BÖLÜM 7

TOHUM HİJYENİ

Sümer HORUZ[1]
Hakan FİDAN [2]
Özer ÇALIŞ[2]

[1]Doç. Dr., Erciyes Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü-Kayseri

[2] Doç. Dr., Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü-Antalya

1. GİRİŞ

Bitkilerde görülen hastalıkların kontrolünde hijyen ve terapi (seed sanitation) iyi tarım uygulamaları çerçevesinde değerlendirilmektedir. Bu nedenledir ki Avrupa ve Akdeniz Bitki Güvenliği Organizasyonu (European and Mediterranean Plant Protection Organization: EPPO) hastalık ve zararlıların mücadelesi kapsamında 'İyi Bitki Koruma Uygulama Temelleri' başlığı altında standart protokoller oluşturmuştur (EPPO, 2004). Oluşturulan hijyen ve terapi standartları başlangıçta korunaklı alanlarda üretimin yapıldığı Patlıcangiller (Solanaceae) familyasına ait türlerde görülen zararlı ve hastalıklara yönelik oluşturulmuş iken, günümüzde bu uygulamaların tüm ticari öneme sahip ürünler için geçerli olduğu bilinmektedir (EPPO, 2020).

Fide yetiştiriciliğinde başlangıç materyali olan tohumun hastalıklarla bulaşık olması durumunda tüm üretim süreci risk altında kalmaktadır. Bu nedenle tohumun hastalıklardan ari olması, teşhis ve var olan/olası hastalık etmenlerinden arındırılması, sebze fidelerinin yetiştirilmesindeki en önemli konulardan biridir. Bu bölümde, sebze tohumlarında bulunabilecek mikroorganizmaların tohum bünyesinde teşhisi ve tohumdan eleminasyonu için yapılacak çeşitli uygulamalar vurgulanmıştır.

2. TOHUMLA TAŞINAN BİTKİ FUNGAL HASTALIKLARINDA HİJYEN VE TERAPİ YÖNTEMLERİ

Bitkilerde görülen fungal hastalıkların mücadelesinde hijyen ve terapi konusunu hastalık kaynağına göre 1) toprak kökenli, 2) su ve 3) hava kaynaklı hastalık etmenlerine karşı yapılacak uygulamalar şeklinde sınıflandırmak doğru olacaktır. Ancak bitkilerde hastalıklara sebep olan patojenler çok farklı yollar ve şekillerde yayılım gösterebilirler. Bu patojenik organizmalar insanla, bitki materyaliyle, böceklerle ve üretimde kullanılan çeşitli alet ve araçlarla yayılım gösterebilirler. Hijyen, üretimin yapıldığı yerde hastalık etmeninin bu alana girişini engelleyen, çoğalmasını baskılayan ya da tamamen ölmesine neden olan tüm uygulamaları içermektedir. Bu nedenle ticari üretimin yapıldığı yerlerde patojenlerin kontrolü için uygun tedbirlerin alınması ve hijyenin sağlanması için bir planın çıkarılması gerekmektedir.

Bitkilerde hastalıklara sebep olan funguslar çok farklı yollarla üretim yapılacak alana gelebilmektedirler. Bir üretim alanında hastalık etmeninden korunmak, üretimi yapılan bitkinin direkt sağlığını etkileyecek uygulamalara hijyen denilmektedir. Hijyenle birlikte yapılacak uygulamalar örneğin uygun dengeli gübreleme, dayanıklı ya da tolerant bitkilerin yetiştirilmesi hastalık etmenleri ile mücadeleyi

güçlendirecektir. Bazen çok zor bir fungal patojenin kontrol altına alınması gerekebilir. Böyle durumlarda bu fungusu kontrol altına alabilmek için özel hijyen programlarının oluşturulması gerekecektir. Hastalık etmeni fungus için gerekli olan hijyen bitkinin üzerine yapılmalı; uygulama işlemleri, uygulamanın şekli, uygulama ekipmanı, uygulama süresi fungusun kontaminasyonunu ne kadar kontrol edilebileceğini gösterecektir. Genellikle fungal patojenler için hijyen oluşturmada en temel adım kimyasal preparatların kullanımıdır. Bunun için de fungal kontaminasyonun seviyesi, lokasyonu ve miktarının artıp artmadığının bilinmesi gerekmektedir. Eğer fungusun miktarı ve artışı konularında bir karar verilirse hemen hijyen uygulamasına geçilmeli ve miktarına karar verilmelidir. Uygun yapılmayan kimyasal uygulamalarda bitki hijyeni sağlanamadığı gibi fungusun gelişimi hızlanacaktır. Bu durum bitki materyalinde fungal hastalık miktarının gelişimine, bitkide hastalık etmeninden dolayı oluşan kaybın artmasına hatta sonuçta herhangi bir ürün alınamamasına neden olabilecektir. Ticari olarak üretilen hijyen ürünleri genellikle geniş spektrumlu aktiviteye sahip antimikrobiyal ürünler olup fungusun tamamen ölmesine ya da yok olmasına sebep olmaktadır.

Üretim yaparken fungal hastalıklardan bitkileri koruyabilmek için dengeli gübreleme, dayanıklı çeşitlerin kullanımı gibi çok sayıda koruyucu tedbirlerle birlikte bitkilerin hastalıklı dal ve yapraklarını budama, kimyasal uygulaması, biyolojik kontrol ve sıcaklık uygulamaları gibi terapi (küratif) tedbirleri birlikte yapılmaktadır. Üretim yapılacak alandaki bitkilere hastalık etmeninin bulaşmaması için 5 temel önlemin alınması zorunludur. Bunlar 1) üretimde kullanılan viyoller, harç/karışımlar, saksılar, kaplar, kürekler, makaslar hastalık etmeniyle bulaşık olmamalı, 2) üretim alanı, 3) sulama suyu, 4) üretim materyali tohum, fide, anaç, kalem, rizom ve 5) üretimi gerçekleştirecek kişilerin elleri, çizmeleri, ve giysilerinin hastalık etmeni ile bulaşık olmaması gereklidir. Böylece üretilecek materyal daha üretim alanına gelmeden hijyen kuralları uygulanmalıdır.

Tüm bu önlemleri gerçekleştirebilmek için genellikle uygun ticari kimyasallar kullanılmaktadır. Bu kimyasallar için en uygunlarından bir tanesi, klor içeren evlerde çamaşır suyu olarak yaygın kullanılan kimyasallardır. Tüm üretimde kullanılan alet, ekipmanların sterilizasyonunda klorlu kimyasallar kullanılmakta olup rahatsız edici keskin kokusu, yüksek konsantrasyonlarda buharlaşan bu kimyasallar gözlerde, burunda ve genizde rahatsızlıklar oluşturmaktadır. Hızla oksitlenen bu reaktif klorlu bileşikler mikroorganizmaların dokularını kimyasal olarak yakarak öldürmektedirler. Bu aktif kimyasallar genellikle su ile seyreltilerek kullanılmakta olup sodyum tuzu, sodyum hipoklorit (NaOCl) formunda olup klorun burada anormal (+1)

değerlikte olması nedeniyle kararsız bir durum sözkonusu olup klorun hemen bulunduğu ortamdan elektron(lar) alarak kararlı hale (-1) geçmesi sonucu mikroorganizmaların yapısının bozulmasını sağlamaktadır. Ticari olarak satılan çamaşır suları %3.5-4.5 oranında su içerisinde sodyum hipoklorit içermekte olup bunun 10 defa seyreltilmesi sonucunda hazırlanan %10'luk solüsyon içerisine tüm üretimde kullanılan alet ve ekipmanlar 30 dakika (da) bekletilmelidir. Eğer hazırlanan solüsyon içerisine birkaç damla sıvı bulaşık deterjanı ilave edilirse hava kabarcıkları uzaklaşacağı için yüzeye temas daha iyi olacak ve yüzeydeki tüm kir olarak kabul edilen mikroorganizmalar yok edilecektir. Bu nedenle üretimde kullanılan tüm alet ve ekipmanların temizlenmesi ve her seferinde hazırlanacak taze solüsyonla dezenfekte edilmesi şarttır.

Hijyen oluşturmak için kullanılan klor içeren bileşiklere göre daha az tehlikeli hidrojen peroksit (H_2O_2) kullanılmaktadır. Hidrojen peroksit sudaki oksijenin açığa çıkmasını sağlayarak mikroorganizmanın yapısının bozulmasına sebep olmaktadır. Genellikle ticari H_2O_2 preparatları %35'lik olarak satılmakta olup buradan alınan kimyasal, su ile seyreltilerek kullanılmaktadır. Bitki Koruma Laboratuvarlarında hijyen için daha çok kullanılan diğer kimyasallar formalin, civa klorür ve %70'lik etil alkoldür. Tüm bu kimyasallar çamaşır suyuna göre daha pahalı olup özellikle formalin ve civa klorür çok zehirli kimyasallar olup kansere sebep olabilmektedir.

Üretimde kullanılan toprak ve içerdiği organik materyal fungal hastalık etmenleri için en önemli kaynaktır. Burada toprağın fungal hastalık etmenlerinden arındırılması gerekmektedir. Özellikle yoğun bir üretimin yapıldığı sera toprakları fungal etmenlerle bulaşık olduğu zaman sera içerisine çok miktarda yeni toprak taşınmalıdır. Ancak standart olarak böyle durumlarda kimyasal fumigantlar veya solarizasyon uygulamasıyla toprak sterilizasyonu yapılmaktadır. Genelde kimyasal fumigasyonlarda metil bromid, alüminyum fosfit gibi çok zehirli ve pahalı kimyasallar kullanılmaktadır. Methyl bromid insan sağlığına toksik ve dünyamızın ozon katmanını yok ettiği için 2010 yılından itibaren tüm dünya ile birlikte Türkiye'de kullanımı yasaklanmıştır. Bu nedenle çevreye daha az zarar veren buhar ya da güneş ışığıyla toprağın pasterizasyonu yapılmalıdır. Toprak pasterizasyonunda genellikle su buharı diğer kimyasal fumigantlara göre tercih edilmektedir. Su buharı ile yapılan uygulamalarda toprakta yaşayan faydalı mikroorganizmalar da yok olduğu için seçici bir yöntem değildir. Su buharı uygulamalarında tıpkı su buharı püskürten ütülerde olduğu gibi güçlü su buharı püskürten metal levhalar hastalıklı toprak materyaline su buharını püskürterek yapılmaktadır. Toprak pastörizasyonunda toprağın en üst kısmı en fazla sıcaklığın yüksek oldu-

ğu kısım iken toprağın derinliklerine inildikçe su buharının sıcaklığı azalacağından dolayı toprağın sıcaklığı daha az olacaktır. Burada su buharına alternatif olarak toprak hijyeni için seçici herbisit ve fungisit uygulamaları da yapılabilir. Ancak Akdeniz kıyı sahil kesiminde seralarda yapılan uygulama daha ziyade solarizasyon uygulamasıdır. Seralar üretim dönemi sonunda genellikle Haziran başında sera toprağı salma sulama ile sulanarak iletkenliği artırılır. Sonra toprağın üzeri şeffaf polietilen ile kapatılarak plastiğin kenarlara gelen kısımları da sıcaklık kaçışını önlemek için toprakla sıkıca kapatılır. Sera kapıları ve havalandırma açıklıkları kapatılarak sera içerisine giren enerjice fakir uzun dalga boylu ışınların kırılarak enerjice zengin ışınlara (IR) dönüşmesi sağlanır. Açığa çıkan bu enerji toprakta hapis edilir ki toprağın en üst katmanında sıcaklık 80-90 °C ulaşırken, 40-50 cm derinlikte toprağın sıcaklığı 40-50 °C olmaktadır. Başarılı solarizasyon uygulaması 60 ya da 90 günlük olarak önerilmekte olup toprakta bulunan tüm hastalık yapan mikroorganizmaların yok olmasına sebep olurken, buradaki tüm nematod, zararlı ve yabancı otların ölümüne sebep olmaktadır. Ayrıca solarizasyon uygulaması toprakta bulunan ham kaya fosfatı gibi minerallerin bitki tarafından alımını da kolaylaştırmaktadır. Solarizasyon uygulamasıyla toprağa hijyen kazandırılırken özellikle taban suyu yüksek olan sera topraklarına 90 günlük solarizasyon tavsiye edilmektedir.

Bitkisel üretimde kullanılan sulama suyu ile fungal hastalıklar kolayca yetiştirilen bitkilere ulaşmaktadır. Sulama suyu genellikle barajlardan, sulama göletleri, sondaj kuyuları ve depolanan yağmur sularından oluşmaktadır. Irmaklar gibi akıcı olmayan bu su kaynakları örneğin yağmur suları, *Phythium* ve *Phytopthora* gibi fungusların gelişimi için ideal yerlerdir. Bu tür rezerve su kaynakları kullanılırken 30 dakika boyunca uygulanan az miktardaki klor (1µl L^{-1}) toprak kökenli çökerten hastalıklarının kontrolünü sağlayacaktır.

Bitki materyalinin hijyeni buraya kadar belirtilen hiyen uygulamaları içerisinde en hassas olan noktadır. Bitki materyali içerisinde tohum, fide, kalem, anaç ve depo kökler gibi üretim materyali yer almakta olup bunların hastalık etmenlerinden ari olması gerekmektedir. Fungal hastalık etmeni bulundurmayan bitki materyallerinin sertifikalarla belgelendirilmiş olması gereklidir. Bitki materyalinde kontaminasyondan kuşkulanılıyorsa yüzey sterilizasyon uygulanmalıdır. Hastalıklı bitkiler ıskartaya çıkartılmalı ve yakılmalıdır. Iskartaya çıkartılmış fideler kompost yapımında kullanılıyorsa, bu hastalıklı bitkilerin günlerce 60 °C nin üzerinde kompostta bekletilerek içerisindeki fungal etmenlerin tamamen yok edilmesi sağlanmalıdır.

Üretim alanlarına fungal hastalıklar en çok ayakkabı ve giysilerle taşınmaktadır. Böyle durumlarda en iyi hijyen yöntemi çalışanların

özel çizme ve giysileri ile üretim alanlarına girmeleri gerekir. Özellikle üretim yerinin girişine konulan %10'luk çamaşır suyu içeren leğene çizmeler bandırılarak çalışanlar ve ziyaretçiler üretim alanına alındığında toprak kaynaklı fungal hastalıklara karşı dezenfeksiyon sağlanmış olacaktır. Bitkisel üretimlerde oluşabilecek fungal hastalıklar ve bunların hijyenik kontrolünü sağlayan basit teknikler Çizelge 1'de sıralanmıştır.

Çizelge 1. Fide üretimi öncesi ve üretim sırasında görülen fungal hastalıkların kontrolünde kullanılan hijyen yöntemleri ve pratik uygulamaları

Uygulamanın adı	Yöntemi
1. Toprak/fide harçlarının pastörizasyonu	
Buhar pastörizasyonu	Toprağa uygulanan sıcak buhar ile toprakta bulunan tüm hastalık yapan ve faydalı fungal etmenler pastörize edilir. Sıcak buhar toprağa 30 dakika uygulanarak tüm fungal, bakteriyel ve viral etmenler yok edilir.
Solarizasyon	Sera içerisinde şeffaf plastik kullanılarak yapılan uygulama sonucunda topraktaki tüm mikroorganizmalar yok edilir. Taban suyu yüksek topraklara 90 gün, normal seralara ise 60 günlük solarizasyon uygulaması yeterlidir.
2. Bitkisel materyalin yüzey sterilizasyonu	
Sıcaklık uygulamaları	Tohumlar, yumrular ve kökler 40-60 °C sıcak su içerisinde bekletilir. Sıcaklık uygulamaları bitki türüne göre değişebilir. Düşük sıcaklıklarda uzun süre, yüksek sıcaklıklarda ise kısa süre sıcaklık uygulamaları yapılmalıdır.
Klor uygulaması	Üretim materyali olan tohumlar, çelikler, aşı materyalleri %10'luk hazırlanan çamaşır suyu içerisinde bekletilir.
Fungusit uygulamaları	Tohumlar, çelikler ve diğer bitki organları fungisitler ile kaplanarak yapılmaktadır. Tohumluk materyal genellikle sistemik fungisitle kaplanarak dış yüzeyde ve içeride bulunan patojenlerin yok olması sağlanır. Son yıllarda alternatif olarak tohumların yüzeyleri *Trichoderma harzianum* ve *Pseudomonas* spp. ile kaplanarak fungal hastalıklar kontrol altına alınmaktadır.
3. Sulama suyunun dezenfeksiyonu	
Çamaşır suyu kullanımı	Bitkileri sulamak için kullanılan suyun dezenfeksiyonu için ticari çamaşır suları kullanılır. Normalde %3.5 olan çamaşır suyundan 10 tonluk bir su tankına yaklaşık 500 ml konularak yapılır.

Çizelge 1 (devam). Fide üretimi öncesi ve üretim sırasında görülen fungal hastalıkların kontrolünde kullanılan hijyen yöntemleri ve pratik uygulamaları

Uygulamanın adı	Yöntemi
4. Sağlıklı bitki gelişimi	
Bitki sağlığı	Sağlıklı bitkiler dengeli gübrelenerek ve düzenli sulanarak elde edilirler. Bu bitkiler fungal hastalıklar ve zararlılardan daha az etkilenirler. Aşırı azotla gübrelenen bitkiler fungal hastalıklara daha hassastır.
Bitki yoğunluğu	Birim alana ekilen yoğun tohum veya fideler güneş ışığı ve besin maddeleri için birbiriyle rekabet halindedir. Ayrıca bu bitkiler arasında oluşan yüksek nispi nem ve sıcaklık fungal hastalıkları teşvik edecektir.
Bitki yapılarının sertleşmesi	Araziye dikilen fidelerin pişkinleşerek gelişmeleri fungal hastalıklardan daha az etkilenmelerini sağlar.
Dayanıklı tür ve çeşitler	Mümkünse üretimde dayanıklı bitki türleri ya da çeşitleri kullanılmalıdır. Fungal hastalıklara hassas çeşitler kullanılmamalıdır.
Vejetatif üretim materyali ve alet ekipman temizliği	Aşı ya da daldırma gibi vejetatif üretimlerde kullanılan bitkilerin fungal hastalıklardan ari olması gerekir. Kullanılan çakı, bıçak ve makaslar alkol veya çamaşır suyu gibi uygun dezenfektanlar ile dezenfekte edilip kullanılmalıdır.
Çalışanların eğitimi	Rutin uygulamalarda çalışanların fungal hastalıklara karşı eğitimden geçirilmesi ve hastalık belirtilerini tanıması sağlanmalıdır.

Sebze ve meyve tohumlarını toprak kökenli ve tohum kökenli fungal hastalıklardan koruyabilmek daha sonraki gelişme aşamalarında görülebilecek fungal enfeksiyonları önleyebilmek için etkili tohum uygulamaları gereklidir (Babadoost, 1992). Tohumlara yapılan fiziki uygulamalardan bazıları (örneğin; bitki ekstraktları, doğal kimyasallar, biyokontrol ajanları) fungal hastalık etmenlerini başarı ile kontrol edebilmektedir. Bu tür tohum uygulamaları fungal etmenden ari sağlıklı tohum kullanımının yerini alamasa da kabukları zarar görmüş, düşük çimlenme gücüne sahip tohumların gelişimini artırmakta, uygun olmayan şartlarda toprakta tohumların gelişiminin gecikmesine yardımcı olmaktadır (Mancini ve Romanazzi, 2014). Tohumlara yapılacak fiziki uygulamalar sadece tohumun içindeki fungal etmenin kontrolünü sağlamayacak aynı zamanda tohum yüzeyindeki fungal etmenlerin miktarının azalmasını da sağlayacaktır. Özellikle tohum içinde veya yüzeyinde bulunan fungal patojene göre

tercih edilecek uygulamalarla tam bir dezenfeksiyon sağlanabilecektir. Tohum dezenfeksiyonu fungus sporları ve yüzeyde bulunan diğer mikroorganizmaların elemine olmasını sağlarken, hastalıklı topraklarda bulunan fungal patojenlerin bitkiye penetrasyonunu engellemekte ve tohum çevresinde güvenli bir alanın oluşmasını sağlamaktadır.

Tohumun korunmasına yönelik tüm uygulamalar toprak ve hava kökenli hastalık yapan, *Pythium*, *Fusarium* ve *Rhizoctonia* gibi etmenlerin oluşturduğu tohum çürüklüğü, çıkış öncesi çökerten ve tohum yanıklığı gibi çok çeşitli ürünlerde görülen hastalıklardan korumaktadır. Bu amaçla tohumlara yapılacak uygulamalar ve etkileri Çizelge 2'de verilmiştir. Hijyen kimyasalları tohum dezenfektanları, dezenfaktanlar ve koruyucular olmak üzere sınıflandırılabilirler. Bu sınıflandırmada belirleyici olan tohum üzerinde bulunan patojen organizmanın yeridir. Tohum dezenfektanları tohum yüzeyinde bulunan sporları inaktive ederler. Dezenfektanlar tohumun kabuğundan daha derinde olan patojenleri yok ederler. Koruyucu kimyasallar ise tohumu bulunduğu yerde ya da topraktan saldıran patojenlere karşı korumaktadırlar.

Tohumlara yapılan etkili uygulamalar tohum kaynaklı hastalık etmenlerinin miktarının azalmasına ya da tamamen eradike olmasını sağlayacaktır. Bu uygulamalar aynı zamanda tohumların hasadı esnasında oluşabilecek kantitatif ve kalite ile ilgili problemlerin önüne geçilmesinde, toprak kaynaklı hastalıkların önlenmesinde ve tohumla yayılan fungal patojenlerin kontrolü için vazgeçilmezdir. Fungisitlerle yapılacak klasik tohum uygulamaları yanında alternatif çevre dostu tohum uygulamaları hastalık etmenleriyle mücadeleyi artıracaktır. Günümüzde geçmişten beri kullanılan sıcak su ile birlikte biyolojik kontrol ajanı uygulamaları tohum kaynaklı fungal hastalıklarında başarıyı artırmaktadır. Çünkü doğal ürünler olan bu kimyasallar sahip oldukları antimikrobiyal özellikleriyle tohum üzerinde fungal inokulum kaynağının azalmasına, tohumun daha güçlü çimlenmesine ve entegre mücadele yöntemlerinin daha uygun bir şekilde kullanılmasını sağlamaktadır.

Tohumlara yapılan fungisit uygulamaları ya da alternatif kimyasallar bitki koruma açısından hijyeni sağlayan iyi uygulamalar olup toprak kökenli patojenlere karşı dezenfeksiyonu sağlamaktadır. Bu uygulamaların başarısı tohum üzerindeki patojenin bulunduğu yere bağlı olarak değişmekle birlikte tüm tohum uygulamaları ürün üzerinde kaliteyi artırarak daha fazla ürün elde edilmesine olanak vermektedir.

Çizelge 2. Fide üretimde kullanılan tohumlara yapılan uygulamalar ve bu uygulamaların fungal hastalık etmenlerine olan etkileri

Uygulamanın adı	Yöntemi
1. Fungisit uygulamaları	
Kükürt, bakır ve civa içeren inorganik fugisitler	Tohumların üzerini kaplamak suretiyle kullanılan bu inorganik fungisitler, çevreye olan olumsuz etkileriyle bilinmektedirler. Bu yüzden civa gibi ağır metal içeren fungisitlerin kullanımı günümüzde yasaklanmıştır.
Sistemik fungisitler	Sistemik fungisitler ürünlere, hayvanlara ve çevreye daha az zarar vermekte olup, toprakta mikroorganizmalar tarafından parçalanarak ayrıştırılmaktadırlar. Dolayısıyla toprakta birikme sorunu olmayan geniş spektrumlu kimyasallardır.
2. Fiziksel uygulamalar	
Sıcak su, sıcak hava ve elektron uygulamaları	Termoterapi olarak bilinen bu yöntemde tüm patojenler bitki materyali üzerinde yok edilmektedir. Bu amaçla fiziksel uygulamaları gerçekleştirebilmek için tahıl ve sebze tohumlarında uygulama ekipmanlarının geliştirilmesine çalışılmaktadır.
3. Biyopestisit uygulamaları	
Bitki ekstraktları ve doğal ürünler	Bitkilerden elde edilen antimikrobiyal özelliğe sahip maddeler bu amaçla kullanılmaktadır. En yaygın olarak funguslara karşı kekik, biberiye, nane, karanfil, sarımsak eterik yağları bitki patojeni funguslara karşı kullanılmaktadır. Ayrıca chitosan gibi pek çok biyopolimer kullanılabilir
Biyokontrol ajanlarının kullanımı	Bitki patojeni funguslara karşı biyolojik kontrol sağlayan mikroorganizmalardır. Bir veya daha fazla mikroorganizmayla birlikte kullanılmakta olup tamamen çevre dostu ajanlardır. Suni olarak çoğaltılarak tohumlara uygulanan *Trichoderma* spp. *Pythiıum*, *Phytopthora*, *Rhizoctonia* ve *Fusarium* toprak kökenli patojenlere karşı korumaktadır.

2.1. SEBZE TOHUMLARINDAN FUNGUS TESPİTİ VE TANISI

Sebze tohumlarında fungal hastalık etmenlerinin belirlenmesi ayrı bir öneme sahiptir. Genellikle enfekteli tohumlar herhangi bir belirti göstermediği için temiz olarak kabul edilmekte ve çok uzak mesafelere götürülerek satılabilmektedirler. Bu durumda oluşabilecek ürün kayıplarından, gereksiz fungisit uygulamalarından kurtulmak, ilaçlama maliyetlerini düşürmek, çevreye serpilen toksik mad-

deleri önlemek ancak tohum üzerindeki fungal hastalıkların tespiti ile mümkündür. Tohumla taşınan fungal patojenler tohum üzerinde çok ciddi sorunlara sebep olmakta, tohumun uzun süre canlılığı, yeni üretim alanlarında yetiştirilmesi, bu alanlardaki yaygınlığını sınırlamaktadır. Böyle durumlarda tohumlardan fungal patojenlerin elemine edilmesi en uygun mücadele yöntemi olarak karşımıza çıkmaktadır. Beraberinde tohumlardaki hastalık etmenlerinin tespitini sağlayan testler yapmak, hastalıklı tohumları ekmeden önce temizlemek ya da kontamine tohumları çiftçi ve üreticilerin kullanımına sunmamak tohum kaynaklı fungal etmenlerle mücadele başarısını artıracaktır. Günümüzde küresel olarak yapılan tohum ticaretinde tohum kaynaklı patojenlerin yayılmasının önlenmesi ana hedef olarak gösterilmektedir. Bu amaca ulaşabilmek ancak tohum kaynaklı patojenlerin kesin olarak tespiti ve tohum sağlığını destekleyici stratejilerin uygulanmasından geçmektedir. Seçilen yöntemler güvenilir, hızlı, ucuz maliyetli, tekrarlanabilir ve hassas sonuçlar verebilmelidir.

Tohumla taşınan fungal hastalıkların belirlenmesinde bekletme (inkübasyon) ve yetiştirme (geliştirme) metotları klasik olarak kullanılan tekniklerdir. Nitekim bu uygulamalar basit, zaman gerektiren, tohumdaki düşük enfeksiyonları ortaya koyabilen, kendine özgü uzmanlık gerektiren teknikler olsa bile son yıllarda nükleik asit temelli yeni analiz teknikleri tohumlar üzerindeki fungal hastalıkların belirlenmesinde kullanılmaktadır. Bu DNA temelli teknikler hassas ve fungus türüne spesifik teknikler olup en yaygın olarak klasik polimeraz zincir reaksiyon (Polymerase chain reaction: PCR) tekniği kullanılmaktadır. PCR temelli metotlar düşük miktarda fungus ile kontamine tohumların, çok sayıda farklı fungus türlerinin, hızlı, güvenilebilir ve tekrarlanabilir şekilde tohumlardan belirlenmesini sağlamaktadır. Doğru ve hızlı olarak fungal patojenlerin tespiti ve sonrasında uygulanacak hijyen ve terapi ile tohumlar üzerindeki fungal etmenler kontrol edilebilmektedir. Fungal hastalık etmenlerinin tohumlarda tanılanmasında klasik, serolojik ve moleküler yöntemler yaygın kullanılmaktadır. Bu yöntemler aşağıda sıralanmıştır.

1- Görsel testlemeler: Bazı fungal patojenler tohumlar üzerinde çıplak gözle ya da düşük büyütmelerde görülebilen belirtiler oluşturmaktadırlar (Chen ve ark., 2007). Tohum üzerindeki belirti kesin bir fungus türüne özgü olabilmektedir; tohumla taşınan fungal patojenler tohum çürüklüklerine, nekrozlara, büzülmelere, çatlamalara ve renk değişikliklerine sebep olmaktadır. Bu fungus türleri örneğin soya tohumlarında renk değişikliklerine (*Phomopsis* spp), kırışıklıklara *(Cercospora sp*) ve çatlamalara (*Fusarium* spp) sebep olduğu için çoğunlukla çıplak gözle görsel olarak tanımlanırlar. Bu tohumlar üzerindeki fungus yapıları ayrıca stereo mikroskop altında incelenerek tanımlamaları yapılmaktadır. Mik-

roskopta tohum yüzeyinde bulunan sürme, rastık, mildiyö, külleme, ve pas fungal etmenleri kolayca tanımlanmaktadır. Tohum yüzeyinde fungusun kışı geçirme yapılarının bulunması, eşeyli üreme yapılarının varlığı; örneğin; soya tohumlarında *Peronospora manshurica*'nın oosporlarının kabuk yapıları, biber tohumlarında *Colletotrichum dematium*'un acervuli ve mikrosklerot yapıları, kereviz tohumlarındaki *Septoria apii*'nin oluşturduğu piknidia yapıları ile funguslar mikroskopta tanımlanabilmektedir. Ancak çoğu zaman tohumlardaki fungal enfeksiyonlar gözle görülebilen makroskobik belirtiler oluşturmamaktadır. Tohum yıkama tekniklerinin görsel testlemelerle birleştirilmesi sonucunda tohum yüzeyinde bulunan mikrosporlar, miseller ve diğer fungal yapılar belirlenebilmektedir (Çizelge 3).

Çizelge 3. Mikroskop yardımıyla tohum üzerindeki fungusların belirlenmesi

Yöntemin adı	Uygulamanın kullanımı
Yıkanan tohumların incelenmesi	Tohum yıkaması testinde 50 tohum, içerisinde 10 ml steril distile su bulunan tüp içerisine konur. Birkaç damla sıvı deterjan ya da %95 etil alkol ilave edilir. Örnekleri içeren tüpler yavaşça karıştırıcıda 10 dk çalkalanır. Süspansiyon 1000 rpm de 10 dk santrifüj edilir. Pelet 2 ml steril su içerisinde çözülerek mikroskopta incelenir.
Tohumun sodyum hidroksit (NaOH) içinde ıslatılması	Bu yöntemde tohumlar %0.2-0.3 lük NaOH içerisinde 25-30 °C sıcaklıkta 24 saat bekletilir. Ertesi gün örnekler çeşme suyu ile iyice yıkanıp kurutma kağıdında fazla suyu alınır. Tohum yüzeyindeki renk değişimleri mikroskopta incelenir.
Bütün embriyonun sayılması	Enfekteli 100-120 g tohum %5 NaOH ve %0.02 trypan blue içeren suda 24 saat bekletilir. Tohum kabuğundan ayrılan embriyolar 1 mm meshlik süzgeçte toplanır, ılık su ile yıkanır. Embriyolar içerisinde 1 hacim (v) su: 1 v glycerol solüsyonuna bırakılır. Buradan alınan embriyolar, içerisinde 50 ml laktik asit bulunan behere konularak 5 dk kaynatılır ve taze glycerol içerisine konur. Embriyolar anilin-blue ile boyanarak mikroskopta incelenir.

Bunun için distile steril su içerisine tohum yüzeyindeki tüm fungal yapılar toplanmakta, oluşan süspansiyon santrifüjden geçirilerek elde edilen tortu lamın üzerine konularak mikroskopta incelenmektedir. Gerektiğinde bu tortu hemositometre üzerine konularak tohum yüzeyinde bulunan fungal spor konsantrasyonu belirlenebilmektedir (Agarwal ve ark., 2006).

2- İnkübasyon metotları: Tohumla taşınan fungal patojenlerin belirlenmesinde en yaygın kullanılan yöntemlerden birisi olup tohum yüzeyinde fungusların %1 den fazlası taşınmaktadır. Bu nedenle tohumlar uygun besi ortamı ya da besi ortamı emdirilmiş filtre kağıtları içeren petrilere yerleştirildiklerinde funguslar burada gelişmekte ve sporlar üretmektedir. Bu yöntemle tohum üzerinde hastalık yapabilen sporların miktarı da tam olarak ortaya konulabilmektedir. Fungal gelişme ve sporulasyon hazırlanan spesifik veya seçici besi ortamları, petrilerin yerleştirildiği ortamın sıcaklığı, farklı gece ve gündüz aydınlatmalarına bağlı olarak 2 ile 10 gün arasında gerçekleşmektedir. Standart tohum testlemelerinde 400 tohum kullanılmaktadır. Ancak bu testlenecek rakam tohum miktarına göre değişebilmektedir (Rao ve ark., 2006). Genellikle saprofitik funguslar tohum yüzeyinde mevcut olup bu mikroorganizmalar besi ortamı üzerinde gelişebilmektedir. Bu saprofitik mikroorganizmaları elimine etmek için tohum yüzey dezenfeksiyonu gerekmektedir. Dezenfekte edilen tohumlar genellikle agar ortamına konularak inkübe edilmekte olup çoğunlukla seçici olmayan patates dekstroz agar (PDA) ve malt ekstrakt agar kullanılmaktadır. Fakat bazen funguslar bu agar ortamlarında spor üretmemektedir. Böyle durumlarda fungal sporulasyonu teşvik için daha az besin içeren su agar veya cornmeal agar besi ortamları kullanılmaktadır (Afouda ve ark., 2009). Asidik agarlar, seçici ve yarı seçici ortamlar bakteriyel ve saprofitik fungusların gelişimini önlemektedir. Bu tür seçici ortamların hazırlanmasında ortama antibiyotikler örneğin streptomisin sülfat, penisilin, fungisitler örneğin benomyl veya başka kimyasallar örneğin bromophenol blue ilave edilmektedir. Bu özel ortamda sadece istenen fungus gelişeceği için seçici ortamlar fungus türünün net olarak belirlenmesini sağladığı için ilave tanılamaya gerek bulunmamaktadır. Besi ortamlarında inkübasyon süresi sonunda gelişen funguslar stereo mikroskop altında fungus kolonileri, makroskopik ve mikroskopik karakterlerine, spor yapılarına bakılarak tanımlanmaktadırlar (Ora ve ark., 2011).

3- Serolojik testler: İmmulojik testler olarak bilinen bu testlerde tohumla taşınan funguslara karşı üretilen poliklonal ya da monoklonal antibodiler kullanılmaktadır. Özel olarak üretilen bu antijenler fungusun enzimatik olarak ürettiği maddelere bağlanarak flourescent reaksiyonlar ortaya koymaktadır. Tohumla taşınan *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Fusarium* fungusları mikotoksin üreten fungal patojenlerdir. Bu fungal patojenlerin teşhisinde enyzme-linked immunosorbent assays (ELISA) testleri yaygın olarak kullanılmaktadır. ELISA testleri kullanımı daha çok tohumlarda bulunan fitopatojenik virüs ve bakterilerin tanısında yaygındır.

4- PCR temelli fungal testler: PCR temelli testlerin çok sayıda faydası bulunmaktadır. Bu moleküler test yöntemi hızlı, spesifik, hassas sonuçlar vermekte olup bu sonuçların fungal hastalık etmenleri için yorumları nettir. Tohum üzerinde taşınan fungal etmenlere karşı çok sayıda PCR tabanlı testler geliştirilmiştir. Günümüzde bu testler sayesinde mercimek tohumlarındaki *Ascochyta lentis*, havuç tohumlarındaki *Alternari radicina*, Lahanagil bitki tohumlarındaki *Alternaria brassicae*, kanola tohumlarındaki *Leptosphaeria maculans* fungal etmenlerinin dünyadaki durumları kolayca takip edilmektedir (Chen ve ark., 2010). PCR temelli metotlar ayrıca hızlı, net sonuçlar ürettirirken, birbirine çok yakın ayrılamayan alttürlerin teşhisini sağlamaktadır. Halbuki alışılagelmiş yöntemlerle domates tohumlarındaki hastalık yapan *Fusarium oxysporum* fsp. *lycopersici* izolatları ile patojenik olmayan *Fusarium oxysporum* izolatları dahi ayrılamamaktadır (Baayen, 2000). Her ne kadar PCR testlerinin çok sayıda avantajı olsa da tohum üzerinde çok az miktarda fungal kontaminasyon varsa sonuçlar negatif çıkabilmektedir. Bu tekniğin en büyük handikabı tohum üreticileri ve tohum ticareti yapan firmalar için tohum üzerinde ne miktarda bulaşıklığın olduğunu ortaya koyamayışıdır.

5- Bio-PCR: Genellikle sebze tohumları funguslarla çok az miktarda bulaşık olduğunda istenen sonuçlar elde edilememektedir. Bu problemin üstesinden gelebilmek için tohumlardan elde edilen fungusun biyolojik kütlesi önce bekletilerek gelişmesi sağlanmakta sonra DNA izolasyonu yapılarak PCR ile test edilmektedir (Schaad ve ark., 1995). Bu yöntemde özellikle bakteri ve funguslar önce izole edilerek 2-3 gün uygun besi ortamında geliştirilmektedir. Biyolojik olarak çoğaltılan bu mikroorganizmalardan DNA'lar izole edilerek PCR da analizleri yapılmaktadır. Çok sayıda fungal hastalık etmeni sebze tohumlarından izole edilerek sıvı besi ortamında geliştirildikten sonra BİO-PCR ile analiz edilmiştir (Munkvold, 2009). BİO-PCR yönteminde çoğaltılan canlı fungus hücreleri kullanıldığı için hassaslık artırılmış olup PCR reaksiyonlarındaki inhibitörler ortadan kaldırılmıştır. Bu yöntemle ölmüş ya da saprofitik funguslar tohum üzerinden alınırken elemine edildiği için izole edilen fitopatojenik fungus seçici besi ortamında çoğaltılmakta ve PCR analizi yapılmaktadır. Çok hassas olan bu yöntemin tek dezavantajı fungusun geliştirildiği seçici besi ortamının daha pahalı olmasıdır.

6- Nested PCR: Sebze tohumlarında düşük kontaminasyonun olduğu durumlarda kullanılan bir diğer analiz Nested PCR yöntemidir. Bu yöntemde önce hassaslık ve sonrasında özelleşme arttırılır. Bunun için klasik PCR ile az miktarda olan spesifik DNA parçası çoğaltılır;

örneğin fasulye tohumlarında az miktarda bulunan antraknoz fungal etmeni *Colletotrichum lindemuthianum*'un DNA'sı çoğaltılır, sonrasında çoğaltılan bu DNA'lar kullanılarak patojen fungusun hedeflenen DNA parçası PCR ile üretilmektedir (Chen ve ark., 2007). Fungusların tanılanmasında en hassas yöntemlerden birisi olup daha fazla çaba ve maliyete ihtiyaç vardır.

7- Real-Time PCR: Bu Real-Time PCR yöntemde kullanılan spesifik fluorescent boyar maddenin optik bir göz sayesinde okunmasıyla gerçek zamanlı analizler yapılmaktadır. Oluşan kimyasal reaksiyonların kinetik analizleri hedef DNA miktarlarını kantitatif değer olarak sunmaktadır. Bu kantitatif değerler sebze tohumlarının ne miktarda ve oranda bulaşık olduğunu açıkça göstermektedir. Bu Real-Time PCR tekniği kısa zamanda, hassas ve tekrarlanabilir sonuçların üretimini sağladığı için günümüzde en güvenilir moleküler yöntem olarak kabul edilmektedir (Chilvers ve ark., 2007). Örneğin ıspanak tohumlarını enfekte eden *Verticillium dahliae,* lahana tohumlarını enfekte eden *Alternaria brassicae*, soğan tohumlarındaki *Botrytis* spp fungal patojenleri Real-Time PCR ile tespit edilerek sebze tohumlarındaki enfeksiyon miktarları kantifike edilmiştir (Duressa ve ark., 2012; Chilvers ve ark., 2007).

8- Manyetik captured hibridizasyon (MCH)-PCR: Bu yöntemde DNA izolasyonunda ekstra bir saflaştırma yapılmakta oluşturulan tek sarmal DNA prob (manyetik elementle işaretlenmiş) ile hibridize edildikten sonra PCR amplifikasyonu ile hedeflenen DNA çoğaltılmaktadır (Reeves, 1998). Bu yöntem özellikle PCR amplifikasyonlarını engelleyen kimyasalları üreten örneğin soğan tohumlarında *Botrytis aclada* gibi fungal patojenlerin tespitinde başarı ile kullanılmaktadır (Walcott ve ark., 2004). Böylece MCH-PCR tekniğiyle hedeflenen fungusun tespiti 10 ile 100 kat artırılmış olmaktadır.

9- Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): Bu yeni yöntem nükleik asit amplifikasyon temelli olup büyük miktarda spesifik DNA'nın kısa süre içerisinde üretimine olanak sağlamaktadır (Mancini ve ark., 2016). Bu teknik Notomi ve ark (2000) tarafından geliştirilmiş olup düşük maliyeti ve hızlı sonuç vermesi nedeniyle gelecekte PCR metoduna alternatif olarak görülmektedir. LAMP yönteminde ayrıca termal blok cihazına gereksinim olmayıp bir çiftten 6 çifte kadar oligonükleotit primerlerine ihtiyaç vardır. Bu primerler DNA polymerazla geniş bir alanda bulunan spesifik hedef gene yapışarak hibridize olmaktadırlar. LAMP ürünleri jel elektroforez sisteminde

görüntülenebileceği gibi Real-time yoğunluk ölçümleme cihazında ortama ilave edilen boyalar (örneğin; SYBR green) ile fitopatojenik fungusun varlığı oluşan renk değişimiyle belirlenebilmektedir.

10- Yeni nesil dizileme (Next generation sequencing: NGS): Yeni nesil dizileme teknolojisi çok kısa sürede tohum üzerinde bulunan hastalık etmenini hem tanılamakta hem de karakterize edebilmektedir. Bu NGS teknolojisiyle hastalık etmeninin tüm genom yapısı ortaya çıkarıldığı için güvenilir olarak tohumu enfekte eden fungal patojenler ortaya konmaktadır (Nicolaisen ve ark., 2014). Yeni nesil dizileme teknolojisiyle klonlama ve PCR aşamaları en yüksek düzeyde ve DNA amplifikasyonları en verimli şekilde otomatik olarak gerçekleştirilmektedir. Günümüzde farklı firmaların ürettiği NGS sistemlerinde 80-120 Mb sekans 200-300 bp okumalar ile 4 saatte, 3-4 Gb sekans 25-35 bp uzunluğundaki okumalar ile 5 gün içerisinde tamamlanabilmektedir (Barba ve ark., 2014; Kumar ve ark., 2020).

Günümüzde tohum sağlığı uluslararası tohum ticaretinde karantinaya tabi önemli bir konu olup tohuma zarar verecek fungal patojenlerin üretim materyalinde bulunmaması istenmektedir. Bu nedenle tohumla taşınan mikroorganizmaların spesifik tespiti ve bunları sağlayan hassas, basit, hızlı, düşük maliyetli ve tekrarlanabilir yöntemler geliştirilmesi günden güne daha önemli hale gelmektedir. Böylece tohum kaynaklı fungal patojenlerin oluşturduğu zararın önüne geçilebilecek, tohumu taşınma aracı olarak kullanan fungal patojenlerin yeni üretim alanlarına girmesi ve buralarda yayılması önlenebilecek, tohum kaynaklı fungal hastalıkların oluşturmuş olduğu yıkıcı epidemilerin önüne geçilebilecektir.

3. TOHUMLA TAŞINAN BİTKİ BAKTERİ HASTALIKLARINDA HİJYEN VE TERAPİ YÖNTEMLERİ

Tohum karmaşık bir yapıya sahip olmasının yanı sıra, patojen ve saprofit nitelikte olan mikroorganizmalar ile birarada bulunabilmektedir. Tohum uygulamaları, tohum ve toprak kökenli mikroorganizmaların zararını önlemek veya azaltmak için kullanılan yöntemlerdir. Tohumla taşınan önemli bakteriyel etmenler ve tohumda yaşam süreleri Çizelge 4'te sıralanmıştır.

Çizelge 4. Tohumla taşınan önemli bakteriyel etmenler

Bakteri türü	Sebze türü	Tohumda yaşam süresi (yıl)
Acidovorax citrulli	Kabakgiller	30
Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis*	Domates	30
Curtobacterium flaccumfaciens pv. *flaccumfaciens*	Fasulye	8-24
Pectobacterium caratovorum subsp. *caratovorum*	Birçok sebze	19
Pseudomonas cichorii	Marul	20
Pseudomonas corrugata	Domates	-
Pseudomonas syringae pv. *apii*	Maydanoz, Kereviz	1
Pseudomonas syringae pv. *lachrymans*	Hıyar	1
Pseudomonas syringae pv. *maculicola*	Lahana, Karnabahar	3
Pseudomonas syringae pv. *glycinea*	Soya fasulyesi	2
Pseudomonas syringae pv. *phaseolicola*	Fasulye	2-3
Pseudomonas syringae pv. *pisi*	Bezelye	3
Pseudomonas syringae pv. *syringae*	Birçok sebze	1-10
Pseudomonas syringae pv. *tomato*	Domates	20
Ralstonia solanacearum	Domates, Biber	
Xanthomonas campestris pv. *campestris*	Lahana	3
Xanthomonas campestris pv. *cucurbitae*	Kabakgiller	8
Xanthomonas campestris pv. *glycines*	Soya fasulyesi	10
Xanthomonas campestris pv. *phaseoli*	Fasulye, Soya fasulyesi	15
Xanthomonas campestris pv. *raphani*	Lahanagiller	-
Xanthomonas euvesicatoria	Domates, Biber	10
Xanthomonas campestris pv. *vitians*	Marul	15

3.1. Mekanik Yöntemler

Tohum partilerinde toprak parçacıkları, bitki artıkları ve çeşitli hastalıklara neden olan mikroorganizmalar bulunabilir. Bu yöntem, tohum partilerinde patojenlerin enfeksiyonları nedeni ile rengi, şekli ve görünümü değişmiş, zarar görmüş tohumların mekanik olarak ayrılması esasına dayanır. Bu nedenle tohumların hastalıklı olmaması için çok iyi temizlenmesi gerekmektedir. Örneğin; solgun, kalitesi düşük, hafif ve bakteri ile bulaşık (*Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*) fasülye tohumları suda bekletildiğinde bu tür hastalıklı tohumlar su yüzünde kaldığından elle temizlenebilir. Bu yöntem özellikle baklagiller tohumunda yoğun bulunan hastalıkların uzaklaştırılmasında kullanılabilir. Ayrıca, sebze tohumu ekstraksiyonu ile bulaşık meyve eti kısımlarının ayıklanması tohum kaynaklı bakteri miktarını azaltmaktadır. Bu uygulama ile domates tohumlarında *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* enfeksiyonları oldukça azaltılabilmektedir (Thyr ve ark., 1973).

3.2. Biyolojik Mücadele

Biyolojik mücadele, aktif ya da dormant durumdaki bir patojenin hastalık oluşturma yeteneğinin veya miktarının bir veya birden çok organizma ile azaltılmasıdır. Tohumda bulunan bakterilerle mücadelede kullanılan bir yöntem doğa dostu faydalı mikroorganizmalar kullanarak tohumdaki bakterileri azaltmak ya da tamamen öldürmektir. Bu amaçla 1990'lı yıllardan günümüze kadar birçok çalışma yapılmış ve bu canlılar tohumlara uygulanarak etkinlikleri belirlenmiştir. Ancak, etkili bulunan bu canlıların piyasaya sürülmesi süreci oldukça zahmetli ve uzun zaman gerektiren araştırmalardır (Cook, 1993).

Çeşitli bakteri, fungus ve maya türleri bakteriyel hastalıkları azaltmak için tohumlara uygulanmıştır. Özellikle *Bacillus, Penicillium, Enterobacter, Pseudomonas, Serratia, Streptomyces, Chaetomium* ve *Trichoderma* cinsleri içerisindeki birçok mikroorganizma tohumlara uygulanmıştır (Agarwall ve Sinclair, 1987; Gordon-Lennox ve ark., 1987; Harman ve Nelson, 1994; Raupach ve Kloepper, 1998; Horuz ve Aysan, 2018; Horuz, 2021). 1999 yılında piyasada tohum uygulaması olarak patent almış ürünlerin %84'ü bakteriler ve %16'sı funguslardır. Bu ürünlerde daha çok *Pseudomonas*, *Bacillus* ve *Enterobacter* cinsi bakteriler ve *Phomopsis*, *Ectomycorrhizae*, *Trichoderma*, *Cladosporium* ve *Gliocladium* cinsi funguslar ruhsat almıştır. Bu cinslerin yanı sıra, hedef hastalığa karşı sorumlu patojenin mutantı yani patojen olmayan izolatı elde edilerek tohumlara uygulanmış ve oldukça başarılı sonuçlar elde edilmiştir (Johnson ve ark., 2011). Günümüzde dünyada kullanıma sunulmuş biyopestisitlerden bazıları Çizelge 5'te verilmiştir.

Çizelge 5. Dünyada kullanılan bazı biyopestisitler

Ticari adı	**İçerdiği faydalı mikroorganizma**	**Kullanıldığı hastalık(lar)**	**Kullanıldığı ürünler**
Serenade® Garden Disease Control Concentrate	*Bacillus subtilis* QST 713	Külleme, pas, bakteriyel leke, *Streptomyces scabies*	Sebzeler
Serenade® ASO	*Bacillus subtilis* QST 713	Külleme, ekşi çürüklük, mildiyö, yaprak lekeleri, bakteriyel leke	Sebzeler
Sonata®	*Bacillus pumilus* QST 2808	Külleme, pas, bakteriyel leke	Fidelikler, sera bitkileri ve tarlada yetiştirilen sebzeler
AgriphageTM	*Xanthomonas* spp. ve *Pseudomonas syringae* pv. tomato'nun bakteriyofajı	Domates ve biberde bakteriyel leke ve benek hastalıkları	Domates ve biber
Quantum 4000TM	*Bacillus subtilis*	*Rhizoctonia solani* *Fusarium* spp. *Alternaria* spp. *Aspergillus* spp.	Fidelikler, sera bitkileri
Concord	*Pseudomonas fluorescens*	Mantar bakteriyel leke	Kültür mantarı
Mycostop	*Streptomyces griseoviridis*	*Fusarium* spp. *Rhizoctonia* spp. *Alternaria* spp. *Pythium* spp.	Fidelikler, sera bitkileri ve tarlada yetiştirilen sebzeler
Rhizo-Plus	*Bacillus subtilis* FZB24	*Rhizoctonia solani, Fusarium* spp. *Alternaria* spp. *Sclerotinia* spp.	Fidelikler, sera bitkileri ve tarlada yetiştirilen sebzeler
Rhapsody®	*Bacillus subtilis* QST 708	Fungal ve bakteriyel hastalıklar; Antraknoz, kahverengi leke	Fidelikler ve sebzeler

Çizelge 5 (devam). Dünyada kullanılan bazı biyopestisitler

Ticari adı	İçerdiği faydalı mikroorganizma	Kullanıldığı hastalık(lar)	Kullanıldığı ürünler
Actinovate® AG	*Streptomyces lydicus WYEC 108*	*Pythium* spp. *Rhizoctonia* spp. *Phytophthora* spp *Fusarium* spp. *Verticillium* spp. *Botrytis* spp. *Sclerotinia* spp. *Monilinia* spp. *Alternaria* spp.	Sera, fidelikler ve pek çok kültür bitkisi
Plant Shield®	*Trichoderma harzianum* Rifai *KRL-AG2*	*Fusarium* spp., *Pythium* spp. ve *Rhizoctonia* spp.	Pek çok kültür bitkisi

Kullanılan bu mikroorganizmalar antagonizm, antibiosis, yetersiz besin, yer vb. durumlarda rekabet etme, parazitleme gibi çeşitli mekanizmalarla tohumu ve tohumdan gelişen fideyi hastalıklardan korumaktadır (Mukhopadhyay, 1994). Kullanılan biyopestisitler genellikle tek bir etki mekanizmasına sahiptir, bu nedenle birden fazla biyopreparatın kullanımı hastalıkla mücadelede başarı şansını arttırmaktadır.

Bitkide büyümeyi teşvik edici kök bakterileri olarak bilinen faydalı mikroorganizmalar bitkide büyümeyi teşvik etme, kök gelişimini arttırma, toprağı ıslah etme, bitkide stresi azaltma ve biyolojik gübre özelliği ile olumlu yönde etkilerde bulunurlar. Bu bakteriler, toprak kökenli hastalıklarla mücadelede patojeni ürettiği antibiyotiklerle direk öldürme, patojenlerle yer ve besin rekabetine girme ve bitkide sistemik dayanıklılığı teşvik etme gibi mekanizmaları kullanırlar (Horuz ve Aysan, 2018).

Tohumlara uygulanan biyolojik canlılar fungisitlerden farklıdır, bu nedenle bu canlıların topraktaki etkinliğini arttırıcı sistemler kullanılmalıdır. Biyolojik mücadele elemanlarının etkinliğini arttırmak için bazı genetik uygulamalar yapılabilir. Bakterilerde genetik uygulamalar yoluyla fenotipik ve genotipik değişikliklerle biyolojik mücadelenin etkinliğini arttırmak mümkündür. Örneğin; bakıra dayanıklılığı kodlayan plazmidler biyolojik mücadele elemanına aktarıldığında aynı anda hem biyopestisit hem de bakırın uygulanmasına olanak sağlar. Bir biyolojik mücadele elemanı düşük maliyetli, kolay uygulanabilir ve uzun süre depolanabilir özellikte olmalıdır. Bu biyolojik

ürünler oda koşullarında bir yıldan fazla kalabilmeli ve pek çok kültür bitkisinde kullanılabilmelidir (Harman, 1991).

Biyolojik mikroorganizmaların yanısıra son yıllarda tohum kaynaklı bakteriyel hastalıkların mücadelesinde bitki ekstraktları, bitki uçucu yağları ve organik asitler de çokça kullanılmaya başlanmıştır (Van Der Wolf ve ark., 2008; Chung ve ark., 2022). Bunların içerisinde farklı kekik türleri, ökaliptus, lavanta, tarçın, sarımsak, zencefil gibi çeşitli bitkilerin ekstrakt ve uçucu yağları pek çok bakteriyel hastalığın tohumdan uzaklaştırılmasında oldukça başarılı sonuçlar vermiştir (Dadasoglu ve ark., 2016; Karabüyük ve Aysan, 2019).

3.3. Fiziksel Mücadele

Tohum ya da diğer üretim materyallerinde bulunan patojenleri uzaklaştırmak için kullanılan termoterapi olarak da bilinen fiziksel mücadele çeşitli sıcaklık uygulamalarına dayalı bir yöntemdir. Bu yöntem kimyasal ilaçlar çıkmadan önce kullanılmaya başlanmıştır (Hermansen ve Jorgensen, 1983). Düşük neme sahip tohumlarda bu yöntem daha etkili kullanılabilirken, nem oranı yüksek tohumlarda çok düşük sıcaklık uygulamaları bile tohumun vigorunu olumsuz etkileyebilmektedir. Sıcaklık uygulaması patojende protein, yağ, hormon, stok materyal tüketimi ve oksidasyon üzerine olumsuz etkide bulunmaktadır. Tohumun nem içeriği, dormansi durumu, tohumun yaşı, vigoru ve tohumun fiziksel özelliklerinin yanısıra, patojenin türü, tohumdaki miktarı ve çevre koşulları fiziksel mücadelenin pratikte uygulanabilirliğini önemli oranda etkileyen temel faktörlerdir (Baker, 1962). Fiziksel mücadelenin dezavantajları; uygun yapılmadığında tohum çimlenmesinde azalmaya, tohumda zararlanmaya, tohumdaki patojeni yeterince yok edememesi ve uygulamaların yapılabilirliğindeki zorluklara neden olması şeklinde sıralanabilir.

3.3.1 Tohumlara Sıcak Su Uygulamaları: Sıcak su uygulaması tohumdaki patojenlerin miktarında azalma yaratırken, uygun yapılmadığında tohumun canlılığını kaybetmesine de yol açabilmektedir. (Strandberg ve White, 1989; Horuz ve ark., 2018). Sıcak su uygulaması tohumda yüksek miktarda bakteri varlığında popülasyonun büyük oranda azalmasını sağlar, ancak tohumda düşük oranda bakteri yoğunluğunda etkisiz kalabilmektedir (Williams, 1980). Tohumlara sıcak su uygulamaları sırasıyla şu şekilde yürütülür: (i) patojeni baskı altına alabilmek için sıcaklık kademeli olarak arttırılır; (ii) patojeni öldüren ancak tohumun canlılığına olumsuz etkide bulunmayan en uygun sıcaklık uygulama süresi belirlenir; (iii) tohumlar belirlenen sıcaklıkta ve sürede sıcak suda bekletilir; ve (iv) uygulama sonrası

tohumlar genellikle oda koşullarında kurumaya bırakılır. Sıcak su uygulamaları tohum kökenli hastalıkların mücadelesinde oldukça etkilidir, ancak bu etkililikte uygun sıcaklık ve süreyi ayarlamak en kritik noktadır. Sıcak su uygulamasının olumsuz yanları;

1. Tohum dokusunda nem ile birlikte priming süreci başlar ve tohumdaki enzimler aktif hale gelir. Sıcak su bu aktivasyonu olumsuz yönde etkiler ve bu nedenle çimlenmede sorunlar oluşur. Uygulanacak sıcaklık ve sürenin bu süreci olumsuz etkilememesi önemlidir.

2. Tohumlara sıcak su uygulandıktan sonra hemen kurutulmaları gerekir. Bu süre genellikle birkaç saat ile 1-2 gün kadar uzun sürebilir.

3. Kurutma işlemi esnasında tohumlarda saprofitik mikroorganizmaların gelişmesi durumu gözlenebilir.

Sıcak su uygulamalarında büyük çoğunlukla etkili bulunan sıcaklık 50°C ve süre olarak bu sıcaklıkta tohumları birkaç dakika ya da birkaç saat bekletmektir. Sebze tohumlarında bulunan bazı önemli bakteriyel hastalıklara karşı önerilen sıcak su uygulamaları Çizelge 6'te verilmiştir.

Çizelge 6. Bazı sebze tohumlarında bakteriyel hastalıklara karşı önerilen sıcak su uygulamaları

Sebze türü	**Bakteriyel hastalık etmeni**	**Önerilen sıcaklık ve süresi**
Marul	*Xanthomonas campestris* pv. *vitians*	50 °C /60 dk.
Tütün	*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*	50 °C /12-18 dk.
Havuç	*Xanthomonas campestris* pv. *carotae*	50 °C /30-60 dk.
Lahanagil türleri	*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*	50-52 °C /20-30 dk.
Domates	*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*	50-56 °C /25-30 dk.
	Pseudomonas syringae pv. *tomato*	50 °C /30 dk.
Bezelye	*Pseudomonas syringae* pv. *pisi*	55-60 °C /15 dk.
Fasulye	*Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*	52 °C /20 dk.
Kabakgil türleri	*Acidovorax citrulli*	55-60 °C /20 dk.

3.3.2 Sıcak Hava ve Plasma Uygulamaları: Tohumlara fırın gibi sıcak hava veren bir sistem kullanarak sıcak hava formunda kuru sıcaklık uygulanması tohumdaki patojeni azaltmada sıcak su uygulamalarına göre daha az etkilidir (Baker, 1962). Bu nedenle fiziksel yöntemler içerisinde az tercih edilir. Hastalıkla bulaşık tohumlar belirli sıcaklıktaki fırında birkaç gün bekletilerek özellikle tohum kabuğundaki bakterilerin ölmesi sağlanır. Örneğin; dereotu tohumları 65–70 °C fırında 3 gün bekletildiğinde bakteriyel hastalıklarla bir dereceye kadar mücadele edilebilir (Maude, 1996). Son yıllarda yapılan çalışmalarda düşük dozda plasma uygulamaları ile tohum kaynaklı bakterileri azaltmada büyük başarılar elde edilmiştir (Nishioka ve ark., 2016). Plasma, maddenin yüksek enerjili dördüncü halidir ve uyarılmış atomlar ve moleküller, iyonize gazlar, radikaller ve serbest elektronlardan oluşur （Moisan ve ark., 2001). Plasma ile sterilizasyon, mevcut tohum dezenfeksiyon yöntemlerine bir alternatif olarak kullanılabilir (Selcuk ve ark., 2008). Plasmalar tek tip bir sistem ile tohum sterilize etmeye elverişlidir, düşük sıcaklıkta etkilidir ve kısa işlem süreleriyle ve tohumlara zarar vermeden yüksek oranda etki gösterir. Ayrıca herhangi bir kimyasal kullanımı olmadığından sistemi kullanacak kişiye olumsuz etkisi yoktur (Dhayal ve ark., 2006). Sebze tohumlarında bulunan bazı önemli bakteriyel hastalıklara karşı önerilen kuru sıcaklık ve plasma uygulamaları Çizelge 7'de verilmiştir.

Çizelge 7. Bazı sebze tohumlarında bakteriyel hastalıklara karşı önerilen kuru sıcaklık ve plasma uygulamaları

Sebze türü	**Bakteriyel hastalık etmeni**	**Önerilen kuru sıcaklık, plasma ve süresi**
Hıyar	*Pseudomonas syringae* pv. *tachrymans*	70 °C /3 gün
Fasulye	*Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*	50 °C /3 gün 60 °C /1 gün 70 °C /2 saat
Domates	*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*	80 °C /1 gün 76-78 °C /2 gün
Bezelye	*Pseudomonas syringae* pv. *pisi*	65 °C /1 gün
Hıyar, Kavun, Kabak	*Acidovorax citrulli*	85 °C /3-5 gün
Lahanagil türleri	*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*	75 °C /5-7 gün
Lahanagil türleri	*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*	5.5 kV 10.7 kPa basınç plasma/10 dakika

3.3.3 Buhar Uygulaması: Bu yöntem sıcak su ve sıcak hava yöntemlerine benzerdir. Tohumda bulunan patojenlere karşı tohumlar belirli bir basınç altında buharda belirli bir süre bekletilir. Bu yöntem sebze tohumları dışında diğer üretim materyallerine de uygulanabilir. Buhar uygulaması tohum kaynaklı bakterileri öldürmede az etkilidir, ancak, yine de bazı bakteriyel hastalıklara karşı kullanılabilir. Bazı araştırıcılar buhar uygulamasının sıcak sudan daha güvenli olduğunu, ancak, kuru havadan daha az etkili olduğunu ifade etmektedir. Bu yöntemde tohumlar çabuk kurur, tohum kabuğu zarar görmez ve tohum çimlenmesi olumsuz etkilenmez (Agarwall ve Sinclair, 1987; Maude, 1996). Bu yöntemde genellikle tohumlar 50–60°C'de buharda 20–30 dakika bekletilir. Tohuma buhar uygulaması yapılan bazı sebzeler ve önerilen uygulama süresi Çizelge 8'de verilmiştir.

Çizelge 8. Bazı sebze tohumlarında bakteriyel hastalıklara karşı önerilen su buharı uygulamaları

Sebze türü	**Bakteriyel hastalık etmeni**	**Önerilen su buharı ve süresi**
Lahana grubu bitkiler	*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*	54 °C /30 dakika
Fasulye	*Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*	55-60 °C /30-60 dakika
Domates	*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*	56 °C /30 dakika

3.3.4. Radyasyon Uygulaması: Yüksek frekanslı ses, yüksek voltajlı elektrik akımı, ultrasonik radyasyon, çok yüksek frekanslı radyo dalgaları, mikrodalga, infrared, X, gama, ultraviyole ışınlar ve katot ışınlı spektrumlar gibi farklı radyasyon türleri kullanılarak tohum kaynaklı bakterilerle mücadele edilebilmektedir (Brown ve ark., 2001). Tropik ve subtropik yerlerde güneş enerjisinden yararlanılarak solar radyasyon elde edilerek toprak kaynaklı hastalıkların ve yabancı otların mücadelesinde kullanılmıştır (Katan, 1981). Tohum kaynaklı bazı bakteriyel hastalık etmenlerinin tohumdan elemine edilmesinde kullanılan radyasyon yöntemleri ve süreleri Çizelge 9'da verilmiştir.

3.3.5. Fermentasyon: Bu yöntem özellikle domates tohumlarında *C. michiganensis* subsp. *Michiganensis*'in tohumdan elemine edilmesi amacıyla çok eskiden beri kullanılan bir yöntemdir. Domates tohumları meyveden çıkarıldıktan sonra meyvenin suyuyla birlikte güneş

altında yaklaşık dört gün boyunca bekletilir ve tohum yüzeyinde *Bacillus* spp. türleri gelişir ve fermentasyon sağlayarak tohum yüzeyindeki patojen bakterinin ölmesini sağlar. Aynı yöntem pek çok ıslak tohum çıkartılan sebze tohumundaki bakteriyel hastalıkların tohumdan uzaklaştırılmasında kullanılabilir.

Çizelge 9. Bazı sebze tohumlarında bakteriyel hastalıklara karşı önerilen radyasyon uygulamaları

Sebze türü	**Bakteriyel hastalık etmeni**	**Önerilen radyasyon türü ve süresi**
Börülce	*Xanthomonas campestris* pv. *vignicola*	Tohumları suda 4-5 saat beklettikten sonra güneşin altında solar radyasyon uygulaması
Tütün	*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*	625 watt mikrodalga radyasyonu/20 dakika
Soya fasulyesi	*Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*	4 kw/g elektrik akımı/30 saniye 21.3 kc/sn ultrasonik radyasyon/15 dakika
Lahanagil türleri	*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*	3.6 kJ m^{-2} UV-C /4.83 dakika

3.4. Kimyasal Mücadele

1990 yılından sonra fungisit endüstrisindeki gelişmeler ile birlikte tohumdaki hastalıklara karşı kullanılan biyolojik, fiziksel ve mekanik mücadelenin yerini kimyasal mücadele almaya başlamıştır. Kimyasal mücadele tohumdaki patojeni tamamen öldürmek ya da miktarını azaltmak amacıyla yaygın kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemin ekonomik olması ve çevreye az zarar veren dozda uygulanması oldukça önemlidir. Tohuma kimyasal uygulanması tohumdaki fungal hastalıklarla mücadelede daha yaygın kullanılırken, bakteriyel ve viral enfeksiyonların azaltılması üzerine de etkisi bulunmaktadır. Çeşitli bakteriyel hastalıkların tohumdan uzaklaştırılmasında kullanılan kimyasallar Çizelge 10'da verilmiştir.

Antibiyotikler düşük moleküler ağırlıklı, farklı mikroorganizmalar tarafından üretilen, başka mikroorganizmanın aktivitesini ve gelişimini engelleyen organik yapılardır. Antibiyotikler genellikle mikroorganizma-ların hücre duvarı, DNA, RNA ve protein sentezi gibi hayati öneme sahip olayları üzerine direk etkide bulunurlar (Raaijmakers ve Mazzola, 2012). 1950'li yıllarda, bitki patolojisi çalışan araştırma-

cılar antibiyotiklerin bitki sağlığında kullanılabileceğini ifade etmiş ve yaklaşık 40 farklı antibiyotik üreten fungus ve bakteriden antibiyotikler elde edilmiştir. (Goodman, 1959). Ancak günümüzde bakterilerin bu bileşenlere karşı dayanıklılık kazanması, pahalı olması ve çevreye olan zararlı etkilerinden dolayı antibiyotikler pek çok ülkede bitki sağlığında hiçbir dönemde kullanılmamaktadır.

Çizelge 10. Tohumda bulunan bazı bakteriyel hastalıklarla kimyasal mücadele

Sebze türü	**Bakteriyel hastalık etmeni**	**Önerilen kimyasal mücadele ve süresi**
Biber	*Xanthomonas* spp.	%12 Bronopol Hydroxychinolin sulfate %80 Thiram Hidroklorik asit
Biber	*Xanthomonas* spp.	%3 Sodyum hipoklorit / 3-5 dakika
Pamuk	*Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*	Bronopol Hydroxychinolin sulfate Thiram
Domates	*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*	%2-3 Sodyum hipoklorit / 5 dakika
Domates	*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*	%0.2 Bakır asetat 3 dakika
Domates	*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*	Hidroklorik asit Laktik asit
Kabakgil grubu bitkiler	*Acidovorax citrulli*	1600 µg/mL^{-1} Peroksi asetik asit/30 dakika
Lahanagil grubu bitkiler	*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*	Kalsiyum hipoklorit $(CaOCI)_2$
Biber	*Xanthomonas* spp.	%0.2 Bakır asetat / 3-5 dakika
Biber	*Xanthomonas* spp.	%1 Asetik asit 5 dakika %1 sitrik asit 5 dakika %2 laktik asit 5 dakika

Özellikle bronopol, mancozeb, hydroxychinolin sulfate ve thiram gibi çeşitli kimyasallar tohumlara uygulanarak bakterilerle mücadele edilir (Saygili ve ark., 2019). Tüm bu kimyasallar yüksek oranda antimikrobiyal etkiye sahiptir. Örneğin ticari olarak satın alınan pek çok tohum Thiram ile ilaçlıdır ve bakteriyel hastalıkların azaltılmasında oldukça etkilidir. Bunların dışında hidroklorik asit (HCI), sodyum hipoklorit (çamaşır suyu), kalsiyum hipoklorit, çeşitli organik ve inorganik asitler, farklı bitkilerden elde edilen fermente ürünler to-

hum uygulaması yapılarak bakteriyel hastalıkların azaltılmasında kullanılmıştır (Schultz ve ark., 1986; Horuz ve ark., 2018; Tireng Karut ve ark., 2019).

Son yıllarda farklı büyüklükte nanopartiküllerin kullanımıyla hastalıklarla mücadele şansı artmıştır. Tohumda bulunan bakteriyel hastalıkların mücadelesinde de bu yöntemden faydalanılmaktadır. Örneğin; gümüş nanopartikülleri lahana tohumlarına uygulandığında tohumdaki *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* bakteri popülasyonu oldukça azalmıştır (Pecenka ve ark., 2021).

Tohum uygulamalarında kullanılan kimyasal maddelerin formülasyonları kuru toz, ıslanabilir toz, suda dağılabilir toz, çözelti ve akışkan konsantre şeklindedir. Kimyasal maddeler ile yapılan tohum uygulamaları 3 kategoride sınıflandırılabilir:

1- Tohum Dezenfeksiyonu: Bu uygulamada kullanılan kimyasallar tohumun içindeki veya kabuğundaki inokulumu kontrol eder.

2- Tohum Bulaşmasının Önlenmesi: Tohum yüzeyinde bulunan patojenler veya pasif olarak yer alan mikroorganizmaların kontrolü dikkate alınır. Tohumun dış kabuğundaki patojenlerin önlenmesi daha kolaydır.

3- Tohumun Korunması: Tohumlara uygun kimyasal ile muamele yapılarak tohumun ve oluşacak fidenin tohum ve toprak kaynaklı patojenlere karşı korunmasını amaçlar.

4. GSPP (GOOD SEED AND PLANT PRACTICES)

İyi tohum ve bitki uygulamaları olarak ifade edilen GSPP, tohumları ve bitkileri patojen enfeksiyonundan korumak için dikkat edilmesi gereken önemli hijyen koşullarını ortaya koyan bir sistemdir. Bu sistem uluslararasıdır ve şeffaf bir şekilde işlem yapan bir zincir sistemidir. Sistem ilk kez 2011 yılında Fransa ve Hollanda'da başlatılmış, günümüzde ise ülkemiz dahil farklı ülkelerde de sisteme üye tohum üreten firmalar bulunmaktadır. Sistemin temel amacı, domates bitkilerini ve tohum lotlarını *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* enfeksiyonundan korumaktır. GSPP, üretim alanının kalite yönetim sistemi, çalışma yöntemleri ve bilgi tedariğinin GSPP standardına uygun olmasını sağlar. Bu zincir sisteminde firmalar ve üretim alanları GSPP standardına uygunlukları açısından periyodik olarak kontrol edilir. Denetim kuruluşları tarafından yapılan doğrulama, sağlıklı tohum ve bitkilerin varlığını tespit etmenin yanı sıra her bir üretim sahası, varlık veya lot/parti başına güvenilir kalite bilgilerini de sağlar. Sistemin temel ilkeleri:

i- tohum ve fide üretim yerlerinin çevresel faktörlerden etkilenmeyecek şekilde izole etmek

ii- risk faktörlerini ortadan kaldırarak enfeksiyonun önüne geçmek

iii- üretim süresince hastalık belirtisi yönünden bitkileri sürekli kontrol etmek

iv- tohum lotlarını GSPP'den bağımsız denetim kuruluşlarınca hastalık yönünden test etmektir.

Sistemde hastalık bulaşmasındaki en önemli dört risk faktörü kullanılan su, insan hareketi, tohumlar, kullanılan alet-ekipman ve malzemelerin temizliğidir. Risk faktörlerinin önüne geçme durumuna göre kuruluşlar akredite olur. Bu risk faktörlerini ortadan kaldırmak amacıyla şunlara dikkat edilmektedir.

1- Üretim alanında kullanılan su *Cmm* ile bulaşık olmamalı ve dezenfekte edilerek kullanılmalıdır.

2- Üretim alanında çalışan işçiler, teknik elemanlar ve dışardan gelecek ziyaretçiler kontaminasyon riskine karşı üretim yerine girerken koruyucu bir giysi giymeli ve ellerini yıkayarak iyice dezenfekte etmelidir.

3- Üretimde kullanılacak tüm tohumlar GSPP standartlarına uygun şekilde üretilmiş olmalıdır. Eğer kullanılacak tohum GSPP sertifikalı değilse, bu üretim alanı GSPP sertifikalı tohum üretim alanından tamamen ayrılmalı ve hijyen koşullarına dikkat edilmelidir.

4- Üretim alanında kullanılan tüm alet-ekipman, toprak, fide harçları, saksı, viyol gibi malzemeler risk analizinden geçirilerek kullanılmalıdır. Kontaminasyon riski olanlar ise dezenfekte edilerek kullanılmalıdır.

5. TOHUMDA BAKTERİ ARANMASI VE TANISI

Tohum patojenlerinin tanılanmasında birden fazla sayıda yöntemden yararlanabilmek mümkündür. Bu durumda arzu edilen bir yöntemin seçimi; testin amacına, tohumun özelliklerine ve patojenin niteliklerine bağlıdır. Tohum partilerinde bakteri varlığının tespit edilmesinde Uluslararası Tohum Testleme Birliği (ISTA)'nın hazırladığı protokoller kullanılır (Anonymous, 2022). Sebze tohumlarında bakteri tespiti için en az 5.000-30.000 adet tohuma ihtiyaç bulunmaktadır. Her bir sebze türü ve aranacak patojen için testlenmesi gereken minimum tohum sayısı ISTA protokollerinde belirtilmiştir. Örneğin; kabakgil tohumlarında *Acidovorax citrulli*'nin aranması için 10.000-30.000 adet tohum gerekmektedir. Tohum kaynaklı bakterilerin tanılanmasında kullanılan yöntemler aşağıda sıralanmıştır.

1- Tohumların incelenmesi: Işık ya da çıplak göz yardımıyla tohumlar incelenerek renk değişikliğine uğramış tohumlar kolaylıkla fark edilebilir. Örneğin; fasulyede *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* ve *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* bakterileri kuru tohumlarda koyulaşmış alanlar oluşmasına neden olmaktadır. Bu şekilde ayıklama yapılabilir. Ancak simptom göstermeyen tohumlarda da bakteri bulunabileceğinden bu yöntemin kullanılabilirliği kısıtlanmaktadır.

2- Besi yerine izolasyon: Bazı bakterilerin petride gelişimini ayırt etmek için yarı seçici ve seçici besi yerleri geliştirilmiştir. Bu besi yerlerinde genellikle bakterinin gelişimine yardımcı ve diğer bakterilerin gelişimini sınırlandırıcı bazı kimyasallar eklenerek seçicilikleri arttırılır. Bu besi yerleri kullanılarak hedef bakterinin petride gelişme özelliğine göre diğer bakterilerden ayırt edilmesi kolaylaşır.

3- Fidelerde belirti izleme yöntemi: Bu yöntem birçok sebze tohumlarında bulunabilen bakteriyel hastalıkların tespitinde kullanılır. Yöntemde tohum partilerinden bir kısmı toprağa ekilerek yüksek nem ve uygun sıcaklık koşullarında (%75-90 nisbi nem ve 18-25 °C sıcaklık) bekletilir. Ardından gelişen fideler kontrol edilerek hastalık belirtisi olup olmaması durumuna göre değerlendirilir. Bu yöntemin avantajı düşük popülasyondaki bakterinin uygun koşullarda belirti oluşturmasını sağlarken, dezavantajı ise, testin sonucunu görmek için en az iki hafta beklenmelidir.

4- Test bitkilerine inokulasyon yöntemi: Testlenecek olan tohumlar belirli bir buffer içerisinde en az 30 dakika çalkalanır ya da tohumlar ezilerek elde edilen ekstrakt kullanılır. Ardından çalkalama suyu/ekstrakt test bitkileri ya da duyarlı konukçulara bulaştırılır. Bitkiler hastalık çıkışı için uygun nem ve sıcaklıkta bekletilerek hastalık belirtisi oluşumu yönünden günlük kontrol edilir. Örneğin; fasulye tohumlarında *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* bakterisini tanılamak için geliştirilen testte, fasülye tohumlarının yıkandığı sıvı vakum aracılığı ile fasülye fidelerine inokule edilir. Hastalık belirtileri 7-10 gün sonra yaprak dokularında su emmiş lekeler şeklinde görülmektedir.

5- Bakteriyofaj yöntemi: Bakteriyofaj, bakterileri infekte eden ve öldüren virüslerdir. Bakteriyofaj ile konukçusu olan bakteri arasında özel bir ilişki bulunur ve bu özellik tohumdaki bakteriyi tanılamada yardımcı olmaktadır. Örneğin; domateste *Xanthomonas* spp. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* ve *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* için geliştirilmiş Agriphage (https:\\www.agriphage.com) isimli ticari bakteriyofajlar vardır. Bu yöntemde seçici besi yerine tohumdan elde edilen ekstrakt yayılır, ardından bakteriyofaj aşılanır. İnkübasyondan sonra kültürdeki erime zonları sayılır. Tohumda bu bakteriler aranırken kullanılabilir.

6- Serolojik yöntemler: Tohumdan bakteri tanısında kullanılan çeşitli serolojik yöntemler vardır, ancak en yaygın kullanılanları IF (Immunofluorescense) ve ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) yöntemleridir. IF testinde antikor floresan boya ile boyanır. Lam üzerine tohumdan elde edilen örnek damlatılır ve üzerine floresan işaretli antikor eklenerek reaksiyon oluşumu ultraviyole ışık mikroskobunda bakteri hücrelerinin sarımsı ışık vermesi ile değerlendirilir. ELISA testi enzimle işaretlenmiş antibodynin substratla reaksiyonunun renk oluşumu ile sonuçlanarak etmenin varlığının ortaya çıkarılması esasına dayanır.

7- Moleküler Yöntemler: DNA ya dayalı yapılan testlerdir. Tohumda bulunan hedef patojeni tanılayan spesifik primer ve işaretli problar kullanılarak yapılan testlerdir. Klasik PCR, Real-Time PCR, BIO-PCR, multipleks PCR, RT-PCR gibi çeşitleri vardır. ISTA'nın belirlediği protokole uygun olan yöntem kullanılır.

Yukarıda belirtilen tanı yöntemlerinin hiç biri tek başına tohumdan bakteri tanılaması için yeterli değildir. Her bakteri türü için birden fazla tanı yöntemleri birlikte kullanılmalıdır.

6. TOHUMLA TAŞINAN BİTKİ VİRÜS HASTALIKLARINDA HİJYEN VE TERAPİ YÖNTEMLERİ

Tarımsal üretim alanlarında önemli verim kayıplarına neden olan viral etmenler, bitkiden bitkiye mekanik yollardan kolaylıkla bulaşabilmeleri, vektör böcekler aracılığıyla taşınabilmeleri, çok geniş alanlara kısa sürede yayılabilmeleri, kimyasal yöntemlerle mücadele edilememeleri gibi sebeplerden dolayı önem kazanmaktadır. Bu virüsler içerisinde tohumla taşınan virüsler Türkiye ve dünyadaki hastalıktan ari tohum üretimini önemli bir tehdit unsuru oluşturmaktadır. Bunun sebebi bu virüslerin uzak mesafelere vegetatif üretim materyali, tohum, mekanik ve kültürel önlemler ile kolaylıkla taşınmasıdır. Hatta viral inokulum embriyoya girdiğinde bitkinin üst aksamına etkili bir şekilde iletilmekte olup tohum kabuğunda bulunduğunda çimlenme sırasında tohum kabuğu fideden ayrıldığı için inaktifleşebilmektedir (Johansen ve ark., 1994). Tohum kaynaklı enfeksiyondan sonra birincil enfeksiyon kaynağı mekanik temas, işçilerin elleri, kullanılan aletler, sera materyalleri ve ipler olmaktadır (Reingold ve ark., 2015). Tohumla taşınmanın üç önemli etkisi bulunmaktadır. Bunlardan ilki enfekteli tohumların ekilmesiyle, enfekteli tohum miktarı düşük olmasına karşın, inokulumda rastgele dağılım ortaya çıkmakta ve bu durum bitkilerde vektörlerle sekonder yayılmayı arttırmaktadır. İkinci etki, viral inokulumun sonraki üretim sezonlarına aktarılmasıdır. Üçüncü etki ise, enfeksiyon durumu tespit edilemeyen enfekteli tohumların, tohum ticareti sayesinde dünya çapında yayılım göstermesi ve göstermeye devam etmektesidir (Albrechtsen, 2006).

Bir virüsün konukçu bir bitkide hastalık oluşturabilmesi için, virüsün hücre duvarını geçmesi, hücrenin çoğalma mekanizmasını kendi istekleri doğrultusunda kullanarak çoğalması, hücreden hücreye taşınıp iletim sistemine (floem) ulaşması ve konukçuyu sistemik olarak enfekte etmesi gerekir. Virüsler hücreden hücreye kısa mesafelere plazmodezmalarla; doku ve organ gibi uzun mesafelere ise iletim sistemi ile taşınırlar. Sonraki aşama ise virüsün yeni konukçulara taşınmasıdır. Virusler bitkiden bitkiye temasla, mekanik veya biyolojik yollarla taşınırlar. Virüslerin çoğunluğu genellikle vektörlerle taşınmaktadır. Uzun mesafelere taşınmaları ise tohumla olmaktadır.

Tobamovirüs, Alfamovirüs, Tobravirüs, Tymoıvirüs, Ilarvirüs, Tospovirüs, Comovirüs, Nepovirüs, Tritimovirüs, Tombusvirüs, Carmovirüs, Carlavirüs, Peclovirüs, Hordeivirüs, Sobemovirüs ve *Trichovirüs* cinsine bağlı virüsler tohumla taşınan önemli virüs türlerini barındırmaktadır ve sayıları yüzlerle ifade edilmektedir (Çizelge 11). Tohumun kabuğunda ya da embriyo/endospermde taşınmasına göre virüs hastalıklarının taşınmasının önemi artmaktadır. Tohumlar, virüslerin hayatlarını devam ettirmelerinde çok uygun bir ortam oluştururlar. Enfekteli bitkilerde virüslerin tohuma geçiş oranı virüs-konukçu kombinasyonuna göre değişiklik gösterir. Bu oran % 0.3'den daha düşük olabildiği gibi %100 de olabilir. Örneğin; *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV) hıyar tohum kabuğunda %100'e kadar ulaşırken endospermde % 0.9 oranında, *Pepper mild mottle virus* (PMMoV) ise %0.8–7.5 arasında değişen oranlarda tohuma geçer. Ancak bulaşık tohum oranı aynı tür içinde çeşitlere göre değişebildiği gibi, bitkinin enfekte olduğu döneme ve iklim koşullarına göre de değişir (Çizelge 11).

Çizelge 11. Bazı virüs hastalıklarının tohumla bulaşık olma durumları ve taşınma oranları

Virüs	**Konukçu**	**Bulaşma**	**Taşınma**	**Referans**
Cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV)	Cucurbitaceae	+ (%84)	+ (%2)	Shargil ve ark. (2017)
		+ (95%)	+ (> %1)	Reingold ve ark. (2015)
		+ 100%)	+ (%0.9)	Cordoba-Selle ve ark. (2017)
Kyuri green mottle mosaic virus (KGMMV)	Cucurbitaceae	+ (Test edilmemiş)	+ (Test edilmemiş)	Clark ve Adams (1977)
		+ (Test edilmemiş)	(Test edilmemiş)	Kim ve ark. (2013)

Çizelge 11 (devam). Bazı virüs hastalıklarının tohumla bulaşık olma durumları ve taşınma oranları

Virüs	**Konukçu**	**Bulaşma**	**Taşınma**	**Referans**
Odontoglossum ringspot virus (ORSV)	Orchidaceae, Solanaceae	+ (Test edilmemiş)	+ (Test edilmemiş)	Clark ve Adams (1977)
Paprika mild mottle virus (PaMMV)	Solanaceae	+ (Test edilmemiş)	(Test edilmemiş)	Takeuchi ve ark. (2005)
Pepper mild mottle virus (PMMoV)	Solanaceae Biber	+ (Test edilmemiş)	(0.8–7.5%)	Dombrovsky ve Smith (2017)
	Fabaceae	+ (Test edilmemiş)	(Test edilmemiş)	Takeuchi ve ark. (2005)
Tobacco mild green mosaic virus (TMGMV)	Solanaceae	+ (Test edilmemiş)	+ (%0.8-7.5)	Mlotshwa ve ark. (2002)
Pepino mosaic virus (PepMV)	Solanaceae		%0.005 - 0.057	Hanssen ve ark. (2010)
Tomato mosaic virus (ToMV)	Solanaceae	38%	21.8%	Dombrovsky ve Smith (2017)
		+ (%38)	(Test edilmemiş)	Clark ve Adams (1977)
Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV)	Solanaceae Domates	Kabuk doku %100	% 0.8	Fidan (2022)
Zucchini green mottle mosaic virus (ZGMMV)	Cucurbita-ceae	+ (%6)	+ (% 1.1)	Shargil ve ark. (2017)

Tohum kaynaklı bitki virüsleri, dünya tarımına yönelik önemli bir tehdittir. Bunlar arasında, Tobamovirus'e ait türler, özellikle Solanaceae ve Cucurbitaceae familyalarına ait türlerde en büyük tehlikelerden biri olarak kabul edilmektedir. Bu virüsler uzun zamandır tarım için tehdit oluşturmaktadır. Yüzyılı aşkın bir süre boyunca Solanaceae familyasına ait tütün, domates ve biber bitkileri *Tobacco Mosaic Virus* (TMV), *Tobacco Mild Green Mosaic Virus* (TMGMV), *To-*

mato Mosaic Virus (ToMV) ve *Pepper Mild Mottle Virus* (PMMoV) tarafından enfekte olmaktadır. Son yıllarda bunlara *Pepino Mosaic Virus* (PepMV), *Tomato Brown Rugose Fruit Virus* (ToBRFV), *Cucumber Green Mottle Mosaic Virus* (CGMMV) gibi virüsler eklenmiştir.

Son 30 yılda küresel iklim değişiklikleri ile birlikte dayanıklılığı kıran ırklar ve yeni virüsler tespit edilmiştir. İlk kez Ürdün'de izole edilen (Salem ve ark., 2016) ve *Tomato Brown Rugose Fruit Virus* (ToBRFV) olarak adlandırılan yeni bir Tobamovirüs, global bir pandemiye neden olmuştur. Birkaç kıtada (Afrika, Asya ve Kuzey Amerika) hızlı dağılımına ve *Tm-2* ve *Tm-2²* dayanıklılık genlerinin üstesinden gelebilen bu virüs domateste önemli ekonomik kayıplara sebep olmaktadır. ToBRFV'nin neden olduğu simptomlar, enfekte domatesin genotipine (*Tm-2²* geni bulunup bulunmaması), yaşına ve çevresine bağlı olarak büyük ölçüde değişmektedir. Hastalıklı bitkilerin meyveleri, onları pazarlanamaz hale getiren sarı-kahverengi buruşuk (rugose) lekeler gösterir. *Tm-2²* geni içeren enfekteli domateslerin meyvelerinde alacalanma olur ve renk bütünlüğü sağlanamaz. ToBRFV domatesin yanı sıra biberi de (*Capsicum annuum*) enfekte edebilmektedir. Benzer şekilde, 1935 yılında İngiltere'de keşfedilen ve Avrupa ve Orta Doğu, Asya ve Uzak Doğu'daki komşu ülkelere yayılan *Cucumber Green Mottle Mosaic Virus* (CGMMV), kabakgil türlerinde de virüs enfeksiyon yapmaktadır. Son 10 yılda, CGMMV yeni ülke ve kıtalarda kuzey Amerika ve Avustralya'da tespit edilerek dünya çapında büyük bir tehdit haline gelmiştir. Tobamovirus'ler içerisinde CGMMV kabakgil enfeksiyonu yapan ve şu an üretimi tehdit eden viral etmen olarak kabul edilmektedir. Ticari olarak tohum üreten ülkelerdeki tohum aktarım testlerinde kabakgillerde tespit edilen diğer *Tobamovirus* türleri de göz önünde bulundurulmalıdır [*Kyuri Green Mottle Mosaic Virus* (KGMMV), *Zucchini Green Mottle Mosaic Virus* (ZGMMV) ve *Cucumber Fruit Mottle Mosaic Virus* (CFMMV) gibi].

Tobamovirus, tohum kaynaklı, mekanik olarak taşınan kararlı virüslerdir. Bulaşıcı parçacıklar temel olarak tohum kabuklarına tutunmuştur. Viral inokulum embriyoya girdiğinde etkili bir şekilde aktarılır ve tohum katmanındaki virüsler, tohum katmanından ayrıldığında enfeksiyondan korunmayabilir. Bununla birlikte fideliklerde, *Tobamovirüs* bulaşmış tohum kabuğu, transplantasyon sırasında oluşan yaralı kökleri etkileyebilir. Sonuç olarak, birincil bulaşıcı kaynak mekanik temaslar, işçi elleri, aletler, sera yapısı ve açık alanlardaki kafes halatlar ve traktör yolu ile hızla yayılabilir. *Tobamovirus*'lerin bulaşıcılığı bitki artıklarında ve kirlenmiş toprakta ve kilde aylarca yıllarca korunur.

Virüslerin tohumla taşınma oranı virüs-konukçu, konucu bitkinin enfekte olduğu dönem ile uygun çevre koşullarına göre değişmektedir. Bir embriyonun bir virüs ile enfeksiyonu, virüsün tohumla ta-

şınmasında çok önemli diğer bir aşamadır. Ancak Tütün Mozaik Virüsü gibi bazı çok stabil virüsler embriyoyu enfekte etmeden, enfeksiyon gücünü koruyarak tohum kabuğunda taşınabilirler ve tohum çimlendikten sonra bitkinin gelişmesi sırasında oluşan mekanik yaralardan bitkiyi enfekte ederler. *Southern Bean Mosaic Virus* (SBMV, *Sobemovirus*) düşük oranda tohum kabuğunda taşınmakla birlikte, enfeksiyon yapma gücünü zamanla kaybeder. *Melon Necrotic Spot Virus* (MNSV, *Carmovirus*) de tohumla taşınır, ancak enfekteli tohumlar ekildiğinde, eğer ortamda fungal vektör *Olpidium bornovanus* mevcut değilse bu tohumlardan sağlıklı bitki elde etme olanağı olabilir (Khan ve Dijkstra, 2002).

Enfeksiyonun çiçeklenme döneminde gerçekleşmesi, virüslerin tohumla taşınmasında önemlidir. Tohum taslağında taşınan virüs, gelişme başlangıcında çiçeği enfekte eder. Çiçek tozu ile taşınan virüslerin gelişme başlangıcında, kallus tabakası oluşmadan önce, çiçek meristemini ve çiçektozu ana hücrelerini enfekte etmesi gerekir.

Virüs-konukçu ilişkisi tohumla taşınma oranı üzerinde önemli rol oynar. Aynı virüsün farklı izolatları aynı konukçunun farklı çeşitlerinde tohumla farklı oranlarda taşınır. Ayrıca bitki yaşı ve sıcaklık gibi çevre koşulları da tohumla taşınma oranını etkilemektedir.

6.1 Kimyasal Tohum Uygulamaları

Viral kontaminasyonla mücadele için klasik bir araç olarak, tohumlarının dezenfeksiyon işlemi için kimyasallar geniş çapta kullanılmaktadır. Bu kimyasalların etkinlikleri, patojenlerin kimyasal maddelere maruz kalma derecesi ve etkin bir maruz kalma sağlamak için önceden ıslatma, optimize edilmiş kimyasal-tohum oranı, karıştırma ve vakum gibi ek yaklaşımlarla sınırlı olabilse de bu yöntemlerin uygunluğu ve satın alınabilirliği gibi kriterler olabilmektedir. Tohumla taşınan virüslerin dezenfeksiyonundaki temel prensipler, genel olarak enfekte eden virüs türüne bağlı olarak kullanılan kimyasallar ve optimum kullanım dozları değişebilmekte olup aşağı yukarı benzerdir. Ticari tohum üretiminde kullanılan yöntemler çoğunlukla çeşitli kimyasal işlemlere dayanır: virüs türüne bağlı olarak;

%1-9 hidroklorik asit,

%1-5 kalsiyum hipoklorit,

%1-3 sodyum hipoklorit,

%10 trisodyum fosfat (TSP)

yaygın olarak kullanılmaktadır. Yüzey dezenfeksiyonu için oldukça da başarılıdır. Bu kimyasal uygulamaları genellikle fiziksel dezenfeksiyon yöntemleri ile kombine edilerek kullanıldığında daha efektif

olduğu belirtilmektedir. Kullanılan dezenfeksiyon koşulları da uygulama yapılacak tohum, farklı kimyasallar ve viral etmenler arasında önemli ölçüde farklılık gösterir. Ancak, ilk defa keşfedilen hali hazırda kullanılan bir dezenfeksiyon programı olmayan bitki virüs hastalıklarına daha önceden benzer epidemiyolojiye sahip viral etmenlerin kontrol stratejileri entegre edilebilmektedir. Örneğin; 2019 yılına kadar *Tomato Brown Rugose Fruit Virus* (ToBRFV) etmenine karşı hali hazırda kullanılan bir dezenfeksiyon programı olmadığı için benzer epidomiyolojiye sahip *Pepino Mosaic Virus* (PepMV) gibi viral etmenlerin kontrol stratejileri entegre edilmiş olup başarılı bir şekilde enfeksiyon yönetilmiştir (Oladokun ve ark., 2019; Fidan ve ark., 2021). Yapılan çalışmalarda Tobamovirus virüslerin birçoğunun tohum kaynaklı ve mekanik olarak taşınabilen stabil virüsler oldukları saptanmıştır. Enfeksiyöz partiküller öncelikli olarak tohum kabuğuna tutunmaktadırlar. Reingold ve ark. (2015) tarafından kavun ve hıyar tohumlarında yürütülen bir çalışmada, Tobamovirus grubunda bulunan *Cucumber Green Mottle Mosaic Virus* (CGMMV)'ün inaktifleştirilmesinde %10 TSP, 72 °C' de 72 saat ısı uygulaması ve ısı+TSP kombinasyonu uygulamaları denenmiştir. Çalışmalarda %10 TSP içerisinde 30 dakika tutulan tohumlarda ve hemen ardından 72 °C'de 72 saat ısıl işleme tabi tutulan tohumlarda virüs yoğunluğu en az bulunmuştur.

ToBRFV ile enfekte olmuş meyvelerden ekstrakte edilen tohumlar, 30 dakika süreyle %2 hidroklorik asit, 3 saat süreyle %10 trisodyum fosfat, 72 °C'de 72 saat kuru ısı veya bunların kombinasyonları ile denenmiştir; daha sonra tohumlar, serolojik, moleküler ve biyolojik deneyler kullanılarak virüs varlığı açısından test edilmiştir. Sonuç olarak, 30 dakika boyunca %2 HCl ile tohum muamelesi, sadece ToBRFV ile kontamine tohumların %100 dezenfeksiyon oranına ulaşmakla kalmayıp, aynı zamanda muamele edilmemiş tohumlara kıyasla domatesin tohum kalitesini iyileşmeler görülmüş çimlenme oranı da %96 olarak belirlenmiştir (Samarah ve ark., 2020; Fidan, 2022). *Tomato Mosaic Virus* (ToMV), *Tobacco Mosaic Virus* (TMV), *Cucumber Mosaic Virus* (CMV), *Soybean mosaic potyvirus* (SMV) ve *Lettuce Mosaic Potyvirus* (LMV) ile enfekteli 8 tohum lotu kullanılarak yapılan çalışmada; Virüs inaktivasyonu için asetik asit (CH_3COOH), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroklorik asit (HCl), sodyum hipoklorit (NaClO), Triton X 100, kuru ısı, sıcak su, ozon (O_3) ve UV (305 nm dalga boyu) işlemleri kullanılmıştır. Virüs konsantrasyonunu azaltmak için en etkili işlemler HCl, sıcak su (65 °C) ve ozon (10 g m^{-3}) olarak belirlenmiştir. Bu uygulamalar, tohum kaynaklı virüslerin konsantrasyonlarını sırasıyla %51, %42 ve %32 oranlarında azaltmıştır. Diğer uygulamalar ise daha az etkili olup %27-%12 aralığında virüs konsantrasyonlarını azaltmışlardır. Yapılan HCl ve ozon uygu-

lamaları tohum çimlenmesi üzerinde olumsuz bir etkisi olmadığı için en etkili ve uygulanabilir bulunmuştur. *Pepino Mosaic Virus* (PepMV) enfekteli bitkilerden elde ettiği tohumlar üzerinde gerçekleştirdiği çalışmada en etkili kimyasal olarak farklı dozlarda sodyum hipoklorit (%0.5 ve %1) bulunmuş olup ardından trisodyum fosfat çözeltisi denenmiştir. Bu kimyasal uygulamalar ile fiziksel ısıl dezenfeksiyon işlemlerinin uygulanması ile etmenin bulaşıklığının azaltıldığı ya da tamamen ortadan kaldırıldığı bildirilmiştir. Bu amaçla ticari preparatlar değerlendirildiğinde %1 lik (%30-60 Asetik asit, %15.2 Peroksiasetik asit ,%11.2 Hidrojen peroksit) içeren (%50 Potasyum peroksimonopersülfana) içeren, ticari preparatların 30 dk'lık uygulamalarının yüzey dezenfeksiyonunu başarı ile sağlamaktadırlar.

6.2. Fiziksel Uygulamalar

Fiziksel tedavilerin diğer tedavilere göre birtakım avantajları vardır: çoğu ülkede kayıt veya onay gerektirmezler; geniş bir aktivite yelpazesine sahiptirler, toksik veya kirletici kalıntı bırakmazlar.

A. Isıl İşlemler

Isıl işlem veya termoterapi, patojenlerin genellikle tohum için zararlı olmayan veya çok az zararlı sıcaklıklarda öldürülmesi veya inhibe edilmesi ilkesine dayanır. Termal değişim verimliliklerindeki farklılıklar nedeniyle, başarılı dezenfeksiyon için gereken sıcaklık veya süre şu sırayla artar: sıcak su, gazlı buhar, kuru hava (Baker, 1972). Yirminci yüzyılın ikinci yarısında etkili kimyasal tohum tedavileri bulunmadan önce, sebze ve tahıl tohumlarının sterilize edilmesi için sıcak su uygulamaları yaygın olarak kullanılıyordu. Ana dezavantaj, işlem sonrası kurutma ihtiyacıdır. Sebze tohumları üzerinde sıcak su muameleleri, genellikle 50 °C ilâ 55 °C arasındaki sıcaklıklarda ve 3 ilâ 25 dakikalık sürelerle gerçekleştirilmektedir. Spesifik tahıl patojenlerinin kontrolü için, aralıklı sıcak su veya ılık su uygulamaları gibi bazı kombinasyonlar kullanılıyordu (Jahn, 2008). Sıcak su uygulamaları, çeşitli vejetatif bitki çoğaltma materyallerinin dezenfeksiyonu için hala önemlidir. Suda dezenfeksiyona kıyasla, havalandırılmış buharla tohum muamelesinin daha doğru bir sıcaklık kontrolü, genellikle tohum çimlenmesinde daha az bozulma ve tohumların çok daha kuru kalması gibi başlıca avantajları vardır. Patojen inaktivasyonu için gerekli olan nispeten uzun uygulama süreleri nedeniyle (birkaç günden 2 haftaya veya daha uzun süreye kadar), kuru ısı ile tohum muameleleri genellikle tohum çimlenmesinde azalmalara neden olmaktadır. Bununla birlikte, karmaşık ekipman gerektirmezler ve bu nedenle uygulanması kolaydır. Virüslerin hem vejetatif çoğaltma materyalinde hem de tohumlarda kuru ısıl işlemlerle inaktivasyonu ba-

şarılı bir şekilde gerçekleştirildiği birçok literatür ile desteklenmiştir. Rafikova ve ark. (2004) tarafından yapılan bir çalışmada düşük dozdaki sodium dodecylsulfate konsantrasyonlarının 52 ^{O}C'de TMV'ü kılıf proteininde düzensiz bir şekilde birikime neden olarak TMV'yi engellediği görülmüştür. Daha yüksek dozlarda ise oda sıcaklığında bile TMV kılıf proteininin yapısını tamamen bozmaktadır. Yapılan çalışmalarda tohum çimlenme oranı istatistiki olarak önemli ölçüde etkilenmemiştir. Sıcaklık uygulamalarda, 55 °C'de 2 saat sıcak su, virüs enfektivitesini etkisiz hale getirse de tohum çimlenmesi üzerinde de zararlı bir etki ile sonuçlanmıştır. Bununla birlikte, kuru ısı muamelesi (48 ilâ 72 saat için 72 veya 80 °C) tohum çimlenmesi üzerinde minimum etki ile PepMV enfeksiyonunu azaltmada etkili olmuştur (Ling, 2010).

Tomato Brown Rugose Fruit Virus (ToBRFV) ile enfekteli domateslerden elde edilen 1000 tohumun tohum kabuğunda virüsün taşındığı belirlenmiştir. Bu tohumlara kabuğundaki ToBRFV'ye karşı %1-9 hidroklorik asit, %1-5 kalsiyum hipoklorit, %1-3 sodyum hipoklorit, %10 trisodyum fosfat (TSP), %1 lik (%30-60 Asetik asit, %15.2 Peroksiasetik asit ,%11.2 Hidrojen peroksit) içeren (%50 Potasyum peroksimonopersülfana) içeren, ticari preparatların 30 dk'lık uygulamalarının yüzey dezenfeksiyonunu başarı ile sağlamaktadırlar. Enfekteli meyvelerden alınan tohumlarda %0.8 oranında ToBRFV'nin endosperme geçtiği tespit edilmiştir. Bunun arındırılmasında keselere konan ve kuru hava üflemesi yapan ve 50 rpm de dönen makinalar içerisinde (Şekil 1), 20 °C'de başlayıp kademeli olarak 1 günde 72 °C'ye çıkarmak ve takiben 2 gün 72 °C'de tutma sonucunda ToBRFV'nin patojenitesini yitirdiği, çimlenmenin de %96 olduğu belirlenmiştir (Fidan, 2022).

B. Diğer Fiziksel Uygulamalar

Fiziksel uygulamalara ek olarak düşük enerjili elektronların (örneğin e-ventus®) uygulamasına dayalı bir tohum işleme teknolojisi geliştirilmiştir. Temelde, tohum yüzeyindeki patojenlere karşı etkilidir (Jahn ve ark., 2005). Yüksek frekanslı elektromanyetik, ultrasonik dalgalar veya mikrodalgalar gibi çeşitli diğer fiziksel uygulamalar, tohum muamelesi olarak uygunlukları açısından incelenmiştir (Baker, 1972; Bhaskara Reddy ve ark., 1998), ancak ticarileştirilecek kadar bu uygulamalar başarılı bulunmamıştır.

Tohumla taşınan virüslerin inaktivasyonu için gama ışınlaması denenmiştir. Megahed ve Moore (1969), ışınlamadan sonra *Prunus* spp. tohumlarında *Prune Dwarf Virus* ve *Necrotic Ring Spot Virus* virüslerinin inaktivasyonunu bildirmiştir. Sharma ve Varma (1975), 20 KR'de gama ışını tedavisi ile enfekte edilmiş börülce tohumlarından *Cowpea Banding Mosaic Virus* CpBMV'nin elimine edilmesinde umut

verici sonuçlar elde edilememiştir. Daha yüksek dozlarda (30 ve 40 Gy) virüsün tohum geçişinde çok az bir oranda azalma olmuştur, ancak tohumların canlılığı ciddi şekilde etkilenmiştir. Tedaviden sonra çimlenme iyi olmasına rağmen, fidelerin çoğu, gama ışınlarının neden olduğu ölümcül bir mutasyon nedeniyle erken ölmüştür.



Şekil 1. Domates tohumlarında 'Kuru Hava Sterilizasyonu'.

Enfekte tohumların 2-tiourasil veya ısı gibi etkili kimyasal inhibitörlerle muamele edilmesi, ardından gama ışınlaması, enfekteli tohumların iyileştirilmesinde daha iyi sonuçlar verebilmektedir. *Barley stripe mosaic virus* (BSMV) ile yapılan araştırmalarada enfekteli tohumların 10.000 rad gamma ışınları ile uygulamaları simptomların ifadelerini önemli oranda azaltmıştır. *Tomato Mosaic Tobamovirus* (ToMV), *Tobacco Mosaic Tobamovirus* (TMV), *Cucumber Mosaic Cucumovirus* (CMV), *Soybean Mosaic Potyvirus* (SMV) ve *Lettuce Mosaic Potyvirus* (LMV) ile enfekte edilmiş sekiz tohum partisi seçilmiştir. Bir grup dezenfeksiyon kimyasallarının yanında ozon (O_3) ve UV (305 nm dalga boyu) kullanılarak virüs inaktivasyon uygulamaları yapılmıştır. Virüs konsantrasyonunu azaltmak için en etkili tedaviler HCl, ısıtılmış su (65 °C) ve ozon (10 g m^{-3}) olarak belirlenmiştir. Bu muameleler tohum kaynaklı virüslerin konsantrasyonlarını sırasıyla

%51, %42 ve %32 aralığında azaltmıştır. Diğer uygulamalar ise daha az etkili bulunmuş olup ve virüs konsantrasyonlarını %27-12 aralığında azaltmıştır. HCl ve ozon uygulamaları tohum çimlenmesini olumsuz etkilemediği için en etkili ve uygulanabilir yöntemler olmuştur (Paylan ve ark., 2014).

Yüzey sterilizasyonunu takiben 20 °C den başlayıp bir günde yavaş yavaş yükselerek 72 °C ye çıkarmak ve bunu takiben de 72 °C'de 2 gün boyunca dönerek kuru hava uygulamalarının tohum dezenfeksiyonunda etkili olduğu birçok çalışmada ortaya konulmuştur. Bu işlemleri gören tohumlar moleküler tekniklerle test edildiğinde (RT-PCR, PCR ve RT-qPCR) çok düşük oranda pozitif sonuçlar verebilmektedir. Yapılan uzun ısıl işlemler virüs hastalıklarının patojenitesini (hastalık yapma yeteneğini) kaybetmesine neden olacağından bu tohumlar çimlendirilip hastalık gözlemleri yapılarak tekrar test edilmelidir.

7. TOHUMLARDA TOBAMOVİRÜS TEŞHİSİ

Serolojik yöntemlerden biri olan enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) dayanan bitki virüslerinin saptanması için bir teknik olarak, tohumlarda virüslerin saptanması için başarılı bir şekilde uyarlanmıştır. ELISA sağlam bir teknik olarak kabul edilir ve viral kılıf proteinin alt birimlerinin saptanmasını sağlar. Bununla birlikte, ELISA'nın iki ana sınırlaması vardır: Yanlış-negatif ve pozitif sonuçlar ile her etmen için antiserumun bulunmamasıdır. Analiz için kullanılan antikorların özgüllüğü değişebilir ve yanlış sonuçlara yol açabilir. Uluslararası Tohum Federasyonu (*International Seed Federation-ISF-http://www.worldseed.org/*), Uluslararası Tohum Test Derneği (*International Seed Testing Association-ISTA https://www.seedtest.org/en/seed-health-methods-_content---1--1452.html*) ve Sebze Mahsulleri için Uluslararası Tohum Sağlığı Girişimi (*International Seed Health Initiative for Vegetable Crops-ISHI-Veg http://www.worldseed.org/our-work/phytosanitary- matters/seed-health/ishi-veg/#protocols*) tohum stok malzemelerinde patojen teşhisi için protokolleri uyarlamış, geliştirmiş ve doğrulamıştır (Çizelge 12).

Çizelge 12. *Tobamovirus*'ler ve diğer virüs etmenlerinin analizi için gerekli örnek sayıları ve uygulama yöntemleri

***Tobamovirus*'ler**	**Toplam/ bölünmüş örnek sayıları**	**Analiz yöntemi**
Tobacco mosaic virus (TMV) * Biber/domates	3000 250X12	Simptomatolojik: lokal lezyonlar; indikatör bitkiler Serolojik: ELISA Moleküler: RT-PCR/qRT-PCR

Çizelge 12 (devam). *Tobamovirus*'ler ve diğer virüs etmenlerinin analizi için gerekli örnek sayıları ve uygulama yöntemleri

***Tobamovirus*'ler**	**Toplam/ bölünmüş örnek sayıları**	**Analiz yöntemi**
Tomato mosaic virus (ToMV) * Biber/domates	3000 250X12	ELISA Simptomatolojik: lokal lezyonlar; indikatör bitkiler RT-PCR/qRT-PCR
Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV) * Biber/domates	3000 250X12	ELISA Simptomatolojik: lokal lezyonlar; indikatör bitkiler RT-PCR/qRT-PCR
Pepper mild mottle virus (PMMoV) *Biber/domates	3000 250X12	ELISA Simptomatolojik: lokal lezyonlar; indikatör bitkiler Opsiyonel: RT-PCR/qRT-PCR
Potexvirus *Pepino mosaic virus* (PepMV) *Domates	3000 250X12	ELISA Simptomatolojik: lokal lezyonlar; indikatör bitkiler *Nicotiana benthamiana*'da enfeksiyon Opsiyonel: RT-PCR/qRT-PCR
Comovirus *Squash mosaic virus* (SqMV) *Kabakgil	2000 100X20	ELISA Opsiyonel: RT-PCR/qRT-PCR
Carmovirus *Melon necrotic spot virus* (MNSV) *Kabakgil	2000 100X20	ELISA Opsiyonel: RT-PCR/qRT-PCR
Potyvirus *Pea seed-borne mosaic virus* (PSbMV) * Bezelye	2000 100X20	ELISA
Chlorovirus *Pea early-browning virus* (PEBV) *Bezelye	2000 100X20	ELISA

Solanaceae bitkilerini enfekte eden ToBRFV, TMV, ToMV ve PMMoV gibi Tobamovirüsler veya *Potexvirus Pepino Mosaic Virus* (PepMV) için en az 3000 tohum ve bunlar 250 şerlik lotlar halinde 12 partiye ayrılarak test edilmelidir. CGMMV, *Melon Necrotic Spot Virus* (MNSV, *Carmovirus*) ve *Squash Mosaic Virus* (SqMV, Comovirus) gibi kabakgilleri enfekte eden tohum kökenli virüslerin ve PSbMV (*Potyvirus*) ve PEBV (*Klorovirüs*) enfekte edenlerin tespiti için kabak ve bezelye tohumları, her biri 200 tohumdan oluşan 20 parti (toplam 2000 tohum) gereklidir. Testlemelerde %0.15 veya daha yüksek enfeksiyonların tespit edilmesi olasılığının %95'ini sağlamak için 100

tohumdan oluşan 20 alt numuneyi test etmek gerekmektedir. Kararlı bir tohum teşhisinin etkinliği birkaç parametreye dayanır. Bunlar; homojen tohum partisinden tohum numunelerinin rastgele toplanması ve çimlenme deneylerine paralel olarak kalibre edilen ve incelenen tohum dezenfeksiyon işlemleri gibi parametrelerdir. ELISA testi yalnızca kılıf proteininin alt birimini saptadığından, ELISA sonuçları ile viral partiküllerin durumu veya enfektivite derecesi arasında doğrudan bir bağlantı kurmak mümkün değildir. Bu sebeple imkanlar dahilinde tohum testlemelerinde Amplifiye kısmi genom fragmentlerinin saptayan ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction RT-PCR) veya kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction qRT-PCR) gibi daha hassas moleküler tabanlı yöntemler kullanılmalıdır. Bu testlemelerde zaman sorunu yok ise tohumlar çimlendirilerek test edilmelidir.

Tohum sağlığı ve canlılığı, ürünün verimini ve kalitesini sağlamada hayati bir rol oynar. Tohum sağlığını etkileyen çeşitli faktörler arasında en önemlisi tohumla taşınan bitki virüs hastalıklarıdır. Ayrıca, viral hastalıkların kolay biçimde yayılmaları nedeniyle, özellikle sonbahar dönemi üretimlerinde önemli ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Bu nedenlerden dolayı, hastalığın yayılmasını engellemek için korumaya yönelik önlemler önem kazanmaktadır. Virüs hastalıklarının kontrolünde etkili vektör ve yabancı ot mücadelesi, erken tanı ve teşhis, virüs kaynağının yok edilmesi temel koruyucu önlemler üretimin devamlılığı için hayati önem taşımaktadır. Virüsler ile mücadelenin temelini virüsten ari üretim materyali oluşturmaktadır. Tohum kaynaklı virüslerin etkin kontrolü, enfeksiyon kaynağı ortadan kaldırılarak sağlanabilmektedir. Virüsün ana veya tek kaynağı tohum enfeksiyonu olduğunda, virüssüz tohum bir hastalığın kontrolü için çok etkili bir araç olabilmektedir. Tohum kaynaklı virüslerin kontrolünde tohum tedavileri biyolojik, kimyasal, fizyolojik ve mekanik yöntemlerin kullanımını içerir. En yaygın kullanılanları kimyasal ve fiziksel yöntemlerdir. Bu yüzden, viral etmenler ile mücadelede üretim materyalinin virüsten arındırılması ve inaktifleştirilmesi hayati önem taşımaktadır. Enfekteli tohumu trisodyum fosfat (TSP), hidroklorik asit (HCL), kalsiyum hipoklorit ($Ca(ClO)_2$), ozon (O_3), hidrojen peroksit (H_2O_2), asetik asit (CH_3COOH) ve sodyum hipoklorit (NaClO) solüsyonlarında bekletmek, tohum kaynaklı virüslerin inaktivasyonu için en güvenli, en ucuz ve en etkili yoldur (Dombrovsky ve Smith, 2017). Fiziksel kontrol yöntemleri, tohumdan derine yerleşmiş enfeksiyonları yok etmek için ısı ve sıcak su uygulamalarının kullanımını içerir. Kimyasal kontrolün yetersiz kaldığı durum-

larda tohum kaynaklı virüslerin kontrolü için termoterapi kullanılmaktadır. Bugüne kadar farklı dezenfektan özellikteki kimyasallar ve termoterapi yöntemleri kullanılarak sebze tohumlarındaki virüslerin inaktivasyonuna odaklanan çeşitli çalışmalar yapılmıştır.

8. SONUÇ

Hijyenin en önemli unsur olarak karşımıza çıktığı tohum sektöründe başlangıç materyalinin hastalıktan ari veya izolasyon mesafelerine dikkat edilerek üretimini yapılması ve düzenli kontrollerin yapılarak test edilmesi gerekmektedir. Tohum aktarımının viral, bakteriyel ve fungal yayılmaya katkısı, tohumdan fideye aktarım hızının düşük olduğu koşullarda bile önemli olabilmektedir.

Tohumlarda bulunma olasılığı var olan çeşitli mikro organizmaların teşhis edilmesi ve ortadan kaldırılmaları için çeşitli uygulamalar yapılabilmektedir. Bu bölümde; tohumlarda bulunabilecek fungal, bakteriyel ve viral etmenlerin teşhisinde ve eradikasyonunda kullanımı mümkün olan fiziksel ve kimyasal bazı yöntemler açıklanmıştır. Bununla birlikte kullanılacak her yöntemin, tohumun fiziksel ve fizyolojik özelliklerine göre değişkenlik göstereceği de göz önünde bulundurulmalıdır.

KAYNAKLAR

Afouda L, Wolf G, Wydra K (2009). Development of a sensitive serological method for specific detection of latent infection of *Macrophomina phaseolina* in cowpea. Journal of Phytopathology 157: 15–23. doi:10.1111/j.1439-0434. 2008.01453.x

Agarwall VK, Sinclair JB (1987). Principles of Seed Pathology, Vol. 1 (XII, 176 p.) and Vol. 2 (XII, 168 p.) Boca Raton, Florida: CRC Press Inc.

Agarwal P, Dev U, Singh B, Indra R, Khetarpal R (2006). Seed-borne fungi detected in consignments of soybean seeds (*Glycine max*) imported into India. EPPO Bulletin 36: 53–58.

Albrechtsen SE (2006). Testing methods for seed-transmitted viruses: principles and protocols. CABI Publishing, Oxfordshire-UK, Cambridge, USA. ISBN: 0851990169. (doi: 10.1079/9780851990163.0000: cabidigitallibrary.org).

Anonymous (2022). https:\\www.seedtest.org\en\home.html (Erişim tarihi: 20 Nisan 2022).

Baayen RP (2000). Diagnosis and detection of host-specific forms of *Fusarium oxysporum*. EPPO Bulletin 30: 489–491.

Babadoost M (1992). Vegetable seed treatment. Report on Plant Disease No. 915, Department of Crop Sciences, University of Illinois Extension, Urbana, IL

Baker KF (1962). Thermotherapy of planting material. Phytopathology 52: 1244–1255.

Baker KF (1972). Seed pathology. In: Seed biology, vol 3. Kozlowski TT (Ed.). Academic, New York/London, pp: 318–416.

Barba M, Czosnek H, Hadidi A (2014). Historical perspective, development and applications of next-generation sequencing in plant virology. Viruses 6: 106–136. doi:10.3390/v6010106.

Brown JE, Lu TY, Stevens C, Akhan V, Lu JY, Wilson CL, Collins DJ, Wilson MA, Igwegbe ECK, Chalutz E, Droby S (2001). The effect of low dose ultraviolet light-C seed treatment on induced resistance in cabbage to black rot (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*). Crop Protection 20: 873-883.

Chen Y, Conner RL, Gillard CL, Boland GJ, Babcock C, Chang KF, Hwang SF, Balasubramanian PM (2007). A specific and sensitive method for the detection of *Colletotrichum lindemuthianum* in dry bean tissue. Plant Disease 91: 1271–1276. doi:10.1094/PDIS-91-10-1271.

Chen G, Wu C, Li B, Su H, Zhen S, An Y (2010). Detection of *Leptosphaeria maculans* from imported canola seeds. Journal of Plant Diseases and Protection 117: 173–176.

Chilvers M, Du Toit L, Akamatsu H, Peever T (2007). A real-time, quantitative PCR seed assay for *Botrytis* spp. that cause neck rot of onion. Plant Disease 91: 599–608.

Chung MY, Kim H, Beuchat LR, Ryu JH (2022) Antimicrobial activities of plant essential oil vapours against *Acidovorax citrulli* and *Xanthomonas campestris* on *Cucurbitaceae*, *Brassicaceae* and *Solanaceae* seeds. Journal of Applied Microbiology 132: 2189–2202. doi:10.1111/jam.15352.

Clark MF, Adams MJ (1977). Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. Journal of General Virology 34: 475-483.

Cook RJ (1993). Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens. Annual Review of Phytopathology 31: 53–80. doi: 10.1146/annurev.py.31.090193.000413.

Dadasoglu F, Kotan R, Karagöz K, Dikbaş N, Çakmakçı R, Çakır A, Kordali Ş, Özer H (2016). Effect of essential oil of *Origanum rotundifolium* on some plant pathogenic bacteria, seed germination and plant growth of tomato. AIP Conference Proceedings 1726: 020022. doi:10.1063/1.4945848.

Dhayal M, Lee SY, Park SU (2006). Using low-pressure plasma for *Carthamus tinctorium* L. seed surface modification. Vacuum 80: 499-506.

Dombrovsky A, Smith E (2017). Seed transmission of Tobamoviruses: Aspects of global disease distribution. In: Advances in Seed Biology. Jimenez-Lopez JC (Ed.). Chapter:12, pp: 233-260. Zagreb, Croatia. doi: 10.5772/intechopen.70244.

Duressa D, Rauscher G, Koike ST, Mou B, Hayes RJ, Maruthachalam K, Subbarao KV, Klosterman SJ (2012). A real-time PCR assay for detection and quantification of *Verticillium dahliae* in spinach seed. Phytopathology 102: 443–451. doi:10.1094/PHYTO-10-11-0280.

EPPO (2004). Standards, Good plant protection practice. EPPO Bulletin 34: 425–426.

EPPO (2020). EPPO Standards, Phytosanitary procedures. EPPO Bulletin 50: 362-363.

Fidan H, Sarikaya P, Yildiz K, Topkaya B, Erkis G, Calis O (2021). Robust molecular detection of the new *Tomato brown rugose fruit virus* in infected tomato and pepper plant from Turkey. Journal of Integrative Agriculture 20 (8): 2170-2179. doi:10.1016/S2095-3119(20)63335-4.

Fidan H (2022). *Tomato Brown Rugose Fruit Virus* (ToBRFV)'ün tohum üzerinde taşınma oranı, taşınma yeri ve eradikasyon işlemleri. Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Proje ID: 5713.

Goodman RN (1959). The influence of antibiotics on plants and plant disease control. In Antibiotics: Their Chemistry and Non-Medical Uses. Goldberg, H.S. (ed.). Princeton: van Nostrand, pp: 322–448.

Gordon-Lennox G, Walther D, Gindrat D (1987). Utilisation diantagonistes pour lienrobage des semences: Efficacit et mode diaction contre les agents de la fonte des semis. EPPO Bulletin 17: 631–637.

Hanssen IM, Mumford R, Blystad DR, Cortez I, Hasiów-Jaroszewska B, Hristova D, Pagán I, Pereira AM, Peters J, Pospieszny H, Ravnikar M, Stijger I, Tomassoli L, Varveri C, van der Vlugt R, Nielsen SL (2010). Seed transmission of Pepino mosaic virus in tomato. European Journal of Plant Pathology 126: 145. doi:10.1007/s10658-009-9528-x.

Harman GE (1991). Seed treatments for biological control of plant disease. Crop Protection 10: 166–171.

Harman GE, Nelson EB (1994). Mechanism of protection of seed and seedlings by biological seed treatments: Implications for practical disease control. In: Seed Treatment: Progress and Prospects. Martin TJ (Ed.). BCPC Monograph No: 57, England: Thornton Heath Inc., pp: 283–292.

Hermansen JE, Jorgensen J (1983). Historical aspects of the control of seedborne cereal disease in Denmark. Seed Science and Technology 11 (3a): 1005-1017.

Horuz S, Aysan Y (2018). Biological control of watermelon seedling blight caused by *Acidovorax citrulli* using antagonistic bacteria from the genera *Curtobacterium*, *Microbacterium* and *Pseudomonas*. Plant Protection Science 54: 138–146. doi:10.17221/168/2016-PPS.

Horuz S, Ocal A, Aysan Y (2018). Efficacy of hot water and chemical seed treatments on bacterial speck of tomato in Turkey. Fresenius Environmental Bulletin 27: 3185-3190.

Horuz S (2021). *Pseudomonas oryzihabitans*: a potential bacterial antagonist for the management of bacterial fruit blotch (*Acidovorax citrulli*) of cucurbits. Journal of Plant Pathology 103 (3): 751-758. doi: 10.1007/ s42161-021-00893-3.

Jahn M (2008). Physikalische Beizung. In: Handbuch Saatgutaufbereitung. Kruse M (Ed.). AgriMedia, Clenze, pp: 161–173.

Johansen E, Edwards MC, Hampton RO (1994). Seed transmission of viruses - current perspectives. Annual Review of Phytopathology 32: 363-386. doi:10.1146/annurev.py.32.090194.002051.

Johnson KL, Minsavage GV, Le T, Jones JB, Walcott RR (2011). Efficacy of a nonpathogenic *Acidovorax citrulli* strain as a biocontrol seed treatment for bacterial fruit blotch of cucurbits. Plant Disease 95: 697–704. doi:10.1094/ PDIS-09-10-0660.

Karabüyük F, Aysan Y (2019). Bazı bitki ekstraktlarının *Pseudomonas syringae* pv. *tomato'*nun neden olduğu domates bakteriyel benek hastalığına antibakteriyel etkisi. Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi 16 (2): 231-243. doi: 10.33462/jotaf.529499.

Katan J (1981). Solar heating (solarisation) for control of soilborne pests. Annual Review of Phytopathology 19: 211–236. doi:10.1146/annurev. py.19. 090 181.001235.

Khan JA, Dijkstra J (2002). Plant Viruses as Molecular Pathogens. - Food Products Press, an imprint of The Haworth Press, New York - London - Oxford 537 pp.

Kim SM, Nam SH, Lee JM, Yim KO, Kim KH (2003). Destruction of *Cucumber green mottle mosaic* virus by heat treatment and rapid detection of virus inactivation by RT-PCR. Molecules and Cells 16 (3): 338-342.

Kumar R, Gupta A, Srivastava S, Devi G, Singh VK, Goswami SK, Gurjar MS, Aggarwal R. (2020). Diagnosis and detection of seed-borne fungal phytopathogens. In: Kumar R, Gupta A editors. Seed-borne diseases of agricultural crops: Detection, diagnosis and management. Singapore: Springer, pp. 107-142.

Ling KS (2010). Effectiveness of chemo-and thermotherapeutic treatments on Pepino mosaic virus in tomato seed. Plant Disease 94 (3): 325-328. doi: 10.1094/PDIS-94-3-0325.

Mancini V, Romanazzi G (2014). Seed treatments to control seedborne fungal pathogens of vegetable crops. Pest Management Science 70: 860-868. doi:1002/ps.3693.

Mancini V, Murolo S, Romanazzi G (2016). Diagnostic methods for detecting fungal pathogens on vegetable seeds. Plant Pathology 65: 691–703.

Maude RB (1996). Seed Borne Disease and their Control Principles and Practise, Vol. XVII. Wallinford, England: CAB International, pp. 280.

Mlotshwa S, Voinnet O, Mette MF, Matzke M, Vaucheret H, Ding SW, Pruss G, Vance VB (2002). RNA silencing and the mobile silencing signal. The Plant Cell 14 (suppl 1): 289- 301. doi: 10.1105/tpc.001677.

Moisan M, Barbeau J, Moreau S, Pelletier J, Tabrizian M, Yahia LH (2001). Low-temperature sterilization using gas plasmas: a review of the experiments and an analysis of the inactivation mechanisms. International Journal of Pharmaceutics 226 (1-2): 1-21. doi:10.1016/s0378-5173 (01)00752-9.

Mukhopadhyay AN (1994). Biocontrol of soil borne fungal pathogens—Current status future prospects and potential limitations. Indian Phytopathology 47: 119–126.

Munkvold GP (2009). Seed pathology progress in academia and industry. Annual Review of Phytopathology 47: 285–311.

Nishioka T, Takai Y, Mishima T, Kawaradani M, Tanimoto H, Okada K, Misawa T, Kusakari S (2016). Low-pressure plasma application for the ınactivation of the seed-borne pathogen *Xanthomonas campestris*. Biocontrol Science 21: 37-43. doi:10.4265/bio.21.37.

Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yoneekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Research 28 (12): e63. doi:10.1093/nar/28.12.e63.

Oladokun JO, Halabi MH, Barua P, Nath PD (2019). Tomato brown rugose fruit disease: current distribution, knowledge and future prospects. Plant Pathology 68 (9): 1579-1586.

Ora N, Faruq AN, Islam MT, Akhtar N, Rahman MM (2011). Detection and identification of seed borne pathogens from some cultivated hybrid rice varieties in Bangladesh. Middle-East Journal of Scientific Research 10: 482–488.

Paylan İC, Erkan S, Cetinkaya N, Ergun M, Pazarlar S (2014). Effects of different treatments on the inactivation of various seedborne viruses in some vegetables. Ozone: Science& Engineering 36: 422–426. doi: 10.1080/ 01919512.2013.874275.

Pecenka J, Bytesnikova Z, Kiss T, Penazova E, Baranek M, Eichmeier A, Tekielska D, Richtera L, Pokluda R, Adam J (2021). Silver nanoparticles eliminate *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in cabbage seeds more efficiently than hot water treatment. Materials Today Communications 27: 102284. doi: 10.1016/j.mtcomm.2021.102284.

Raaijmakers Jos M, Mazzola M (2012). Diversity and natural functions of antibiotics produced by beneficial and plant pathogenic bacteria. Annual Review of Phytopathology 50: 403–424. doi:1146/annurev-phyto-081211-172908.

Rafikova ER, Panyukov YV, Arutyunyan AM, Yaguzhinsky LS, Drachev VA, Dobrov EN (2004). Low sodium dodecyl sulfate concentrations inhibit

Tobacco mosaic virus coat protein amorphous aggregation and change the protein stability. Biochemistry (Moscow) 69: 1372–1378. doi:10.1007/ s10541-005-0083-6.

Rao NK, Hanson J, Dulloo ME, Ghosh K, Nowell D, Larinde M (2006). Manual of Seed Handling in Genebanks. Rome, Italy: Bioversity International.

Raupach GS, Kloepper JW (1998). Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple cucumber pathogens. Phytopathology 88: 1158–1164. doi:10.1094/PHYTO.1998. 88.11.1158.

Reeves J (1998). Molecular diagnostics for pathogen detection in seeds and planting materials. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 52: 33–39.

Reingold V, Lachman O, Blaosov E, Dombrovsky A (2015). Seed disinfection treatments do not sufficiently eliminate the infectivity of *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV) on cucurbit seeds. Plant Pathology 64 (2): 245-255. doi:/10.1111/ppa.12260.

Salem N, Mansour A, Ciuffo M, Falk BW, Turina M (2016) A new tobamovirus infecting tomato crops in Jordan. Archives of Virology 161: 503–506. doi:10. 1007/ s00705- 015- 2677-7.

Samarah N, Sulaiman A, Salem NM, Turina M (2020). Disinfection treatments eliminated tomato brown rugose fruit virus in tomato seeds. European Journal of Plant Pathology 159: 153-162. doi:10.1007/s10658-020-02151-1.

Saygili H, Sahin F, Aysan Y, Soylu S, Mirik M (2019). Bitki Bakteri Hastalıklarıyla Kimyasal Mücadele. In: Bitki Bakteri Hastalıkları. Saygili H, Sahin F, Aysan Y (Eds.). İzmir: Meta Basım, 23s.

Schaad NW, Cheong SS, Tamaki S, Hatziloukas E, Panopoulos NJ (1995). A combined biological and enzymatic amplification (BIO-PCR) technique to detect Pseudomonas syringae pv. phaseolicola in bean extracts. Phytopathology 85: 243–248.

Schultz T, Gabrielson RL, Olson S (1986). Control of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in crucifer seeds with slurry treatments of calcium hypochlorite. Plant Disease 70: 1027-1030. doi:10.1094/PD-70-1027.

Selcuk M, Oksuz L, Basaran P (2008). Decontamination of grains and legumes infected with *Aspergillus* spp. and *Penicillum* spp. by cold plasma treatment. Bioresource Technology 99 (11): 5104-5109. doi:10.1016/ j.biortech. 2007.09.076.

Shargil D, Smith E, Lachman O, Reingold V, Darzi E, Tam Y, Dombrovsky A (2017). New weed hosts for Cucumber green mottle mosaic virus in wild Mediterranean vegetation. European Journal of Plant Pathology 148 (2): 473-480. doi:10.1007/s10658-016-1105-5.

Sharma SR, Varma A (1975). Cure of seed transmitted cowpea banding mosaic virus disease. Phytopathology 83: 144–151. doi:10.1111/j.1439-0434. 1975.tb03525.x

Strandberg JO, White JM (1989). Response of carrot seeds to heat treatments. Journal of the American Society for Horticultural Science 114: 766–769.

Takeuchi S, Hamada H, Toyoda K, Suzuki K, Kiba A, Hikichi Y, Okuno T (2005). Discrimination between tobamoviruses and their pathotypes for L-gene-mediated resistance in green pepper (*Capsicum annuum* L.) by reverse transcription-polymerase chain reaction. Journal of General Plant Pathology 71 (1): 60-67. doi:10.1007/s10327-004-0161-4.

Thyr BD, Webb RE, Jaworski CA, Ratcliffe TJ (1973). Tomato bacterial cancer: Control by seed treatment. Plant Disease Reports 57: 974–977.

Tireng Karut Ş, Horuz S, Aysan Y (2019). Domates bakteriyel kanser ve solgunluk hastalığı etmeni *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis'* in tohumda aranması ve farklı tohum uygulamalarının hastalık gelişimi üzerine olan etkisinin belirlenmesi. Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi 16 (3): 284-296. doi:10.33462/jotaf.526167.

Van Der Wolf JM, Birnbaum Y, Van Der Zouwen PS Groot SPC (2008). Disinfection of vegetable seed by treatment with essential oils, organic acids and plant extracts. Seed Science and Technology 36: 76-88.

Walcott RR, Gitaitis RD, Langston DB (2004). Detection of Botrytis aclada in onion seed using magnetic capture hybridization and the polymerase chain reaction. Seed Science and Technology 32: 425–438.