

# AKDENİZ BÖLGESİ PATATES ALANLARININ HALKA ÇÜRÜKLÜK HASTALIĞI (*CLAVIBACTER MICHIGANENSE* SUBSP. *SEPEDONICUM*) YÖNÜNDEN TARANMASI

Sebiha TOKGÖNÜL<sup>1</sup>

## ÖZET

Akdeniz Bölgesi'nde patates üretiminin yoğun olduğu illerde 1991 yılında yürütülen sürveylerde alınan patates yumru örnekleri Halka Çürüklük Hastalığı (*Clavibacter michiganense* subsp. *sepedonicum*) yönünden incelenmiştir.

Patates yumrularında gerek makroskobik inceleme gerekse Immunoflorescence boyama, gram boyama testleri sonucu söz konusu hastalığa rastlanılmamıştır.

## GİRİŞ

Ülkemizde patates alanı toplam 196.000 hektar, üretimi 4.350.000 tondur. Akdeniz bölgesinde ise toplam patates alanı 6.338 hektar, üretim 126.903 tondur (Anonymous, 1990).

Patates Bakteriyel Halka Çürüklük Hastalığı karantinaya tabi, tohumluk üretiminde sertifikasyonda toleransı sıfır olan, en önemli patates hastalıklarından biridir. Patates Halka Çürüklüğünün Türkiye'de var olduğuna dair ilk yayın Bremer et al. (1947) tarafından yapılmıştır. Adapazarı, Nevşehir, Ürgüp ve Ankara kaynaklı patateslerde yapılan simptomatolojik incelemeler sonucunda var olduğu bildirilmiştir (Karel ve Karahan, 1962). Patates hastalıklarıyla ilgili olarak ülkemizle uluslararası patates merkezi (CIP) arasındaki anlaşma çerçevesinde 1981-1983 yılları arasında patates hastalıkları sürveyi Dr. Turkensteen tarafından yapılmış ve bu hastalığın Türkiye'de bulunmadığı bildirilmiştir (Turkensteen, 1985). Daha sonra 4 yıllık sertifikasyon tarla ve depo kontrollerinin sonuçları ve Dr. Turkensteen'in sürvey sonuçları kanıt gösterilerek Avrupa Bitki Koruma Organizasyonu (EPPO)'nun dan 26.6.1984 tarihinde 84/6-RSE 452 sayılı *C.sepedonicum*'un Türkiye'de mevcut olmadığına dair karar çıkarılmıştır.

Bölgemizin önemli patates alanlarında *C.sepedonicum*'un varlığını araştırmak üzere yapılan bu çalışmada, Avrupa Topluluğunun EUR.11288-EN sayılı raporunda<sup>2</sup> belirtilen metotlar (Immunofluorescence boyama, Gram boyama) latent enfeksiyonları belirlemek için uygulanmıştır.

<sup>1</sup> Zıral Mücadele Araştırma Enstitüsü - 01230 Adana.

<sup>2</sup> Scheme for the detection and diagnosis of the ring rot bacterium *Corynebacterium sepedonicum* in batches of potato tubers. Report Commission of the European Communities. 1987.

Yazının Yayın Kuruluna geliş tarihi (Received) : 23.03.1992

**MATERYAL VE METOT**

**Örneklerin Toplanması :** Bu amaçla Akdeniz Bölgesi'nde patates üretiminin yoğun olduğu illerde tesadüfe göre hasat devresinde veya hasat sonrasında yumru örnekleri alınmıştır (Çizelge 1). Her örneklemede en az 200 yumru alınmıştır.

**ÇİZELGE 1.** Akdeniz Bölgesinde patates yumru örneği alınan iller, ekiliş alanı (Anonymous, 1990) ve örnek sayıları

| İLLER         | Ekiliş Alanı (ha) | Örnek Sayısı |
|---------------|-------------------|--------------|
| Antalya       | 1.731             | 5            |
| Adana         | 2.066             | 8            |
| Hatay         | 1.067             | 5            |
| Kahramanmaraş | 956               | 3            |
| İçel          | 509               | 3            |
| <b>TOPLAM</b> | <b>6.338</b>      | <b>24</b>    |

Çizelge 1 'de görüldüğü gibi Antalya ilinde toplam 5 örnek Kokuteli ilçesinden, Adana ilinde toplam 8 örnek Ceyhan ve Seyhan ilçelerinden, Hatay ilinde toplam 5 örnek Merkez ilçeden, Kahramanmaraş'ta toplam 3 örnek Elbistan ilçesinden, İçel ilinde toplam 3 örnek Tarsus ilçesinden alınmıştır. Bu ilçeler bölgemizde patates ekilişlerinin yoğun olarak yapıldığı ve özellikle yazlık olarak yetiştirildiği yörelerdir.

**Örneklerin Hazırlanması:** Her örnekte 200 yumru çeşme suyunda yıkandıktan sonra, her yumruda stolonların bağlandığı dip kısmının epidermisi steril bir bisturi ile soyulmuştur. Her yumruda dip kısmındaki (heel end) doku parçası steril bir bisturi yardımıyla koni şeklinde oyularak çıkarılmıştır. Dip kısımları çıkarılan yumrular ikiye bölünerek halkalı çürüklük belirtileri gözle incelenmiştir.

Her örnekte 200 yumrudan elde edilen doku parçaları 0.05 M Phosphat Buffer Seline (Phosphate tampon çözelti) (PBS, pH=7.0: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 4.26 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 272 g, NaCl 8 g, Distile su 1 lt.) içinde homojenizatörde parçalanmıştır. 1 lt PBS'e topaklanmayı önleyici olarak Tetra sodium pyrophosphate 1 g ve %0,1 oranında Tween 20 ilave edilmiştir.

**Bakterinin Ekstraksiyonu :** Elde edilen homojenat 10 dakika 180 g devirde santrifüjlenerek üst sıvı alınmıştır. Daha sonra üst sıvı 10 dakika 4000 g'de santrifüjlenerek üst sıvı atılmış, geride kalan çökelti 1 ml steril 0.01 M Phosphate Buffer Saline (PBS, pH=7.2 : Na<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub> . 12 H<sub>2</sub>O 2.7 g, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.4 g, NaCl 8 g, Distile su 1 lt) içinde çözülmüştür. Elde edilen süspansiyon IF testi ve gram boyamada kullanılmıştır.

**Immunofluorescence Boyama :** Bu çalışmada indirect IF yöntemi kullanılmıştır. Antiserum olarak Hollanda'dan (Plant Protection Research Institute Wageningen) getirilen PD-460 Nolu *C.michiganense* Subsp.. *sepedonicum* izolatına karşı hazırlanmış olan Polyclonal antiserum kullanılmıştır. IF testi için ayrılan süspansiyondan mikropipet yardımıyla 10 odacık içeren lamın (Flow) her bir odacığına 25'er mikrolitre konmuştur. Diğer lama ise PD-460 Nolu *C.sepedonicum* süspansiyonundan ( $10^6$  hücre/ml) 25 konarak pozitif kontrol lamı hazırlanmıştır. Lamalar  $37^{\circ}\text{C}$  de havada kurutulmuş ve alevde fikse edilmiştir.

a) Lamlardaki birinci hariç (negatif kontrol) diğer odacıklara steril PBS pH 7.2 ile 1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/60, 1/320, 1/640, 1/1280, 1/2560 oranında seyreltilen antiserumdan en seyreltilmiş olandan başlanarak 25  $\mu\text{l}$  eklenmiştir.

b) Lamalar 30 dakika süreyle nemli hücrede, karanlıkta, oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.

c) Hafifçe silkelenerak fazla sıvısı atılan lamalar önce 0.01 M PBS pH 7.2 ile durulanmış ve 5'er dakika 3 kez her seferinde değiştirilen 0.01 M PBS ile yıkanmıştır.

d) Fazla sıvı kurutma kağıdı ile alınmıştır.

e) Bu şekilde hazırlanan preparatlar TITC Konjugate (Sigma 6.005) ile boyanmıştır. Bu amaçla konjugata 1/100 oranında steril PBS PH 7.2 ile seyreltilmiş ve lamlardaki tüm odacıklara 25  $\mu\text{l}$  konulmuştur.

f) b, c ve d maddeleri tekrar edilmiştir.

g) 5-10  $\mu\text{l}$  0.1 M Glycerol Buffer pH 7.6 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$  3.2 g,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  0.15 g, glycerol 50 ml, distile su 100 ml) ile her pencere kaplanmış ve üzerleri lamel ile örtülmüştür.

Bu şekilde hazırlanan preparatlar Olympous epi floruresan mikroskopta 40 büyütmede immersiyon objektifte mikroskop alanının tümünü içerecek şekilde incelenmiştir. Pozitif kontrol lamında titer 1/2560 olarak belirlenmiştir.

**Gram Boyama :** Hazırlanan süspansiyonlardan Hucker'in modifiye edilmiş metoduyla (Lelliott ve Stead, 1987) gram boyama yapılmıştır. Pozitif kontrol olarak PD-460 nolu *C.sepedonicum* izolatı kullanılmıştır. Örnekler ve pozitif kontrol mikroskopta incelenmiş mavi-mor renkteki bakteriler gram-pozitif olarak değerlendirilmiştir.

## SONUÇLAR

Antalya, Adana, Hatay, Kahramanmaraş, İçel illerinin patates ekilişinin yoğun olarak yapıldığı ilçelerden toplanan örneklerdeki patates yumruları ikiye bölünerek halka çürüklük belirtisi yönünden incelenmiş ve herhangi bir hastalık belirtisine rastlanılmamıştır.

IF testi uygulanan örneklerin epifluorescens mikroskopta 40 büyütme immer-siyon objektif altında kontrol lamaları (PD-460) ile karşılaştırmalı olarak yapılan incelemelerinde tipik fluorescent bakteri hücrelere rastlanılmamıştır.

Örneklere ait süspansiyonların PD-460 ile karşılaştırmalı olarak yapılan gram boyamalarında PD-460 kontrol süspansiyonu ile hazırlanan gram pozitif preparatlarda mavi-mor renkte boyanan tipi hücreler belirlenirken örneklerde bu şekildeki hücrelere rastlanılmamıştır.

### TARTIŞMA VE KANI

Akdeniz Bölgesi'nde Antalya, Adana, Hatay, Kahramanmaraş, İçel illerinin patates ekilişinin yoğun olarak yapıldığı ilçelerden alınan örneklerin gerek mikroskopik incelemelerinde ve gerekse IF, gram boyama ve patlıcan testlerinin yapıldığı latent enfeksiyonların var olup olmadığının araştırıldığı testlerde herhangi bir Halkalı Çürüklük Hastalığı (*C.sepedonicum*) belirtisine rastlanılmamıştır. 1981 ve 1993 yılları arasında patates hastalıkları ile ilgili olarak yapılan surveylerde bu hastalığın ülkemizde olmadığı bildirilmiştir (Turkensteen, 1985). Konu ile ilgili olarak ülkesel proje kapsamında Ege Bölgesi'nde yürütülen çalışmada (Demir ve Gündoğdu, 1991) da hastalığa rastlanılmadığı bildirilmektedir. Keza Avrupa Topluluğunun 19 Aralık 1990 tarih ve 91/28/EEC sayılı komisyon kararında Türkiye'nin Adana'nın Karaisalı ve Düziçi ilçelerinden oluşan hattın güneyinde kalan kesimden ve İzmir'in Ödemiş ilçesinden Fransa, Belçika, Hollanda ve Lüksemburg'a patates ihracaatının yapılabileceği bildirilmektedir. Bu karar söz konusu topluluğun uzmanlarının bölgemizde yaptıkları incelemeler sonucunda alınmıştır. Bizim çalışmalarımız Akdeniz Bölgesi'nde ihracaata izin verilen bu yöre dışında yetiştirilen patateslerde de ihracaatı engelleyen bu hastalığın bulunmadığını ortaya koymuştur.

Dış karantina açısından toleransı sıfır (0) olan bu hastalığın yurdumuza girmesi için Karantina Müdürlükleri'nde özellikle tohumluk amacıyla yurtdışından getirilen patateslerde hastalığın var olup olmadığının anlaşılması için gerekli makroskopik kontrollerin yanı sıra latent enfeksiyonlarında teşhisine olanak sağlayan IF testlerinin de yapılması gerekmektedir.

### SUMMARY

#### **SURVEY ON THE BACTERIAL RING ROT DISEASE (*CLAVIBACTER MICHINGANENSE* SUBSP.*SEPEDONICUM*) OF POTATOES IN THE MEDITERANEAN REGION OF TURKIYE**

In the Mediterranean Region provinces which have high potato production we re investigated for bacterial ring rot disease of potatoes in 1991.

Potato tuber samples were examined by eye and by IF and Gram stains tests. According to results, there was not bacterial ring rot diseases of potatoes in the Mediterranean Region of Turkiye.

## LİTERATÜR

- ANONYMOUS, 1990. Tarımsal Yapı ve Üretim, 1988. T.C. Başbakanlık Devlet İstatistik Enstitüsü, Ankara.
- BREMER et al. 1947. Studies on the parasite fungi of Turkey. İstanbul Üniv., Fen. Fak. Mecmuası, Seri B (13): 1-95.
- DEMİR, G. ve M.GÜNDOĞDU, 1991. Patates Yumrularının Halka Çürüklüğü (*Clavibacter michiganense* Subp. *sepedonicum*) Hastalığı Yönünden İncelenmesi. Türkiye Fitopatoloji Derneği Yayınları No: 6, 295-298.
- KAREL, G. ve O.KARAHAN, 1962. Orta Anadolu Patateslerinde Erken Kuruma ve Yumru Çürümelerine Sebep Olan Amiller. Tarım Bakanlığı Ankara Zir.Müc.Araşt.Enst.Yayınları, No: 42, Ankara.
- TURKENSTEEN, L.J., 1985. Türkiye Patates Hastalıkları Sürveyi. Ege Bölge Zir.Müc.Araşt.Enst. Yayınları No: 62. Menemen-İZMİR.
- LELLIOT, R.A. and STEAD, D.E., 1987. Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. Blacwell Scientific Publications, Oxford, London, Edinburg.