1 Çalışma materyali hakkında bilgiler .....                                             | 8    |
| 3.1.2 Serolojik çalışmalarda kullanılan materyal .....                                      | 9    |
| 3.1.3 Mekanik inokulasyon çalışmalarında kullanılan materyal .....                          | 9    |
| 3.1.4 Dayanıklılığın uyarılması çalışmalarında kullanılan materyal .....                    | 9    |
| 3.1.5 Histokimyasal boyama çalışmalarında kullanılan materyal .....                         | 11   |
| 3.2 Metod .....                                                                             | 11   |
| 3.2.1 Bitki örneklerinin toplanması ve muhafazası .....                                     | 12   |
| 3.2.2 Mekanik inokulasyon yöntemi .....                                                     | 12   |
| 3.2.2.1 Mekanik inokulasyon çalışmaları .....                                               | 12   |
| 3.2.3 Serolojik çalışmalar .....                                                            | 13   |
| 3.2.3.1 DAS-ELISA testi .....                                                               | 13   |
| 3.2.4 Saksı denemeleri .....                                                                | 14   |
| 3.2.5 Histokimyasal boyamalarla lignin sentezinin belirlenmesi .....                        | 18   |
| 3.2.6 Histokimyasal boyamalarla h <sub>2</sub> O <sub>2</sub> sentezinin belirlenmesi ..... | 19   |
| 4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA .....                                                    | 20   |
| 4.1 ZYMV ile Bulaşık Bitkilerin Belirlenmesi .....                                          | 20   |
| 4.2 ELISA Testleri .....                                                                    | 20   |
| 4.3 Dayanıklılığın Uyarılması Çalışmaları .....                                             | 20   |
| 4.3.1 Saksı denemeleri .....                                                                | 20   |
| 4.4 İstatiksel Analizler .....                                                              | 22   |
| 4.4.1. Actigard’ın fitotoksiteye neden olan dozlarının belirlenmesi .....                   | 22   |
| 4.4.2 Actigard’ın simptom çıkış süresi üzerinde etkisi .....                                | 23   |
| 4.4.3 Actigard’ın bitki boyu üzerinde etkisi .....                                          | 24   |
| 4.4.4 Actigard’ın yaprak genişliği üzerinde etkisi .....                                    | 26   |
| 4.5 ISR-2000’in Simptom Çıkış Süresi Üzerinde Etkisi .....                                  | 27   |
| 5. HİSTOKİMYASAL BOYAMALARLA LİGNİN SENTEZİNİN<br>BELİRLENMESİ .....                        | 28   |
| 6. HİSTOKİMYASAL BOYAMALARLA H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> SENTEZİNİN<br>BELİRLENMESİ ..... | 30   |
| 7. TARTIŞMA .....                                                                           | 34   |

|                                  |           |
|----------------------------------|-----------|
| <b>8. SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b> | <b>37</b> |
| <b>KAYNAKLAR .....</b>           | <b>39</b> |
| <b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>             | <b>45</b> |

## SİMGELER DİZİNİ

|                               |                                                           |
|-------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| A0                            | Doz 0 kontrol                                             |
| A1                            | Actigard doz 1                                            |
| A2                            | Actigard doz 2                                            |
| A3                            | Actigard doz 2                                            |
| A4                            | Actigard doz 3                                            |
| A5                            | Actigard doz 4                                            |
| A6                            | Actigard doz 5                                            |
| µl                            | Mikrolitre                                                |
| CMV                           | Cucumber Mosaic Virus                                     |
| DAB                           | 3,3'-diaminobenzidine                                     |
| ELISA                         | Enzyme-Linked Immunosorbent Assay                         |
| g                             | Gram                                                      |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | Hidrojen Peroksit                                         |
| ISR                           | Uyarılmış Sistemik Dayanıklılık                           |
| kDa                           | Kilo Dalton                                               |
| l                             | Litre                                                     |
| M                             | Molar                                                     |
| mg                            | Miligram                                                  |
| ml                            | Mililitre                                                 |
| mM                            | Milimolar                                                 |
| nm                            | Nanometre                                                 |
| PBS                           | Tuzlu fosfat tamponu                                      |
| PRSV                          | Papaya Ring Spot Virus                                    |
| RNA                           | Ribonükleik asit                                          |
| RdRp                          | RNA dependent RNA polymerase (RNA'ya bağlı RNA polimeraz) |
| SKD                           | Sistemik Kazandırılmış Dayanıklılık                       |
| SqMV                          | Squash Mosaic Virus                                       |
| TMV                           | Tobacco Mosaic Virus                                      |
| T1                            | Süre 1 (72 saat)                                          |
| T2                            | Süre 2 (96 saat)                                          |
| V-                            | Virüssüz                                                  |
| V+                            | Virüslü                                                   |
| W/V                           | Ağırlık/Hacim                                             |
| WMV                           | Watermelon Mosaic Virus                                   |
| ZYMV                          | Zucchini Yellow Mosaic Virus                              |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|                                                                                                                                                                                                  |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 3.1 Şiddetli mozaik, damar bantlaşması ve şekil bozukluğu gösteren bal kabağı yaprakları .....                                                                                             | 8  |
| Şekil 3.2 Çalışmada izlenen yollar .....                                                                                                                                                         | 11 |
| Şekil 3.3 Seradaki deneme düzeni .....                                                                                                                                                           | 15 |
| Şekil 3.4 Aktivatör uygulamalarında kullanılan deneme planı .....                                                                                                                                | 16 |
| Şekil 3.5 ön denemelerde kullanılan dozlarda bitki boyunun kısalması, kuruma ve ölüm şeklinde görülen fitotoksite .....                                                                          | 17 |
| Şekil 4.1 Actigard'ın bal kabağı yapraklarında damarların etrafının koyu yeşil bir durum alması, yaprakların yukarı doğru kıvrılması şeklinde sebep olduğu fitotoksite .....                     | 21 |
| Şekil 4.2 Bal kabağı yapraklarında mozaik, kabarcıklaşma ve damar bantlaşması şeklinde ZYMV belirtileri .....                                                                                    | 24 |
| Şekil 4.3 Actigard dozlarının ve sürelerinin bitki boyu üzerinde etkisi soldan sağa doğru doz 4, doz 3, doz 2. ....                                                                              | 25 |
| Şekil 4.4 Actigard'ın yaprak genişliği üzerinde etkisi (soldaki kontrol bitkisi) .....                                                                                                           | 27 |
| Şekil 5.1 A- ISR-2000 uygulanmış bitki örneklerinde lignifikasyon. Kök (1), gövde (2), yaprak (3). B- Actigard uygulanmış bitki örneklerinde lignifikasyon. Kök (1), gövde (2), yaprak (3) ..... | 29 |
| Şekil 6.1 Yaprakta H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> birikimi (Actigard 96 saat) .....                                                                                                               | 31 |
| Şekil 6.2 Yaprakta H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> birikimi (Actigard 72 saat) .....                                                                                                               | 32 |
| Şekil 6.3 Yaprakta H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> birikimi (ISR-2000 96 saat) .....                                                                                                               | 32 |
| Şekil 6.4 Yaprakta H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> birikimi (ISR-2000 72 saat) .....                                                                                                               | 33 |
| Şekil 6.5 Yaprakta H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> birikimi (kontrol bitkilerinde) .....                                                                                                           | 33 |

## ÇİZELGELER DİZİNİ

|                                                                                                         |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Çizelge 3.1 ABD’de Actigard’ın ruhsatlı olduğu hastalık ve hastalık etmenleri.....                      | 10 |
| Çizelge 3.2 ISR-2000 uygulamasında kullanılan dozlar .....                                              | 18 |
| Çizelge 3.3 Actigard uygulamasında kullanılan dozlar .....                                              | 18 |
| Çizelge 4.1 ASM uygulanan bitkilerde mekanik inokulasyon sonucu simptom gösteren bitki oranı.....       | 21 |
| Çizelge 4.2 Actigard’ın farklı dozlarının bal kabağı bitkilerindeki olum oranına etkisi .....           | 22 |
| Çizelge 4.3 Actigard’ın farklı doz ve uygulama zamanlarının simptom çıkış süresi üzerine etkileri ..... | 23 |
| Çizelge 4.4 Actigard’ın farklı doz ve uygulama zamanlarının bitki boyu üzerinde etkileri.....           | 25 |
| Çizelge 4.5 Actigard’ın farklı doz ve uygulama zamanlarının yaprak genişliği üzerinde etkileri .....    | 26 |

## 1. GİRİŞ

Türkiye’de yaklaşık 790.000 hektar sebze üretim alanı bulunmakta ve bu alanda 22 milyon ton düzeyinde sebze üretilmektedir. Kabakgiller (kavun, karpuz, hıyar ve kabak) toplam sebze üretiminde % 33’lük bir paya sahip bulunmaktadır (TUİK 2010). Bunlardan bal kabakları (*Cucurbita moschata* Duch.), Türkiye’de önemli kabakgil sebze türlerinden birisidir (Balkayavd. 2010). TUİK (2010) verilerine göre Türkiye’de 2010 yılında 89368 ton bal kabağı üretilmiş, bunun 9447 tonu yalnızca Ankara iline aittir. Bu üretimi ile Ankara Türkiye bal kabağı üretiminin yaklaşık % 10.6’sını tek başına karşılamakta ve Türkiye bal kabağı üretiminde ilk sırada yer almaktadır.

Kabakgiller pek çok virüs hastalığına konukçuluk etmekte ve bu ürünlerde önemli düzeylerde ürün kayıpları meydana gelmektedir. Dünya’da kabakgiller (Cucurbitaceae) familyası içindeki bitki türlerinde zarar yapan ve ekonomik kayıplara neden olan çok sayıda virüs hastalığı bulunmaktadır (Zitter vd. 1996). Dünyada kabakgillerde zararlı 32 adet virüs ve virüs benzeri hastalık etmeni rapor edilmiştir. Bunlar içerisinde Kabak Sarı Mozaik Virüsü (Zucchini yellow mosaic virus, ZYMV), Hıyar mozaik virüsü (Cucumber mosaic virus, CMV), Kabak mozaik virüsü (Squash mosaic virus, SqMV), Karpuz mozaik virüsü II (Watermelon mosaic virus II, WMV II), Papaya halkalı leke virüsü (Papaya ring spot virus, PRSV) kabakgillere zarar veren önemli virüslerden bazılarıdır (Lisa ve Lecoq 1984).

Türkiye’de kabakgil yetiştirme alanlarında bulunan en önemli virüslerin ZYMV, CMV, PRSV, WMV2 ve kabakgil afitle taşınan sarılık virüsü (Cucurbit aphid-borne yellows virus, CABYV) olduğu bildirilmektedir. Bunlardan özellikle ZYMV yaygınlığı ve zararı ile yurdumuzda kabakgillerin önemli viral problemlerinden biri olarak karşımıza çıkmaktadır (Nogay 1983, Ertunç 1992, Yılmaz vd. 1992, Çıtır vd. 1998, Şevik ve Sökmen 2001).

ZYMV, ilk olarak İtalya’da 1981 yılında saptanmış (Lisa vd., 1981) ve daha sonra diğer birçok ülkede de rapor edilmiştir (Nameth vd. 1983, Lesemann vd. 1984, Lisa ve

Lecoq1984, Davis 1986, Dolores ve Valdez 1988). Türkiye’de ise ZYMV 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 vd. 1992, Yılmaz vd. 1994).

ZYMV *Potyviriidae* familyasından *Potyvirus* cinsinden, kıvrılabilir ipliksi partiküllü, 750x11 nm boyutlarında bir virüstür. Virüs genomu tek parçalı, pozitif anlamlı tek sarmallı RNA’dan ibarettir. Genom 9000 nükleotidden meydana gelmekte olup partikül ağırlığının ancak % 4.5-7’sini oluşturmaktadır. Virüs *Aphis gossypii* ve *Myzus persicae* gibi bazı yaprak bitlerince non persistent olarak ve mekanik şekilde taşınmaktadır (ICTVdB Management 2006).

ZYMV tüm kabakgillerde bitki gelişiminde gerilemeye, yapraklarda mozaik lekeler, bükülme ve şekil bozukluklarına, damar bantlaşmalarına, meyvelerde de mozaik, küçülme ve şekil bozukluklarına sebep olmaktadır (Anonim 2008).

Bitki virüs hastalıkları ile mücadelede kültürel önlemler, fiziksel önlemler, vektörlerle mücadele, dayanıklı çeşit kullanımı, karantina önlemleri gibi çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Ayrıca bitkinin doğal savunma mekanizmasının uyarılması esasına dayanan “Sistemik Kazandırılmış Dayanıklılık (SKD) yaklaşımı da özellikle fungal ve bakteriyel hastalık etmenlerine karşı uygulanmaktadır. Son zamanlarda ise bu yaklaşım viral hastalıklar için de kullanılmaya başlanmıştır. Günümüze kadar bitki aktivatörlerinin Tobacco mosaic virus (TMV, Tütün mozaik virüsü), CMV, ZYMV,(Hiroki ve Takahide 2003) Tomato yellow leaf curl virüs (Domates sarı yaprak kıvrıcıklığı, TYLCV)(Fanigliulo vd. 2009), Beet soil borne virüs (Şeker pancarı toprakla taşınan virüs, BSBV), Beet necrotic yellow vein virüs (Şeker pancarı nekrotik sarı damar virüsü, BNYVV)(Mouhanna vd. 2003), Tomato mosaic virüs (Domates mozaik virüsü, ToMV) (Madhusudhan vd. 2008) , Tomato spotted wilt virus (TSWV, Domates lekeli solgunluk virüsü) (Mandal vd. 2001) ve değişik *Potyvirus*’ların (Mejia vd. 2009) enfeksiyonu ve hastalık şiddetine etkisi bazan diğer

bazı kültürel uygulamalarla da kıyaslanarak araştırılmıştır (Smith-Becker vd. 2003, Momol vd. 2004).

Sistemik kazanılmış dayanıklılık bitkinin bir patojen enfeksiyonuna karşı uzun süreli, pek çok patojene karşı ve sonra gelebilecek enfeksiyonlara karşı sistemik bir dayanıklılık göstermesi reaksiyonudur. SKD fizyolojik bariyerler gibi mevcut dayanıklılık mekanizmalarından farklı olarak fitoaleksinin biyosentezi, aşırı duyarlılık (hipersensitif) reaksiyonu gibi teşvik edilebilir dayanıklılık mekanizmalarından kaynaklanmaktadır. Bunlardan başka SKD bitkide yaralanma veya ozmotik streslerden kaynaklanan tepkilerle ilgili değildir (Ryals vd. 1996).

Bitki aktivatörleri de hastalık etmenlerinin enfeksiyonunu engelleyen veya yavaşlatan doğal ve/veya sentetik kimyasal maddelerdir. Bazı bitki aktivatörleri ürünün kalitesini ve kantitesini de artırmaktadır. Günümüzde KSD'yi teşvik etmek için bitkilerde bakteri proteinleri, maya özütleri, acibenzolar-s-methyl, UV ışık,  $\beta$ -amino butyric asit (BABA), salisilik asit, benzothiadiazole gibi biyotik ve abiyotik uyarıcılar kullanılmaktadır. Bu maddelerin uyarısı sonucu bitkide SKD harekete geçirilmekte aşırı duyarlılık reaksiyonu, ligninleşme, papilla oluşumu, patojen ile bağlantılı proteinlerin (PR) sentezi, fitoaleksinlerin sentezi şeklinde değişik savunma mekanizmaları harekete geçirilmektedir (Ryals vd. 1996, Herman vd. 2008 ).

Yapılan bu tez çalışmasında, Actigard (acibenzolar- s-methyl) ve ISR-2000 gibi bitkilerde hastalıklara karşı dayanıklılığı ve bitkinin gelişmesini teşvik eden aktivatörlerin balkabakları üzerinde ZYMV enfeksiyonu, simptom çıkışı ve hastalık oranı üzerine etkisi araştırılmıştır.

## **2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR**

### **2.1 Yurt Dışında Yapılan Çalışmalar**

Momol vd. (2000), yaptıkları çalışmada Actigard (ASM) ve insektisitlerin TSWV enfeksiyonunu % 76'ya varan oranda azalttığını bulmuşlardır.

Pappu vd. (2000a), ASM'nin ve imidacloprid etkili maddeli insektisit TSWV'ye karşı etkisini değerlendirdikleri çalışmada bütün uygulamaların TSWV'nin enfeksiyonunu azalttığını kaydetmişlerdir.

Pappu vd. (2000b), Gürcistan'da yaptıkları çalışmada tütünlerde ASM (Actigard) ve imidacloprid uygulamalarının TSWV'den kaynaklanan hastalık oranını azalttığını bulmuşlardır.

Csinos vd. (2001), tütünde ASM'nin tek başına ve imidacloprid ile olan uygulamalarının TSWV enfeksiyonunu azalttığını rapor etmişlerdir.

Mandal vd. (2001), tarafından yürütülen bir çalışmada, ASM ve/veya imidacloprid uygulamasının tarla koşulları altında TSWV enfeksiyonunu önemli ölçüde azalttığı görülmüştür.

ASM'nin hıyarlarda CMV enfeksiyon oranını azalttığı ve bitkilerde simptom çıkışını da geciktirdiği gözlemlenmiştir (Hiroki ve Takahide 2003).

Hiroki ve Takahide (2003), hıyarlarda CMV tütünlerde TMV simptomlarının ASM uygulamasıyla geciktirildiğini ifade etmişlerdir

Mouhanna vd. (2003), ASM ile yaptıkları denemede şeker pancarlarında Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) ve Beet soil borne virus (BSBV) enfeksiyonunu azalttığını kaydetmişlerdir.

ABD Virginia'da yetiştirilen tütünlerde potansiyel olarak önemli bir hastalık etmeni olan TSWV'ye karşı Actigard ve Admire uygulaması yapılmıştır. Tütün gelişim ve büyümesinde Actigard, Admire yada her ikisinin kullanımı sonucunda TSWV'nin zararının azaltılabileceği az da olsa gözlenmiştir (Reed vd. 2003).

Cantaloupe kavunlarında CMV'ye karşı acibenzolar-s-methyl (ASM) kullanılarak dayanıklılık kazandırma çalışmasında özellikle genç yapraklarda viral belirtilerin azaldığı, symptom çıkışının da geciktiği görülmüştür (Smith-Becker vd. 2003).

Csinos vd. (2004a), tütünlerde Actigard + imidacloprid uygulamasının TSWV'den kaynaklanan hastalığı azalttığını ve verimi de artırdığını bildirmişlerdir.

Csinos vd. (2004b), ASM + imidacloprid uygulamasının tütünde TSWV enfeksiyonunu % 8- 45 oranında azalttığını ortaya koymuşlardır.

Momol vd. (2004), yaptıkları çalışmada UV yansıtıcı malç, ASM ve bazı insektisitlerin TSWV'nin sebep olduğu hastalık ve bu virüsü taşıyan çiçek tripslerinin popülasyon dinamikleri üzerine etkilerini incelemişler ve UV yansıtıcı malçların trips kolonizasyonunun üzerine siyah polietilen örtülerden daha etkili olduğunu, acibenzolar s-methyl'in hastalık baskısının yoğun olduğu bölgede TSWV enfeksiyonunu azalttığını ve UV yansıtıcı malç, acibenzolar s-methyl ve insektisit uygulamalarının birlikte kullanımının TSWV enfeksiyonu azaltmada oldukça etkili olduğunu ortaya koymuşlardır.

Tütün bitkisi üzerinde ilk yapraklı dönem ile kotiledon döneminde bitkiaktivatörü ASM uygulamasının yaprak biti popülasyonunu azaltma ve TSWV enfeksiyonunu düşürmedeki rolünün araştırıldığı bir çalışmada, Actigard, imidacloprid (Admire) ve bu ikisinin kombinasyonu thrips popülasyonlarını az miktarda etkilemiştir. Actigard ve Admire

uygulamaları TSWV simptomlu bitki oranını belirgin bir şekilde azaltmıştır. TSWV simptomlarının azalmasında Actigard'ın tek başına uygulanmasından çok Actigard ve Admire kombinasyonunun uygulanması daha iyi sonuç vermiştir (Mcpherson vd. 2005). Tütün bitkisinde ASM (Actigard) + insektisit uygulamasının TSWV enfeksiyonunu azalttığı bildirilmiştir (Blackley vd. 2004, Mcpherson vd. 2004, Johnson 2006).

TMV ve ToMV enfeksiyondan önce ASM uygulanmış *Nicotiana glutinosa*'da lokal lekeler kontrole göre sırasıyla % 67-79, lokal leke büyüklüğü de % 46-50 oranında azalmıştır. ASM biberlerde TMV'den kaynaklanan lokal leke sayısını % 68, lokal leke büyüklüğünü % 37 oranında düşürmüştür. ASM uygulanmış domateslerde ToMV'den kaynaklanan lokal leke sayısı da benzer şekilde % 66, lokal leke büyüklüğü de % 39 oranında düşmüştür (Madhusudhan vd. 2008).

Nischwitz vd. (2008), TSWV enfeksiyonuna karşı tütünlerde gerçekleştirdikleri çalışmada ASM'nin virüs enfeksiyonunu azalttığını bildirmişlerdir.

Parkunan vd. (2008), ASM'nin Amerikan tütünlerde bitki boyunu kısalttığını bildirmişlerdir.

Fanigliulo vd. (2009), ASM'nin domateslerde Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) enfeksiyonunu azalttığını kaydetmişlerdir.

Sirigu ve Nannini (2009), domateslerde ASM'nin TYLCV simptomlarını geciktirdiğini rapor etmişlerdir.

Mejia vd. (2009), domateslerde *Potyvirus* enfeksiyonuna karşı ASM uygulamalarıyla simptomların geciktiğini ve hastalık şiddetinde azalma gördüklerini bildirmişlerdir.

## 2.2 Türkiye’de Yapılan Çalışmalar

Türkiye’de aktivatörlerin virüsler de dahil olmak üzere bitki hastalık etmenlerine karşı etkileri ile ilgili az sayıda çalışma bulunmaktadır.

Yoğun kabakgil üretimi yapılan bölgelerde 1992 yılında yapılan bir survey çalışmasında, en yaygın virüsün ZYMV olduğu gözlenmiş, bütün bölgelerde ve türlerde önemli boyutlarda nitel ve nicel zararlar yaptığı belirlenmiştir (Yılmaz vd. 1992).

Yılmaz vd. (1994), GAP Bölgesinde kabakgil familyasına ait bitkilerde ZYMV’nin ciddi problem olduğunu bildirmişlerdir. Adıyaman ilinde örtü altı yetiştiriciliğinde, hıyarlarda ZYMV enfeksiyon oranı % 26.92 olarak tespit edilmiştir (Güldür 2001).

ZYMV’ye karşı kabak bitkilerinde ASM ve ISR-2000 uygulamalarında simptom çıkış süresinde gecikme gözlenmiştir (Çalışkan ve Kamberoğlu 2007).

ASM’nin CMV’ye karşı etkinliğinin ortaya konulması amacı ile tütün bitkileri (*Nicotiana tabacum* ‘‘Samsun’’ ve *Nicotiana rustica*) ele alınmış ve tütünlerde CMV simptom çıkış zamanında gecikme gözlenmiş, enfeksiyon şiddeti ve simptom tipinde herhangi bir farklılık olmamıştır (Çalışkan ve Kamberoğlu 2009).

### 3. MATERYAL VE METOD

#### 3.1 Materyal

##### 3.1.1 Çalışma materyali hakkında bilgiler

Bu tez çalışmasında kullanılan ZYMV inokulumu (ZYMV K19) 2010 yılında Ayaş, Beypazarı ve Kazan ilçelerinde yapılan surveyler sonucu Ankara' nın Kazan ilçesinde şiddetli hastalık belirtileri gösteren bal kabaklarından (Şekil 3.1) izole edilmiştir. Laboratuar çalışmaları Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Fitopatoloji Anabilim Dalı Fitopatolojilaboratuarında, bitkilerle ilgili çalışmalar da yine kontrollü bölüm serasında yürütülmüştür.



Şekil 3.1 Şiddetli mozaik, damar bantlaşması ve şekil bozukluğu gösteren bal kabağı yaprakları

### **3.1.2 Serolojik çalışmalarda kullanılan materyal**

Serolojik alışmalarda DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich ELISA), arazide ZYMV ile bulaşık olduğundan şüphelenilen bal kabağı yaprakları bitkisel materyal olarak kullanılmıştır. ELISA'da ZYMV, CMV, PRSV, WMV ve SqMV antiserumları, ELISA tabakaları, mikropipetler, pipet uçları, tampon solüsyonlar, havan ve havaneli ve ELISA okuyucusu materyal olarak kullanılmıştır.

### **3.1.3 Mekanik inokulasyon çalışmalarında kullanılan materyal**

Mekanik inokulasyon çalışmalarında, araziden toplanan ve ELISA testleri sonucunda ZYMV ile bulaşık olduğu saptanan bal kabaklarından alınan yapraklar materyal olarak kullanılmıştır. Saksı çalışmalarında kullanılan ve farklı bitki aktivatörlerinin uygulandığı kabak bitkileri üzerine ZYMV'nin bulaştırılması amacıyla mekanik inokulasyonlar yapılmıştır. Çalışmada kullanılan bitkilere yapılan mekanik inokulasyon çalışmalarında, havan ve havaneli, cam spatül, fosfat tampon çözeltisi ve selit (celite) kullanılmıştır. Mekanik inokulasyon çalışmalarında kullanılan bal kabaklarının tohumlarının ekilmesi ve fidelerin yetiştirilmesi için kum, toprak ve torf karışımı (1:1:1) ve plastik saksılar da diğer materyalleri oluşturmuştur.

### **3.1.4 Dayanıklılığın uyarılması çalışmalarında kullanılan materyal**

Sera koşullarında yapılan dayanıklılığın uyarılması çalışmalarında, ISR-2000 ve Actigard olmak üzere iki farklı bitki aktivatörü, serolojik tanısı yapılmış ZYMV K19 izolatu ile balkabağı bitkileri materyal olarak kullanılmıştır.

Acibenzolar-s-methyl(ASM) piyasada Bion % 5 WP ve Actigard 50WG (Syngenta) ticari isimleriyle satılmakta olup Actigard Türkiye'de ruhsatlı değildir. Bion Avrupa ve Türkiye'de ruhsatlıdır. ISR-2000 ise sistemik kazandırılmış dayanıklılık ajanı olarak piyasaya sunulmuştur. ASM benzo-thiadiazol (BTH) gurubundan benzo [1,2,3] thiadiazol-7- carbo

thioicacid–s-methyl ester etkili maddeli bir kimyasaldır. Actigard salisilik asitin sentetik bir analogu olup pek çok üründe dayanıklılığı 4 gün içerisinde uyarmaktadır. Bu dayanıklılık değişik ürünlerde pek çok fungus, bakteri ve virüse karşı gelişmektedir. Actigard bitki koruma ürünü olarak ABD’de aşağıdaki hastalıklara karşı ruhsatludur (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1 ABD’de Actigard’ın ruhsatlı olduğu hastalık ve hastalık etmenleri

| Ürün                        | Etmen                                                | Hastalık                      |
|-----------------------------|------------------------------------------------------|-------------------------------|
| Acı biber                   | <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> | Bakteriyel leke               |
|                             | <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>        | Bakteriyel benek              |
| Brassicaceae (Lahanagiller) | <i>Peronospora parasitica</i>                        | Mildiyö                       |
|                             | <i>Xanthomonas campestris</i>                        | Siyah damar çürüklüğü         |
| Cucurbitaceae (Kabakgiller) | <i>Pseudoperonospora cubensis</i>                    | Yalancı mildiyö               |
|                             | <i>Sphaerotheca fuliginea</i>                        | Külleme                       |
|                             | <i>Erysiphe cichoracearum</i>                        |                               |
|                             | <i>Cladosporium cucumerinum</i>                      | Uyuz                          |
|                             | <i>Acidovorax avenae</i> pv. <i>citrulli</i>         | Bakteriyel meyve lekesi       |
|                             | <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>cucurbitae</i>  | Bakteriyel yaprak lekesi      |
|                             | <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lachrymans</i>    | Köşeli yaprak lekesi          |
| Marul                       | <i>Bremia lactucae</i>                               | Mildiyö                       |
| Soğan                       | <i>Peronospora destructor</i>                        | Mildiyö                       |
|                             | Iris yellow spot virus                               | Iris sarıleke virus hastalığı |
|                             | <i>Xanthomonas axonopodi</i> pv. <i>allii</i>        | Yaprak yanıklığı              |
| İspanak                     | <i>Peronospora tabacina</i>                          | Mildiyö                       |

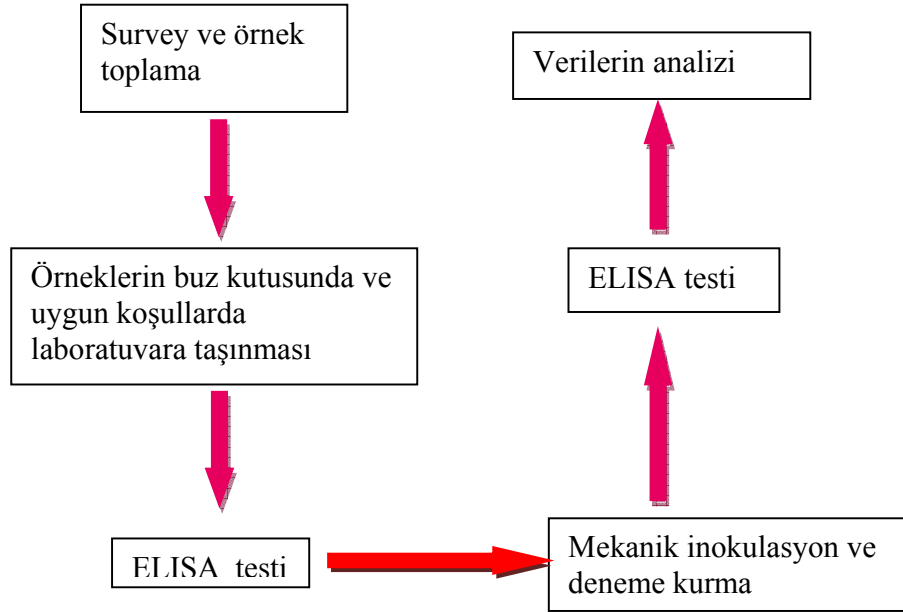
Bu çalışmada kullanılan aktivatör olan ISR-2000 ise biyolojik, organik ve doğal ekstraktlar formülasyonundan oluşan yeni bir üründür; etkili maddesi *Lactobacillus acidophilus*, maya ekstraktı, bitki ekstraktı ve benzoik asitten ibarettir.

### 3.1.5 Histokimyasal boyama çalışmalarında kullanılan materyal

Histokimyasal boyama çalışmalarında, ISR–2000 ve Actigard olmak üzere iki farklı bitki aktivatörü uygulanarak yapılan saksı denemeleri sonunda, dayanıklılığın uyarıldığı bal kabaklarından alınan kök, gövde ve yaprak parçaları ile cam şişeler, steril bistüri, pens, DAB (diaminobenzidine) boyama seti, phloroglucinol, chloralhydrate, metanol, saf su ve faz kontrast, ışık mikroskobu ile binoküler materyal olarak kullanılmıştır.

### 3.2 Metod

Bu çalışmada kullanılan ve ZYMV izolatu olarak saptanan ve tanınması ile dayanıklılığın uyarılması çalışmalarında izlenen yollarşekil 3.2’ de verilmiştir.



Şekil 3.2 Çalışmada izlenen yollar

### **3.2.1 Bitki örneklerinin toplanması ve muhafazası**

Çalışmada kullanılan ZYMV izolatının elde edilmesi amacıyla, Ankarakazan ilçesinden yapılan arazi çıkışlarında, simptomatolojik olarak ZYMV ile bulaşık olduğundan şüphelenilen kabakgıl bitkilerinden sap, gövde, yaprak ve meyve örnekleri alınmış ve kağıt torbalara konulmuştur (Araziden toplam 50 örnek toplanmıştır). Torbalar numaralandırılarak buz kutusu içerisinde uygun koşullarda laboratuara getirilmiş ve yapılacak olan çalışmalarda kullanılıncaya kadar, 4- 7 gün gibi kısa bir süre için 4°C’ de, daha uzun bir süre için ise, -20°C’ de muhafaza edilmiştir. Arazi çıkışları, 2010 yılında Temmuz-Eylül aylarındayapılmıştır. Sera koşullarında, ZYMV ile bulaşık olan bitkilerin belirlenmesi amacıyla öncelikle simptomatolojik gözlemler yapılmıştır. Örnek alınan bitkilerde, ZYMV’nin neden olduğu yaprak ve meyvelerde deformasyon, mozaik, damar bantlaşması, genç sürgünlerde iplikleşme gibi simptomlar aranmıştır. ZYMV tarafından oluşturulan bu simptomları gösteren bal kabağı yaprakları çalışmada kullanılmıştır.

### **3.2.2 Mekanik inokulasyon yöntemi**

#### **3.2.2.1 Mekanik inokulasyon çalışmaları**

- ELISA testleri sonucunda ZYMV ile bulaşık olduğu saptanan bitkilerden elde edilen ZYMV izolatının serolojik tanısı,
- Saksı denemelerinde kullanılan ZYMV ile bulaşık yeterli miktarda bitki dokusunun elde edilmesi,
- Saksı çalışmalarında bitki aktivatörü uygulanan kabak bitkilerine ZYMV’nin bulaştırılması Smith ve Becker’e (2003) göre aşağıdaki şekilde yapılmıştır.

ZYMV ile bulaşık bitkilerden alınan bitki dokuları 0.02 M fosfat tampon çözeltisi (pH 7.0) içeren steril porselen havanda ezilmiş ve bitki özsuğu daha önceden selit serpilmiş test bitkilerinin yapraklarına mekanik olarak inokule edilmiş, sonra inokule edilen yapraklar çeşme suyu ile yıkanmıştır.

### 3.2.3 Serolojik alışmalar

Serolojik alışmalarda;

- Arazi çıkışlarında toplanan ve simptomatolojik olarak ZYMV ile bulaşık olduğundan şüphelenilen kabakgil bitkileri (50 rnek),
- Mekanik inokulasyon çalışmaları sonunda simptom gözlenen bitkiler,
- Saksı denemelerinde bitki aktivatörlerinin uygulandığı bal kabakları,
- Denemenin sonunda simptom gözlenen bal kabakları DAS-ELISA yöntemi ile testlenmiştir.

#### 3.2.3.1 DAS-ELISA testi

Simptomatolojik bakımdan ZYMV simptomlarına benzeyen bitki yaprakları DAS-ELISA yöntemiyle testlenmiş, daha sonra testlenecek olanlar ise buzdolabında 4<sup>0</sup>C'de veya derin dondurucuda -20<sup>0</sup>C'de muhafaza edilmiştir. DAS-ELISA yöntemi (Clark ve Adams 1977)'e göre aşağıdaki şekilde yapılmıştır.

1. Virüs IgG'leri antiserumların satın alındığı firmanın belirttiği yönteme göre, pH 9.6 kaplama tamponu ile sulandırılmış (1/1000 v/v) ve ELISA tabakalarının (plate) her bir çukuruna 100 l konularak tabakaların üzeri kapatılmış ve 37<sup>0</sup>C'de 4 saat inkübe edilmiştir.
2. İnkübasyondan sonra yıkama tamponu ile tüm çukurlar 3'er dakikadan üç kez yıkanmıştır.
3. rnek tamponu ile 1/20 (w/v) oranında havan ve havaneli yardımıyla ezilmiş örneklerinin özsuları tabakalara yine 100 l konulmuş ve 4 °C de bir gece boyunca inkübe edilmiştir.
4. İnkübasyondan sonra yıkama tamponu ile tüm çukurlar 3'er dakikadan üç kez yıkanmıştır.
5. Konjugat tamponu (pH 7.4) içerisinde firmanın önerdiği şekilde sulandırılacak olan alkalın fosfataz enzimi ile işaretili IgG tabakalardaki çukurlara 100'er l konulmuş ve 37<sup>0</sup>C'de 5 saat inkübe edilmiştir.
6. İnkübasyondan sonra, yıkama tamponu ile tüm çukurlar üç kez yıkanmıştır.

7. Enzimin substratı olan *p*-nitrophenyl phosphate (1mg/ml) substrat tamponunda (pH 9,8) çözülmüş ve çukurlara 100 µl konmuştur. Reaksiyon karanlıkta, oda sıcaklığında 30-60 dk inkübe edilmiştir.

8. Ölçümler ELISA okuyucusu (ELISA reader) ile 405 nm dalga boyunda yapılmıştır.

DAS-ELISA yöntemi çift tekerrürlü çalışılmış olup negatif örnek ölçüm değerinin 2 katı ve yukarısı pozitif olarak kabul edilmiştir (Uyemoto vd. 1989).

### 3.2.4 Saksı denemeleri

Bitkilerde dayanıklılığın uyarılması çalışmalarının bir bölümü olan ve uygun dozun ve zamanın belirlenmesi amacı ile yapılan saksı denemeleri, dayanıklılık uyarıcılar Actigard, ve ISR-2000 kullanılarak aşağıda açıklanmıştır.

Saksı denemeleri, öncelikle ZYMV' ye karşı dayanıklılığın uyarılması çalışmalarında kullanılan iki farklı etkili maddeye sahip olan bitki aktivatörlerinin uygulanacak doz miktarları ile bitkide en etkili oldukları zamanın belirlenmesi amacıyla yapılmıştır. Saksı denemeleri tesadüf blokları deneme desenine göre Csinos vd. (2004)'in belirttiği şekilde kurulmuş ve her bir deneme deseni 10 tekerrürden oluşturulmuştur (Şekil 3.3). Her bir karakter (bitki aktivatörü) için kontrol (Bitki aktivatörü uygulanmamış ZYMV ile inokule edilen bitkiler) ile birlikte 160 bitki ISR-2000 için ve 280 bitki Actigard için kullanılmıştır. Actigard 1.5mg/80 ml, 3 mg/80 ml, 6 mg/80 ml, 8 mg/80 ml, 12 mg/80 ml ve 16 mg/80 ml ISR-2000 ise 180 ml/100 l su, 90 ml/100 l su, 45 ml/100 l su, konsantrasyonlarında çeşme suyu içerisinde hazırlanmış ve kabak fidesine uygulanmıştır (ilk gerçek yaprakların çıkmış olduğu dönemde) (Kang ve Buchenauer 2001, Baysal vd. 2003).

Bitki aktivatörlerinin bitki bünyesinde en etkili olduğu zamanın belirlenmesi amacıyla, bunların bitkiye uygulanmasından sonraki 72 ve 96 saatleri takiben aynı bitkiler üzerine, serolojik tanısı yapılmış ZYMV K19 izolatu mekanik inokulasyon yöntemi ile

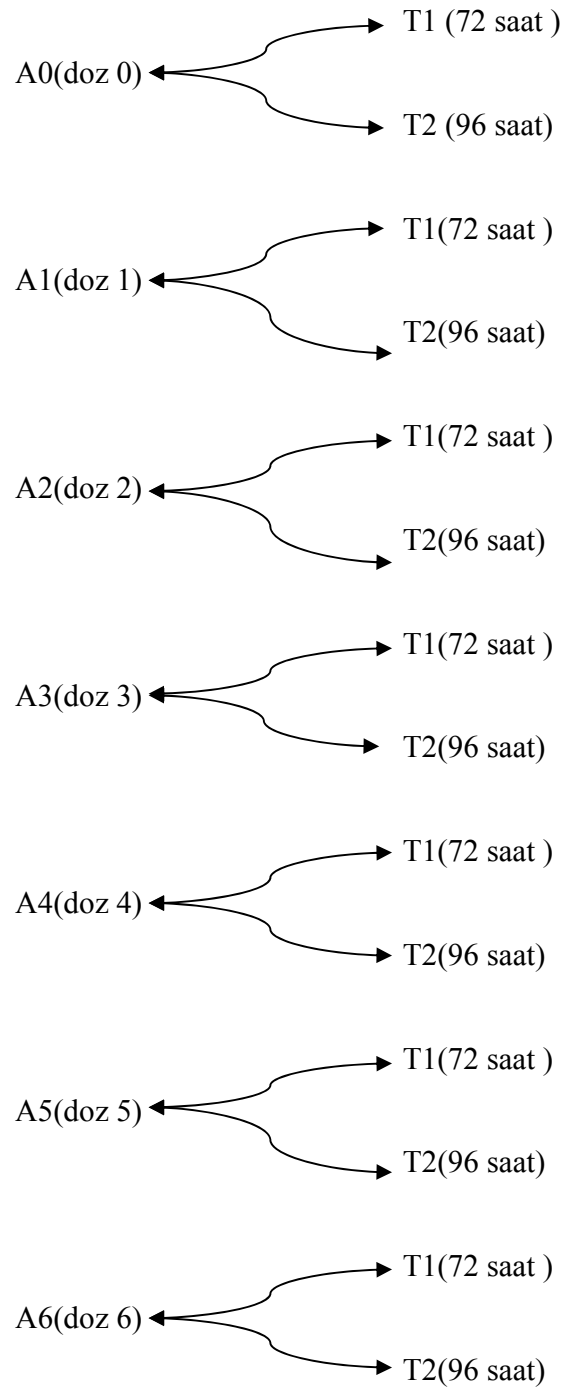
bulaştırılmıştır (Louws vd. 2001, Kang ve Buchenauer 2001, Bokshi vd. 2003, Baysal vd. 2003).



Şekil 3.3 Seradaki deneme düzeni

Actigard ve ISR-2000 uygulandıktan sonra 72 ve 96 saat sonra virüs uygulaması sonucu bitkilerde gözlenen simptomlar inokulasyondan sonraki kontrol bitkilerinde ilk simptom çıkış tarihinden itibaren değerlendirilmeye başlanmıştır. Her faktör 20 tekerrürden ibaret olup toplam kullanılan bitki sayısı 280'dır ve deneme planı aşağıda gösterildiği şekilde kurulmuştur(Şekil 3.4).

Uygulamadan bitkinin çiçeklenme aşamasına gelen kadar süre içerisinde bu kabak bitkileri üzerinde ZYMV simptomlarının varlığı ve bu simptomların çıkış zamanı, bitki boyu, yaprak genişliği ve istatistiki olarak ve simptom şiddeti görsel olarak değerlendirilmiştir. Bu çalışmanın sonuçlarının değerlendirilmesi, dayanıklılığı teşvik edicilerin uygulanmadığı kontrol bitkiler üzerinde ilk simptom çıkışının gözlenmesi ile başlamıştır. Dayanıklılık uyarıcılar uygulandıktan sonra belirlenen zaman aralıklarında virüs inokulasyonu yapıp, bitkide ZYMV'ye karşı bir reaksiyon olarak gelişen SKD mekanizmasının en aktif olduğu optimum zaman aralığı ve doz belirlenmiştir. Bitki aktivatörlerinin ZYMV'ye karşı kullanılabilecek en etkin dozlarının belirlenmesi amacıyla yapılan saksı denemeleri de aşağıdaki şekilde yürütülmüştür.



Şekil 3.4 Aktivatör uygulamalarında kullanılan deneme planı

Bu amaçla yapılan çalışmalarda bitki aktivatörü ISR-2000 kullanım prosedüründe belirtilen doz miktarı ile bu dozun yarısı ve iki katı şeklinde 3 farklı doz(Çizelge 3.2) ve Actigard bitki aktivatörü ön denemelerimizde firmanın önerdiği uygulama dozu bal kabaklarına fitotoksik (Şekil 3.5) olduğundan 6 farklı doz(Çizelge 3.3) şeklinde uygulama yapılmıştır. Bu denemeler, diğer çalışmalarda olduğu gibi tesadüf bloklarıdeneme desenine göre kurulmuş ve 10 tekerrürden oluşmuştur. Bu denemelerde her bir karakter için kontrol ile birlikte 280 kabak bitkisi kullanılmıştır. Kullanılan bitki aktivatörlerinin dozları çizelge 3.2 ve 3.3'te verilmiştir. Bitki aktivatörlerinin uygun dozunun saptanması amacıyla yapılan çalışmalar, kabak bitkilerine bitki aktivatörlerinin ilk uygulamasından sonra 1 hafta arayla 2 kez daha bitki aktivatörü uygulanmış ve değerlendirilmiştir. Simptomatolojik olarak gözlenen ve değerlendirilen bu bitkilerden alınan kök, gövde ve yaprak dokuları histokimyasal boyamalarda materyal olarak kullanılmıştır.



Şekil 3.5Ön denemelerde kullanılan dozlarda bitki boyunun kısalması, kuruma ve ölüm şeklinde görülen fitotoksite (soldaki şekilde en sağdaki kontrol bitkisi)

Çizelge 3.2 ISR-2000 uygulamasında kullanılan dozlar

| Bitki aktivatörü | Doz 1          | Doz 2          | Doz 3           |
|------------------|----------------|----------------|-----------------|
| ISR-2000         | 45 ml/100 l su | 90 ml/100 l su | 180 ml/100 l su |

Çizelge 3.3 Actigard uygulamasında kullanılan dozlar

| Bitki aktivatörü | Doz 1      | Doz 2    | Doz 3    | Doz 4    | Doz 5     | Doz 6     |
|------------------|------------|----------|----------|----------|-----------|-----------|
| Actigard         | 1.5mg/80ml | 3mg/80ml | 6mg/80ml | 8mg/80ml | 12mg/80ml | 16mg/80ml |

### 3.2.5 Histokimyasal Boyamalarla Lignin Sentezinin Belirlenmesi

Dayanıklılığın uyarıldığı kabak bitkilerinden alınan (aktivatör uygulamasından ve kontrol amacıyla kullanılan virüs inokulasyonundan 72 ve 96 saat sonra) yaprak, kök ve gövde parçaları kullanılarak, bitki aktivatörlerinin kullanılması sonucu, enfekteli bitki dokularının enfeksiyon ve reaksiyon yerlerinde ortaya çıkan lignin sentezi, phloroglucinol/HCl Testi ile belirlenmiştir. Saksı denemelerinde, Actigard ve ISR- 2000 uygulaması yapılan kabak bitkileri saksılardan kök bölgesi zararlandırılmadan çıkarılmış çeşme suyunda yıkanmıştır. Bu bitkilerin kök ve gövdelerinden steril bir bistüri ile 3-5 mm uzunluğunda, yapraklarından ise, yaklaşık 5 mm çapında kesitler alınmıştır. İnfekteli dokulardaki klorofiller, %100' lük metanol içerisinde, 10-15 dakika kaynatılarak uzaklaştırılmıştır. Daha sonra beyazlaşan doku örnekleri, kloral hidrat (2.5 g/ml) içerisinde en az 24 saat bekletilerek dokular şeffaflaştırılarak temizlenmiştir. Metanol yardımı ile klorofil uzaklaştırılarak, kloralhidrat ile temizlenen dokular steril bir lam üzerine alınarak, üzerine 1-2 damla konsantre HCl ilave edilerek 10 dak. bekletilmiştir. Daha sonra bu dokuların üzerine birkaç damla %50' lik gliserol çözeltisi damlatılmış ve lamel kapatılarak bu şekilde hazırlanan preparatlar incelenmiştir. Enfekteli dokuların üzerine HCl eklendikten ortalama 10 dak. sonra, ligninlenmiş yapılar koyu pembe-turuncu bir renk oluşturmuştur. Boyanmış dokuların 3-5 saat sonra renklerini kaybetmeleri nedeniyle preparatlar, mümkün olduğunca kısa süre içerisinde, faz kontrast, steroskobik mikroskop ve ışık mikroskop kullanılarak

incelenmiş ve görüntü alınmıştır (Gahan 1984, Vallet vd. 1996, Soylu 1999). Boyama işlemleri, pozitif ve negatif kontrol bitkilerinin her ikisi için de uygulanmıştır.

### **3.2.6 Histokimyasal Boyamalarla H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Sentezinin Belirlenmesi**

Dayanıklılığın uyarıldığı kabak bitkilerinde, enfekteli dokularda enfeksiyon ve reaksiyon yerlerinde meydana gelen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sentezi, DAB (3,3'-diaminobenzidine) testi ile belirlenmiştir.

Bu yöntemde de, saksı denemelerinde, Actigard ve ISR-2000 uygulaması yapılan balkabağı bitkileri saksılardan kök bölgesi zararlandırılmadan çıkarılmış (aktivatör uygulamasından ve kontrol amacıyla kullanılan virüs inokulasyonundan 72 ve 96 saat sonra) ve çeşme suyunda yıkanmıştır. Bu bitkilerin kök ve gövdelerinden steril bir bistüri ile 3-5 mm uzunluğunda, yapraklarından ise yaklaşık 5 mm çapında kesitler alınmıştır. İnfekteli dokular önce karanlıkta 15- 25 dak. arasında DAB içerisinde bekletilerek yıkanıp bitki dokularından klorofilin uzaklaştırılması için metanol içerisinde 10-15 dakika kaynatılarak beyazlaşan doku örnekleri, kloral hidrat (2.5 g/ml) içerisinde en az 24 saat bekletilerek dokular şeffaflaştırılarak temizlenmiştir. Metanol yardımıyla klorofil uzaklaştırılarak kloral hidrat (Merck) ile temizlenen dokular steril bir lam üzerine alınarak, üzerine birkaç damla %50' lik gliserol çözeltisi damlatılmış ve lamel kapatılarak bu şekilde hazırlanan preparatlar incelenmiştir. Dayanıklılığın uyarıldığı yerlerde kahverengi renk değişimleri gözlenmiştir. Boyanmış dokuların 3-5 saat sonra renklerini kaybetmeleri nedeniyle, hazırlanan preparatlar, mümkün olduğunca kısa süre içerisinde, faz kontrast, ışık mikroskobu ya da stereoskopik mikroskop kullanılarak incelenmiş ve görüntü alınmıştır (Soylu 1999). Boyama işlemleri, pozitif ve negatif kontrol bitkilerinin her ikisi için yapılmıştır.

## **4. ARAŞTIRMA BULGULARI**

### **4.1 ZYMV ile Bulaşık Bitkilerin Belirlenmesi**

Bu tez çalışmasında kullanılacak ZYMV izolatını belirlemek amacıyla Ankara ilinde survey çalışmaları yapılmış (kabak, bal kabağı, kavun, salatalık bitkileri testlenmiş), sonuçta Kazan ilçesinde yetiştirilen şiddetli mozaik, damar bantlaşması ve yapraklarda şekil bozukluğu şeklinde belirtiler gösteren ve DAS ELISA ile yalnızca ZYMV enfeksiyonunun bulunduğu bir bal kabağı bitkisi (belirtilerinin şiddetli ve ELISA absorbans değerinin en yüksek olması sebebiyle) bakımından izolat kaynağı olarak kullanılmıştır.

### **4.2 Mekanik İnokulasyon Çalışmaları**

Kazan ilçesinden alınan izolatın çoğaltılması amacıyla bal kabaklarına mekanik inokulasyonlar yapılmış ve inokulasyonlardan 11 gün sonra tipik belirtiler görülmeye başlanmıştır. Belirtiler 14. günde şiddetlendiğinden dolayı yapraklar bu dönemde hasat edilmiştir. Bu yapraklardan çıkarılan özsu aktivatör uygulama denemelerinde kullanılmıştır.

### **4.3 Dayanıklılığın Uyarılması Çalışmaları**

#### **4.3.1 Saksı Denemeleri**

Kontrol (+) olarak kullanılan bitkiler üzerinde ilk belirtiler mekanik inokulasyondan 11 gün sonra gözlenmiştir bu belirtiler yapraklarda mozaik ve damar bantlaşması şeklindedir. Enfeksiyon oranı ve yüzdeleri çizelge 4.1' de verilmiştir. Yapılan istatistikî analizler kontrol örnekleri ile deneme bitkileri arasındaki enfeksiyon yüzdeleri arasındaki farklılığın önemli olmadığını ortaya koymuştur.

Bu çalışmada Actigard ile yapılan ön denemelerde Actigard'ın firma tarafından önerilen dozu balkabaklarında yapraklarda yukarı doğru kıvrılma, nekroz, damarlarda bantlaşma ve

bitki boyunda kısılma şeklinde fitotoksiteye sebep olduğundan (Şekil 4.1) dolayı 6 farklı doz kullanılmıştır. Bu 6 dozdan doz 5 ve 6 istatistik olarak toksik olduğu saptanmıştır (Şekil 4.1).

Çizelge 4.1 ASM uygulanan bitkilerde mekanik inokulasyon sonucu simptom gösteren bitki oranı

| Doz | Zaman | Mekanik inokulasyon yapılan bitki sayısı | Simptom gösteren bitki sayısı ve yüzdesi |
|-----|-------|------------------------------------------|------------------------------------------|
| A0  | 72    | 10                                       | 8 bitki %80                              |
|     | 96    | 10                                       | 8 bitki %80                              |
| A1  | 72    | 10                                       | 8 bitki %80                              |
|     | 96    | 10                                       | 10 bitki %100                            |
| A2  | 72    | 10                                       | 8 bitki %80                              |
|     | 96    | 10                                       | 8 bitki %80                              |
| A3  | 72    | 10                                       | 8 bitki %80                              |
|     | 96    | 10                                       | 7 bitki %70                              |
| A4  | 72    | 10                                       | 5 bitki %50                              |
|     | 96    | 10                                       | 6 bitki %60                              |



Şekil 4.1 Actigard'ın bal kabağı yapraklarında damarların etrafının koyu yeşil bir durum alması, yaprakların yukarı doğru kıvrılması şeklinde sebep olduğu fitotoksite

#### 4.4 İstatistiksel Analizler

##### 4.4.1 Actigardın fitotoksiteye neden olan dozlarının belirlenmesi

Çizelge 4.2’de görüldüğü gibi Actigardın 5. ve 6. doz uygulamaları bal kabağı bitkileri için toksik bulunmuştur. Bu analiz ölü bitki sayısına dayanarak yapılmıştır. Bu atkivatörün etkinlik denemeleri için yapılan diğer analizlerde, 5 ve 6. dozları bitkilerde toksik bulunması nedeniyle denemelere alınmamıştır.

Çizelge 4.2 Actigard’ın farklı dozlarının bal kabağı bitkilerindeki olum oranına etkisi

| Doz | Ölü bitki yüzdesi (%) |
|-----|-----------------------|
| A0  | % 0 b                 |
| A1  | % 0 b                 |
| A2  | % 0 b                 |
| A3  | % 7.5 b               |
| A4  | % 10 b                |
| A5  | % 30 a*               |
| A6  | % 65.5 a*             |

\*Tukey (P=0.05) testine göre aynı harfler alan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir.

Balkabağı bitkilerine Actigard’ın farklı dozları, farklı zamanlarda (72 saat ve 96 saat sonra) uygulanmıştır. Bu faktörlere göre ZYMV inokulasyon belirtisinin çıkış süresi üzerine etkisinin olup olmadığı, çizelge 4.3’de gösterilmiştir. Uygulama yapılan bitkilerde, kontrole göre 5- 21 gün süre ile simptom çıkışında gecikme gözlenmiştir. Bu bitki aktivatörü (doz 3 ve 4) uyguladıktan sonra, yapılan ZYMV bulaştırılması sonucunda, bitkilerdeki simptom çıkış(Şekil 4.2) süresi üzerinde etkisi istatistiksel olarak Tukey testine göre incelenmiştir. Bu sonuca göre belirgin bir etkisinin olduğu saptanmıştır.

#### 4.4.2 Actigard' ın simptom çıkış süresi üzerinde etkisi

Bu analizde gördüğümüz gibi Actigard uygulamasında doz 3 ve doz 4 simptom çıkış üzerinde etkili olmuş ve önemli bulunmuştur(Çizelge 4.3). Sadece 96 saatte Bu dozlar önemli bulunmuştur.

Çizelge 4.3 Actigard'ın farklı doz ve uygulama zamanlarının simptom çıkış süresi üzerine etkileri

| Doz | Zaman | Tekerrür sayısı<br>(n) | Simptom çıkış süresi (gün) |
|-----|-------|------------------------|----------------------------|
| A0  | 72    | 10                     | 11.70 ± 0.26 d*            |
|     | 96    | 10                     | 13.13 ± 0.52 cd            |
| A1  | 72    | 10                     | 12.40 ± 0.27 d             |
|     | 96    | 10                     | 12.75 ± 0.41 cd            |
| A2  | 72    | 10                     | 13.38 ± 0.82 bcd           |
|     | 96    | 10                     | 12.00 ± 0.22 d             |
| A3  | 72    | 10                     | 23.13 ± 1.74 abc           |
|     | 96    | 10                     | 24.71 ± 0.99 ab            |
| A4  | 72    | 10                     | 18.50 ± 2.30 abcd          |
|     | 96    | 10                     | 24.80 ± 1.39 a             |

\*Tukey (P=0.05) testine göre aynı harfler alan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir.



Şekil 4.2 Bal kabağı yapraklarında mozaik, kabarcıklaşma ve damar bantlaşması şeklinde ZYMV belirtileri

#### 4.4.3 Actigard'ın bitki boyu üzerinde etkisi

Actigard aktivatörünün, bitki boyu ve yaprak genişliği üzerine etkisi aşağıda verilmiştir. Kullanılan dozlardaki Actigard'ın, bitki boyu üzerine etkisi Tukey testine göre belirlenmiştir. Actigard belirli dozlarda istatistiksel olarak bitki boyunu uzatmış(Şekil 4.3), fakat yaprak büyüklüğünü küçültmüştür. Bu analizler detaylı olarak aşağıda açıklanmıştır. Actigard'ın 3. ve 4. dozunda uygulamadan 96 saat sonra bitki boyunun önemli oranda arttığı belirlenmiştir(Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4 Actigard'ın farklı doz ve uygulama zamanlarının bitki boyu üzerinde etkileri

| Doz | Zaman | Tekerrür sayısı (n) | ortalama Bitki boyu (cm) |
|-----|-------|---------------------|--------------------------|
| A0  | 72    | 20                  | 22.30 ± 0.9 b            |
|     | 96    | 20                  | 22.32 ± 1.07 b           |
| A1  | 72    | 20                  | 32.20 ± 1.75 ab          |
|     | 96    | 20                  | 30.15 ± 1.33 ab          |
| A2  | 72    | 20                  | 32.40 ± 2.14 ab          |
|     | 96    | 20                  | 34.30 ± 2.15 ab          |
| A3  | 72    | 20                  | 34.48 ± 1.72 ab          |
|     | 96    | 20                  | 37.10 ± 1.99 a*          |
| A4  | 72    | 20                  | 31.55 ± 1.74 ab          |
|     | 96    | 20                  | 38.95 ± 1.33 a*          |

\*Tukey (P=0.05) testine göre aynı harfler alan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir.



Şekil 4.3 Actigard dozlarının ve sürelerinin bitki boyu üzerinde etkisi soldan sağa doğru doz 4, doz 3, doz 2.

#### 4.4.4 Actigard' ın yaprak genişliği üzerinde etkileri

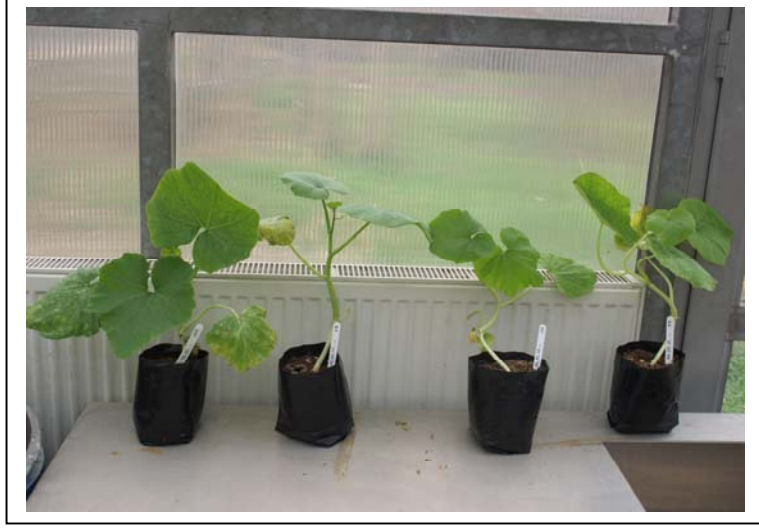
Bu analizde gördüğümüz gibi doz 4' de 72 saate yaprak genişliği üzerinde ters olarak önemli bulunmuştur. Bu doz 72 saatte yaprak genişliğini azaltmıştır (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5 Actigard'ın farklı doz ve uygulama zamanlarının yaprak genişliği üzerinde etkileri.

| Doz | Zaman | Tekerrür sayısı (n) | Yaprak genişliği (cm) |
|-----|-------|---------------------|-----------------------|
| A0  | 72    | 20                  | 7.650 ± 0.29a         |
|     | 96    | 20                  | 7.59± 0.31a           |
| A1  | 72    | 20                  | 7.46 ± 0.24 a         |
|     | 96    | 20                  | 7.43 ± 0.27 a         |
| A2  | 72    | 20                  | 6.53 ± 0.35 ab        |
|     | 96    | 20                  | 6.250 ± 0.28 ab       |
| A3  | 72    | 20                  | 5.150 ± 0.32 ab       |
|     | 96    | 20                  | 6.000 ± 0.22 ab       |
| A4  | 72    | 20                  | 4.23 ± 0.48 b*        |
|     | 96    | 20                  | 5.450 ± 0.38 ab       |

\*Tukey (P=0.05) testine göre aynı harfler alan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir.

Bu denemede dozlar arttıkça yapraklarda küçülme gözlemlenmiştir (Şekil 4.4). Actigard' ın tüm dozlarında yapraklarda küçülme görülmesine rağmen, sadece doz 4' ün istatistiksel olarak önemli oranda küçülmeye neden olduğu belirlenmiştir.



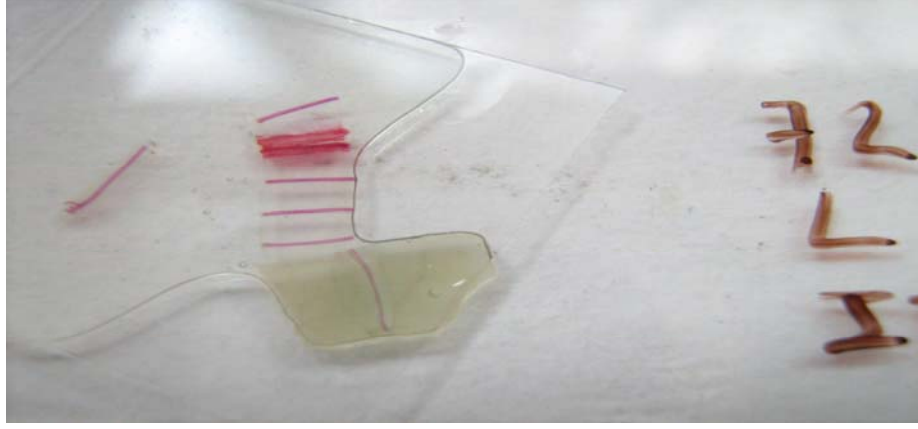
Şekil 4.4 Actigard'ın yaprak genişliği üzerinde etkisi  
(soldaki kontrol bitkisi)

#### 4.5 ISR-2000'in simptom çıkış süresi üzerine etkisi

Kabak bitkilerine ISR-2000 uygulamalarında yapılan ZYMV inokulasyonu symptomun çıkış süresi üzerine önemli derecede bir etkisi olmamıştır. Bu bitki aktivatörlerinin uygulanmasından 72 ve 96 saat sonra yapılan ZYMV bulaştırmalarında ise, bitkilerde simptom çıkış zamanı üzerine belirgin bir etkisi olmadığı gözlenmiştir. Aynı sonuç bitki boyu üzerinde ve yaprak genişliği üzerinde de gözlemlenmiştir.

## 5. HİSTOKİMYASAL BOYAMALARLA LİGNİN SENTEZİNİN BELİRLENMESİ

Histokimyasal boyamalar Actigard ve ISR-2000 uygulanan bitkilerde 72 ve 96 saat sonra yapılan ZYMV inokulasyonunun SKD mekanizmasını uyarıp uyarmadığı ve uyarıyorsa hangi zamanın en uygun olduğunun belirlenmesi için yapılmıştır. Bu çalışmalar sonunda bitki aktivatörü uygulanan bitkilerde lignifikasyonun yoğunluğunda ve dağılımında farklılıklar gözlenmiştir. Ligninleşme boyanma yoğunluğu temel alınarak her iki aktivatörü uygulamasında da en çok sırasıyla gövde, kök ve yaprakta belirlenmiştir. Lignin boyanmasında Phloroglucinol HCl ile reaksiyona girmekte ve lignin oluşum noktalarını sabitleyerek koyu turuncu veya pembemsi bir renk almasını sağlamaktadır. Aktivatör uygulamasından 72 ve 96 saat sonra virüs inokulasyonu yapılan bitkilerin boyama sonuçlarına bakıldığı zaman ISR-2000'in Actigard'a göre daha fazla ligninleşmeye yol açtığı görülmüştür (Şekil 5.1). Actigard uygulaması yapılan bitkiler üzerinde uygulanan lignin boyamasında (Şekil 5.1) boyanma bakımından dozlar ve zaman bakımından hiçbir fark görülmemiştir. Bununla birlikte ISR-2000 uygulanan bitkilerle yapılan boyama çalışmalarında 72. saatte, doz 2'de boyanmanın en belirgin olduğu ve bunu doz 1 ve doz 3'ün izlediği tespit edilmiştir.



Şekil 5.1: A- ISR-2000 uygulanmış bitki örneklerinde lignifikasyon. Kök (1), gövde (2), yaprak (3). B- Actigard uygulanmış bitki örneklerindeki lignifikasyon. Kök (1), gövde (2), yaprak (3).

## 6. HİSTOKİMYASAL BOYAMALARLA H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> SENTEZİNİN BELİRLENMESİ

Saksı denemeleri sonucunda dayanıklılığın uyarıldığı bitkilerden alınan kök, gövde ve yaprak dokuları ile yapılan bu çalışmada Actigard ve ISR-2000 uygulandıktan sırasıyla 72 ve 96 saat sonra virüs inokulasyonunun, SKD mekanizmasının uyarılması için uygun zaman aralığı olduğu belirlenmiş ve dayanıklılığın en yüksek seviyede uyarıldığı bu bitkilerden alınan dokularda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> birikimi belirlenmiştir. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> boyamasında DAB ile reaksiyona girmiş ve peroksidaz varlığında kahverengi renge dönüşmüştür. Bitki aktivatörü uygulanan bitkilerde, yoğunluğunda ve dağılımında farklılıklar gözlenmiştir. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> birikimi bitkinin dokusunda en çok yapraklarında birikmiştir. Yapılan yaklaşık 90 örnek boyamasında yaprak örneklerin hepsinde ve 3 kök örneğinde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> birikimi gözlenmiştir ve hiç bir gövdede H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> birikimi gözlenmemiştir.

Actigard uygulamasından 72 saat sonra virüs inokulasyonu yapılan bitkilerden alınan bitki dokularından yapılan DAB boyaması sonucunda bu bitkilerde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> birikiminin var olduğu ve kontrol (Şekil 6.5) bitkilerine göre şiddetinin fazla olduğu ve bu boyanmanın iletim demetlerin etrafında olduğu saptanmıştır (Şekil 6.2).

Bu zamandada aynı 72 saatteki gibi dozlar arasında hiç bir fark gözlenmemiştir. Actigard uygulamasından 96 saat sonra virüs inokulasyonu yapılan bitkilerden alınan bitki dokularından yapılan DAB boyaması sonucunda bu bitkilerde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> birikiminin var olduğu fakat kontrol bitkilerine göre şiddetinin az olduğu ve bu boyanmanın iletim demetlerin etrafında olduğu saptanmıştır (Şekil 6.1). Bu zamanda Actigard dozlarının arasında hiç bir fark gözlenmemiştir.

ISR-2000 uygulamasından 96 saat sonra virüs inokulasyonu yapılan bitkilerden alınan bitki dokularından yapılan DAB boyaması sonucunda bu bitkilerde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> birikiminin var olduğu ve kontrol bitkilerine göre şiddetinin fazla olduğu ve bu boyanmanın iletim demetlerin etrafında olduğu saptanmıştır (Şekil 6.3). Bu aktivatörde dozlar arttıkça H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> birikiminin arttığı gözlenmiştir.

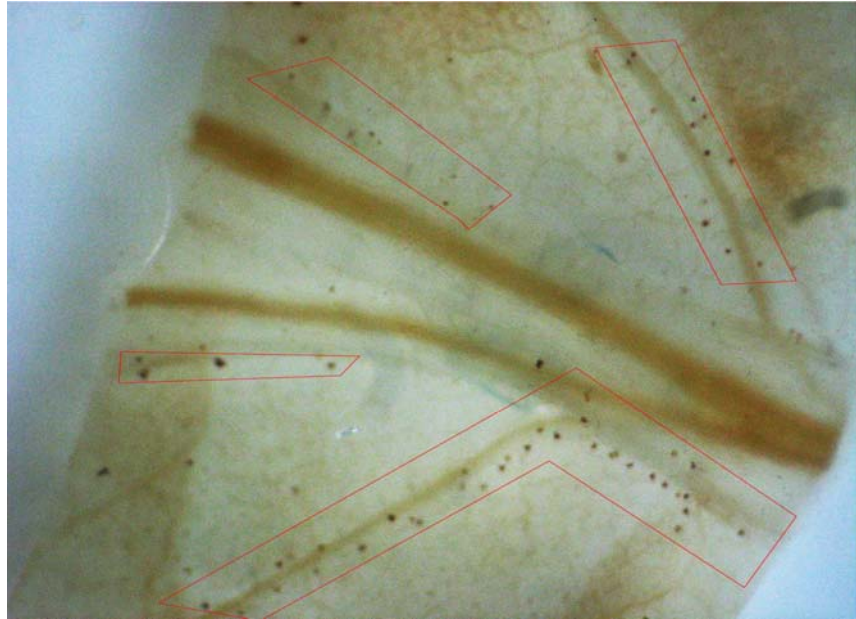
ISR-2000 uygulamasından 72 saat sonra virüs inokulasyonu yapılan bitkilerden alınan bitki dokularından yapılan DAB boyaması sonucunda bu bitkilerde  $H_2O_2$  birikiminin var olduğu ve kontrol bitkilerine göre aynı şiddette olduğu ve 96 saate göre şiddetinin daha düşük olduğu ve bu boyanmanın iletim demetlerin etrafında olduğu saptanmıştır (Şekil 6.4). Bu zamanda da aynı 96 saatteki gibi dozlar arasında arttıkça  $H_2O_2$  birikiminin arttığı gözlenmiştir. Genel olarak ISR-2000 aktivatörü uygulanan bitkilerdeki  $H_2O_2$  birikiminin ASM uygulanan bitkilerdekine göre daha az olduğu saptanmıştır.



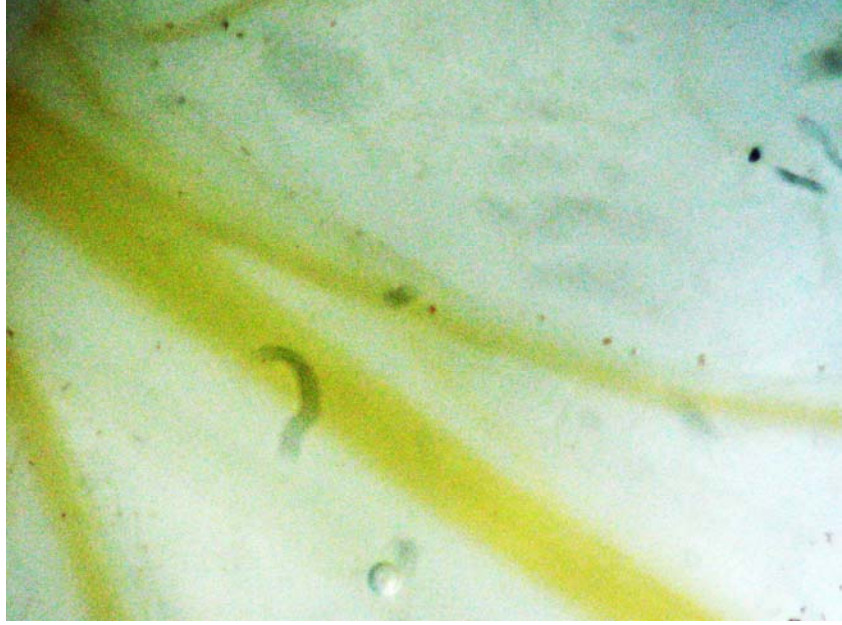
Şekil 6.1 Yaprakta  $H_2O_2$  birikimi (Actigard 96 saat)



Şekil 6.2 Yaprakta H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>birikimi (Actigard 72 saat)



Şekil 6.3Yaprakta H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>birikimi (ISR-2000 96 saat)



Şekil 6.4 Yaprakta H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> birikimi (ISR-2000 72 saat)



Şekil 6.5 Yaprakta H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> birikimi (kontrol bitkilerinde)

## 7. TARTIŞMA

Madhusudhan vd (2008), ASM'nin enfekteli bitkilerde virüs konsantrasyonunu düşürdüğünü bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar ASM uygulanmış ve ToMV ile enfekteli bitkilerde RdRp konsantrasyonunun arttığını gözlemlemişlerdir. Sentezlenmiş cRNA'ların virüs RNA'sının replikasyonunu ve translokasyonunu bozarak etkili olduğunu bulmuşlardır. Bu durumda bizim çalışmamızda da ASM uygulanmış bitkilerde ZYMV belirti çıkışının gecikmesi ZYMV RdRp konsantrasyonunun artmasıyla ilgili olabilir.

Nair ve Anith (2007), ASM'nin *Amaranthus*'larda gelişmeyi geciktirdiğini sürgün boyunu kısalttığını ve sürgün ve köklerin kuru ağırlığını azalttığını ortaya koymuşlardır. Bubici vd. (2005) domateslerde ASM'nin sera denemelerinde bitkilerde cüceleşmeye ve şiddetli yaprak klorozuna sebep olduğunu bulmuşlardır. Mandal vd. (2008) ASM'nin tütünlerde TSWV'ye en yüksek dayanıklılık sağladığı konsantrasyonda fitotoksitaya yol açtığını bildirmişlerdir. Chinnsari ve Sipes (2005) ananaslarda ASM'nin fitotoksik olduğunu rapor etmişlerdir. Parkunan vd. (2008) tütünlerde ASM'nin toksik olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmalardan da görüldüğü üzere ASM'nin bitki aktivatörü etkisi ve virüs üzerine etkili konsantrasyonu bitkiden bitkiye ve hatta çeşitten çeşite değişmektedir. Bu yüzden yapılacak ASM denemelerinde üretici firma tarafından önerilen dozlar yerine mutlaka önceden bir ön deneme yapılarak amaca uygun en uygun doz belirlenmelidir.

Bitkilerin elisitörler ve avirulent fungal etmenler ile muamele edilmeleri sonucu dokularda fenolik maddelerin biriktiği ve ligninleşmenin arttığı değişik araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Hornby ve Fitt 1981, Aist 1983, Stoltzenburg vd. 1984, Nicholson ve Hammerschmidt 1992). Lignin bilindiği üzere hücre duvarının mekanik gücünü arttırmaktadır. Ligninleşme bitkilerde patojen saldırısına karşı genel bir savunma mekanizmasıdır (Hijwegen 1963, Ride 1983). Lignin istilacı patojenlerin penetrasyonuna karşı ilk savunma hattı olarak değerlendirilir (Bhuiyan vd. 2009). Bitkilerdeki ligninleşme histokimyasal boyamalar ile belirlenebilmektedir (Aist 1983, Gahan 1984, Biggs ve Miles 1988, Isaac 1992, Vallet vd. 1996).

Çalışkan (2007), çalışmasında Actigard ve ISR-2000 uygulanan bitkilerde aktivatör uygulanmasından 72 saat ve 96 saat sonra lignin boyamalarında herhangi bir farklılık gözlememiştir. Bizim çalışmamızda da Actigard'da aynı sonuca varılmış, ancak ISR-2000'de aktivatör uygulanmasından 72 saat sonra lignin oluşumunun daha fazla olduğu tespit edilmiştir.

Çalışkan (2007), çalışmasında Actigard (Doz1,0.1g/l), (Doz2,0.2g/l),(Doz3,0.4g/l)uygulanan bitkilerinden yapılan lignin boyamasında Doz1 ve Doz2 arasında fark görülmemiş ancak Doz3'de gövde, kök ve yaprakta diğer uygulamalara göre boyanma şiddetinin daha fazla olduğu tespit edilmiştir.Oysa bizim çalışmamızda Actigard dozların arasında hiçbir fark gözlenmemiştir ve örneklerin hepsinde lignin boyanması sırasıyla en çok gövde, kök ve yaprakta bulunmuştur.

Çalışkan (2007) ISR-2000 uygulanan bitkilerde yapılan lignin boyama çalışmalarında (Doz1,5ml/l), (Doz2, 10ml/l), (Doz3, 20ml/l)uygulanan bitkilerde Doz2'de boyanmanın en şiddetli olduğu ve bunu Doz1 ve Doz3' ün izlediği tespit edilmiştir, bizim çalışmadada aynı sonuç saptanmıştır.

Yaptığımız çalışma sonuçlarından hareketle konukçu bitki hücrelerinin hücre duvarlarında aşırı lignin birikiminin viral enfeksiyonlara karşı koymada etkisiz olduğu söylenebilir. Bununla birlikte ligninleşme fungus ve bakteri enfeksiyonlarında etmenlere karşı belirli ölçüde bir savunma hattı oluşturmaktadır.

SKD reaksiyon ürünlerinden biri olan  $H_2O_2$ 'nin patojenin hücreye girişini sınırladığı düşünülmektedir.  $H_2O_2$  dokularda nekrozlara sebep olmakta ve hipersensitif reaksiyonla ilgili olmaktadır (Balazs vd 2003).

Çalışkan (2007), çalışmasında Actigard uygulamasından 72 saat sonra kabak bitkilerinin gövdelerinde  $H_2O_2$  oluşumunu doku boyamalarıyla belirlemiş, fakat yaprakta saptayamamıştır. Aynı araştırmacı kullandığı bütün bitki aktivatörlerinde en iyi

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> birikiminin 72 saatte olduğunu gözlemiştir. Bizim çalışmamızda da benzer sonuçlara varılmıştır, ancak biz çalışmamızda gövede H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> birikimi saptayamadık.

Çalışkan (2007) ile bizim çalışma sonuçlarımızdaki bazı farklılıklar kullanılan bitki türlerinin farklılığından, aktivatör uygulama dozları arasındaki farklılıktan ve bitki yetiştirme koşulları arasındaki farklılıktan kaynaklanabilir.

## 8. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar şu şekilde özetlenebilir:

- Yapılan surveylerde, simptom gösteren bitkiler toplanmış ve ELISA testine tabi tutulmuştur. Testlenen bitkilerden şiddetli ZYMV belirtisi gösteren bir balkabağı bitkisi (Kazan ilçesinden alınmış) izolat kaynağı olarak kullanılmıştır.
- Dayanıklılığın uyarılması çalışmaları saksı denemesi olmak üzere yürütülmüştür. Saksı denemelerinde uygulanacak bitki aktivatörlerinin kullanılacak uygun dozu ve uygulama zamanı belirlenmiş ve aktivatör uygulanan bitkilerden lignin sentezi ve  $H_2O_2$  birikiminin belirlenmesi amacı ile histokimyasal boyamalar yapılmış ve faz kontrast, ı ışık mikroskopu ve binoküler altında bakılarak resimleri çekilmiştir. Boyama çalışmaları sonucunda aktivatör uygulanan bitkilerde dayanıklılığın teşvik edildiği ve en iyi uygulama zamanının Actigard için 72 saat ve ISR-2000 için ise 96 saat olduğu belirlenmiştir.

Uygulanan bitki aktivatörlerinden Actigard'ın ZYMV inokulasyonunda simptom çıkışını 5-21 gün, ISR-2000 uygulamasında ise simptom çıkışında anlamlı bir fark bulunamamıştır.

Actigard'ın simptom çıkışı, bitki boyu ve yaprak genişliği üzerine olan etkileri istatistiki olarak değerlendirilmiştir. Actigard'ın simptom çıkış üzerinde Doz 4'ün 96 saati ve Doz 3'ün 96 saati önemli olarak bulunmuş; Actigard'ın bitki boyu üzerinde Doz 4'ün 96 saati ile Doz 3'ün 96 saatide önemli olarak görülmüştür. Actigard'ın yaprak genişliği üzerinde Doz 4'ün 72. saati önemli olarak bulunmuştur.

ISR-2000 aktivatöründe simptom çıkış üzerinde hiç bir karakter önemli bulunmamıştır. ISR-2000 aktivatöründe simptom çıkış üzerinde aktivatörün dozları ve uygulama zamanları (72 ve 96 saat), olarak önemli bir kombinasyon bulunmamıştır.

Bitkilere dayanıklılık kazandırmak için yapılacak bitki aktivatörü uygulamaları üretici firmaların önerdiği dozda bile kullanılsa toksik olabileceğinden (örneğin ASM), kültür bitkilerine yapılacak aktivatör uygulamalarında üretici firma tarafından önerilen dozlar

yerine mutlaka önceden bir ön deneme yapılarak amaca uygun en uygun doz belirlenmelidir.

## KAYNAKLAR

- 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, pp.33-70.
- Anonim. 2008. Zirai mücadele teknik talimatları. T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü, cilt 3, 4, 5, Ankara.
- Anonim. 2010. TÜİK. Türkiye Bitkisel Üretim İstatistikleri.<http://www.tuik.gov.tr/jsp/duyuru/upload/vt/vt.html>.
- Anonymous. 2006. ICTVdB Management. 00.057.0.01.077. Zucchini yellow mosaic virus. In: ICTVdB - The Universal Virus Database, version 4. Büchen-Osmond, C. (Ed), Columbia University, New York, USA.
- Balkaya, A., Özbakır, M. ve Karaağaç, O. 2010. Karadeniz bölgesinden toplanan bal Kabağı *Cucurbita moschata* Duch. populasyonlarındaki meyve özelliklerinin karakterizasyonu ve varyasyonun değerlendirilmesi. Tarım Bilimleri Dergisi, Vol.16: pp.17-25.
- Balaz, P., Boldizarova, E., Godocikova, E. and Briancin, J. 2003. Mechanochemical route for sulphide nanoparticles preparation. Materials Letters, Vol.57: pp.1585-1589.
- 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., Vol.52: pp.747-753.
- Biggs, A.R. and Miles, N.W. 1988. Association of suberin formation in uninoculated wounds with susceptibility to *Leucostomatin* and *L. personii* in various peach cultivars. Phytopathology, Vol.78: pp.1070-1074.
- Blackley, R.H., Bertrand, P.F., Von Waldner, M.D. and Franks, R.W. 2004. The effect of time of actigard application to transplants on the final incidence of spotted wilt. 26 Paper Presented At 41st Tobacco Worker's Conference, Tennessee, January 20-23.
- Bokshi, A.I., Morris, S.C. and Deverall, B.J. 2003. Effect of benzothiadiazole and acetylsalicylic acid on  $\alpha$ -1,3-glucanase activity and disease resistance in potato. Plant Pathol., Vol.52: pp. 22-27.
- Bubici, G., Amenduni, M., Colella, C., D'Amico, M. and Cirulli, M. 2005. Efficacy of acibenzolar-S-methyl and two strobilurins, azoxystrobin and trifloxystrobin, for the control of corky root of tomato and *Verticillium* wilt of eggplant. Crop Prot., Vol.25: pp.814-820.
- Bhuiyan, N.H., Selvaraj, G., Wei, Y. and King, J. 2009. Role of lignification in plant defense. Plant Signal. Behav., Vol.4: pp.158-159.

- Chinnasri, B. and Sipes, B. 2005. Effect of a systemic acquired resistance inducer on nematodes infecting pineapple. Dept. of Plant and Environmental Protection Sciences, University of Hawaii. *Acta Hort.*, Vol.666: pp.213-222.
- Clark, M.F. and Adams, A.N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.*, Vol. 34: pp.475-483.
- Csinos, A.S., Pappu, H.R., McPherson, R.M., Stephenson, M.G. 2001. Management of Tomato spotted wilt virus in flue-cured tobacco with acibenzolar-s-methyl and imidacloprid. *Plant Dis.*, Vol. 85: pp.292-296.
- Csinos, A.S., Martinez-Ochoa, N., Stephenson, M.G. 2004a. Tomato spotted wilt virus severity influenced by acibenzolar-s-methyl, imidacloprid and age of tobacco transplants. 2003 north central division meeting abstracts, June 25-27, 2003 - East Lansing, Michigan. Publication No. P-2004-0008-NCA.
- Csinos, A.S., Stephenson, M.G., Laska, J. and Mullis, S. 2004b. Pre-plant and post-plant applications of ASM for management of TSWV in flue-cured tobacco. Paper Presented at 41st Tobacco Worker's Conference, Tennessee, January 20-23.
- Çalışkan, A.F. 2007. Kabak sarı mozayik virüsü (Zucchini yellow mosaic virus, ZYMV)'nün tanısı ve bitki aktivatörleri kullanılarak mücadele olanaklarının araştırılması. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Yüksek Lisans Tezi, 104 s.
- Çalışkan, A.F., Kameroğlu, M.A. 2009. Acibenzolar-s-methyl (ASM) uygulamasının hıyar mozayik virüs (Cucumber mosaic virus, CMV)'ü üzerine etkisi. Türkiye III. Bitki Koruma Kongresi, s.168, Van.
- Çıtır, A., Kutluk, N. D., Sağlam, N. ve İlbağı, H. 1998. Amasya, Çorum, Samsun ve Tokat illerinde hıyar ve kabak kültürlerinde görülen virüs hastalıklarının simptomatolojik ve biyolojik yöntemlerle tanıları. Türkiye VIII. Fitopatoloji Kongresi, s.331-335, Ankara.
- Davis, R.F. 1986. Partial characterization of zucchini yellow mosaic virus isolated from squash in turkey. *Plant Dis.*, Vol.70: pp.735-738.
- Dolores, L.M. and Valdez, R.B. 1988. Identification of squash viruses and screening for resistance. *Philipp. Phytopathology.*, Vol.24: pp.43-52.
- Ertunç, F. 1992. Ankara ilinde kabaklarda enfeksiyon oluşturan viral etmenin teşhisi üzerinde araştırmalar. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, 1252, 13 s.
- Fanigliulo, A., Comes, S. and Crescenzi, A. 2009. Integrated management of Tomato yellow leaf curl in protected tomato crops in southern Italy. *Acta Hort.*, Vol.808: pp.393-396.
- Gahan, P.B. 1984. *Plant histochemistry and cytochemistry*. Academic Press, 291, London.
- Güldür, M.E. ve Değirmenci, K. 2006. Hıyarlarda Zucchini yellow mosaic virus (ZYMV)'ün çapraz koruma (cross protection) ile kontrolü. *Bitki Koruma Bülteni.*, Vol.46: pp.13-23.

- Hijwegen, T. 1963. Lignification a possible mechanism of active resistance against pathogens. *Netherland Jurnal of Plant Pathology.*, Vol.69: pp.314-317
- Hiroki, K. and Takahide, S.2003. Efficacy of acibenzolar-s-methyl, an inducer of systemic acquired resistance, against Tobacco mosaic virus and Cucumber mosaic virus. *Proceeding of The Association For Plant Protection of Shikoku.*, Vol.38: pp.9-13.
- Hornby, D. and Fitt, B.D.L. 1981. Effects of root invading fungi on structure and function of cereal roots. (P.G. Ayres ed.) *Effect of Disease on the Physiology of the Growing Plant.* Cambridge University Press, Cambridge.,pp.101-130.
- Johnson, A. 2006. Tomato spotted wilt virus information. flue-crued tobacco cooperative stabilization corporation is the grower owned and supported cooperative that serves flue-crued tobacco growers in Virginia, North Carolina, South Carolina, Georgia, Alabama and Florida. A Newsletter from Flue-Cured Tobacco Cooperative Stabilization Corporation, 4 s.
- Kang, Z. and Buchenauer, H. 2001. Ultrastructural studies on the mode of action of fluorescent *Pseudomonas* alone and in combination with acibenzolar-s-methyl effective against *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersicum* in tomato plants. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, Vol.108: pp.513-529.
- Lesemann, D.E., Makkouk, K.M., Koenig, R. and Samman, E.N. 1984. Natural infection of cucumbers by Zucchini yellow mosaic virus in Lebanon. *Phytopathology*, Vol. 108: pp.304-313.
- Lisa, V. and Lecoq, H. 1984. Zucchini yellow mosaic virus. *Descriptions of Plant Viruses*, no. 282. Commonwealth Mycological Institute and Association of Applied Biologists, Kew, England.
- 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.*, Vol.71: pp.667-672.
- Louws, F.J., Wilson, M., Campbell, H.L., Cuppels, D.A., Jones, J.B., Shoemaker, P.B., Sahin, F. and Miller, S. 2001. Field control of bacterial spot and bacterial speck of tomato using a plant activator. *Plant Dis.*, Vol.85: pp.481-488.
- Madhusudhan, K. N., Deepak, S. A., Prakash. H.S., Agrawal, G.K., Jwa, N. S., Rakwal .R. 2008. acibenzolar-s-methyl (ASM)-induced resistance against Tobamoviruses involves induction of RNA dependent RNA polymerase (RdRp) and alternative oxidase (AOX) genes. *Crop Sci. Biotech.*, Vol.11: pp.127-134.
- Mandal, B., Pappu, H.R., Csinos, A.S. 2001. Suppressive effect of acibenzolar-s-methyl (ASM) on Tomato spotted wilt virus. Department of Plant Pathology, University of Georgia. <http://www.apsnet.org/publications/imageresources/Pages/IW000022.aspx>

- Mandal, B., Mandal, S., Csinos, A.S., Martinez, N., Culbreath, A. K. and Pappu, H. R. 2008. Biological and molecular analyses of the acibenzolar-S-methyl-induced systemic acquired resistance in flue-cured tobacco against Tomato spotted wilt virus. *Phytopathology*, Vol.98: pp.96-204.
- Mcpherson, R.M., Moore, J.M., Connelly, F.J., Jacobs, J.L. and Jones, D.C. 2004. Options for managing thrips and Tomato spotted wilt virus on flue-crued tobacco. Paper Presented at The 41st Tobacco Workers Conference, The University of Georgia, 98 p.
- Mcpherson, R.M., Stephenson, M.G., Lahue, S.S. and Mullis, S.W. 2005. Impact of early season thrips managment on reducing the risks ofspotted wilt virus and suppressing aphid population in flue- cured tobacco. *J. Econ. Entomol.*, Vol.98: pp. 129-134.
- Mejia, A.D.M., Rodas, G.E.I., Patino, H.L.F., Gonzalez, J.E.P. 2009. Effect of acibenzolar-s-methyl on virus infection progress caused by potyvirus in tree tomato. *Agronomia Colombiana*, Vol.27: pp.87-93.
- Mouhanna, A.M., Langen, G., Kogel, K.H. and Schloesser, E. 2003. Molecular analysis of the reaction of sugar beet plants to the resistance inductor (Bion®) as well as on the infestation by *Polymyxa betae* and *Rhizomania*. The 8<sup>th</sup> Arab Congress of Plant Protection, organized by the Arab Society of Plant Protection and the Faculty of Agriculture, Omar Al-Mukhtar University, 12 to 16 October 2003.
- Momol, M.T., Funderburk, J.E., Olson, S. and Stavisky, J. 2000. Management of TSWV on tomatoes with UV-reflective mulch and acibenzolar-s-methyl. thrips and tospoviruses: Proceedings of the 7th International Symposium on Thysanoptera.
- Momol, M.T., Olson, S.M., Funderburk, J.E., Stavisky, J., Marois, J.J. 2004. Integrated management of Tomato spotted wilt virus on field-grown tomatoes. North Florida, Research and Education Center, University of Florida. *Plant Disease*, Vol.88, pp. 8.
- Nair, C.B., Anith, K.N., and Sreekumar, J. 2007. Mitigation of growth retardation of the plant defense activator, acibenzolar-s-methyl, in *Amaranthus* plants by plant growth-promoting rhizobacteria. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, Vol.23: pp. 1183–1187.
- Nameth, S.T., Dodds, J.A. and Paulus, A.O. 1983. A new Potyvirus associated with severe disease of cantaloupe (*Cucumis melo*) in southern California. (Abstr.) *Phytopathol.*, Vol.73: pp.793.
- Nicholson, P. and Hammschmidt, R. 1992. Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.*, Vol. 30: pp.369-389.
- Nischwitz, C., Csinos, A.S., Mullis, S., W. Hickman, L.L., Stevenson, K. L. and Gitaitis, R. D. 2008. Effect of transplant age, tobacco cultivar, acibenzolar-s-methyl, and

- imidacloprid on Tomato spotted wilt infection in flue-cured tobacco. Plant Disease., Vol.92: pp.1524-1528.
- Nogay, A. 1983. Marmara bölgesi Cucurbitaceae familyası kültür bitkilerinde görülen virüs hastalıklarının tanılanması, tohumla geçiş durumlarının ve konukçu dizilerinin saptanması üzerinde araştırmalar. Doktora Tezi, Erenköy – İstanbul, 120s.
- Pappu, H.R., Csinos, A.S., Mcpherson, R.M., Stephenson, M.G. 2000a. Activity of acibenzolar-s-methyl and imidacloprid on TSWV in tobacco. University of Georgia. Publication No: P-2000-0004-SOA.
- Pappu, H.R., Csinos, A.S., Mcpherson, R.M., Jones, D.C., Stephenson, M.G. 2000b. Effect of acibenzolar-s-methyl and imidacloprid on suppression of Tomato spotted wilt Tosspovirus in flue-cured tobacco. Crop Prot., Vol.19: pp.349-354.
- Parkunan, V.C., Johnson, S. and Eisenback, J.D., Co-Chairmen. 2008. Induced disease resistance elicited by acibenzolar-S-methyl and plant growth-promoting rhizobacteria in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). Dissertation submitted to the Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University in partial fulfillment of the requirements for the degree of doctor of philosophy in plant Pathology, Physiology and Weed Science.
- Reed, T.D., Semtnor, P. J., Johnson, C.S. and Parrish, M. 2003. Actigard and admire for tomato spotted wilt virus control for flue-cruded tobacco in Virginia. 2004 Potomac Division Meeting Abstracts, April 6-7, 2004 - Shepherdstown, West Virginia. Publication no: P-2005-0016-PTA.
- Ride, J. P. 1983. Cell walls and other structural barriers in defense. Biochemical plant Pathology Pages 215-236.
- Ryals, J.A., Neuenschwander, U.H., Willits, M.G., Molina, A., Steiner, H.Y. and Hunt, M. D. 1996. Systemic acquired resistance. The Plant Cell., Vol.8: pp.1809-1819.
- Sirigu, A. and Nannini, M. 2009. Management of TYLCD using non-woven row covers and acibenzolar-s-methyl in greenhouse tomatoes. Acta Hort., Vol. 808: pp.397-400.
- Smith-Becker, J., Keen, N.T., Becker, J.O. 2003. Acibenzolar-s-methyl induces resistance to *Colletotrichum lagenarium* and Cucumber mosaicvirus in cantaloupe. Department of Plant Pathology, University of California. Crop Prot., Vol.22: pp.769-774.
- Soylu, E.M. 1999. Mildiyö etmeni (*Peronospora parasitica*) ve konukçusu *Arabidopsis thaliana* arasındaki ilişkilerin sito ve histokimyasal yöntemlerle incelenmesi. Doktora Tezi. Akdeniz Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, 160s, Antalya.
- Stoltzenburg, M.C., Aist, J.R. and Israel, H.W. 1984. The role of papillae in resistance to powdery mildew conditioned by the Ml-o gene in Barley. Physiol. Plant Pathol., Vol. 25: pp.337-346.

- Şevik, M.A. ve Sökmen, M.A. 2001. Samsun ilinde kabakgil bitkilerinde görülen virüs hastalıkları. Türkiye IX.Fitopatoloji Kongre Bildirileri, 3-8 Eylül., 2001, Trakya Üniversitesi Rektörlüğü Yayınları No:45, 180-189, Tekirdağ.
- Uyemoto, J. K., Luhn, C. F., Asai, W., Beede, R., Beutel, J. A. and Fenton, R. 1989. Incidence of Ilarviruses in young peach trees in California. Plant Dis., Vol.73: pp.217-220.
- Vallet, C., Chabbert, B., Czaninski, Y. and Monties, B. 1996. Histochemistry of lignin deposition during sclerencyma differentiation in alfalfa stems. Annals of Botany, Cilt.78: 625-632.
- Yılmaz, M.A., Lecoq, H., Abak, K., Baloğlu, S. ve Sarı, N. 1992. Türkiye’de kabakgil sebze türlerinde zarara yapan virüsler. Türkiye I.Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi, İzmir. Cilt 2:439-442.
- Yılmaz, M.A., Abak, K., Lecoq, H., Baloğlu, S., Sarı, N., Kesici, S., Özaslan, M. and Güldür, M. 1994. Control of Zucchini yellow mosaic virus (ZYMV) in Cucurbits by ZYMV-WK strain. 9th Congress Of Mediterranean Phytopathological Union- Kuşadası-Aydın-Türkiye., 353-356.
- Zitter, T.A., Hopkins, D.A. and Thomas, C.F. 1996. Compendium of cucurbit diseases. APS Press, 120s.

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Ahmad HEKMAT KASHTBAN

Doğum Yeri : İRAN

Doğum Tarihi : 04.04.1981

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dil : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Emam Khomeyni, Oroumiyeh, İran (2000)

Lisans : Urmia Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma A.B.D ( 2005)

Yüksek Lisans :Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalı (Eylül 2008- Ağustos 2011)