

# ORTA ANADOLU BÖLGESİ PATATES EKİM ALANLARININ HALKALI ÇÜRÜKLÜK HASTALIĞI YÖNÜNDEN İNCELENMESİ

Kemal BENLİOĞLU<sup>1</sup>Y.Emin ÖKTEM<sup>1</sup>Meriç ÖZAKMAN<sup>1</sup>

## ÖZET

Patates yetiştirilen ülkelerde patatesin en tahripkar bakteriyel hastalıklarından biri olan halkalı çürüklük hastalığının tohum sertifikasyon kontrollerinde de toleransının sıfır olması ve bu hastalığın ülkemizde mevcut olup olmadığı konusunda çelişkili raporlar bulunması nedeniyle 1990 ve 1991 yıllarında bölgemizin önemli patates üretim alanlarının bulunduğu Afyon, Bolu, Nevşehir ve Niğde illerinden, herbiri 200 yumru içeren 176 örnek toplanmıştır. Toplanan örnekler Avrupa Topluluğunun önerdiği yöntemle göre öncelikle belirtiler bakımından gözle incelenmiş, daha sonra gram boyama, IFAS yöntemi ve patlıcan testi uygulanmıştır. Yapılan bu çalışmalar sonucunda yaklaşık 35.200 yumru incelenmiş ancak *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* saptanmamıştır.

## GİRİŞ

Ülkemizde patates üretimi 1985'ten itibaren 4 milyon ton civarına yükselmiş olup bu olumlu artışta en büyük etken üretim alanlarının genişlemesinin yanısıra birim alandan elde edilen ürünlerdeki artıştir<sup>2</sup>. Ancak ülkemizde üretilen patatesin önemli bir kısmı iç tüketimde değerlendirilmektedir. İhracatımız ise oldukça sınırlı olup toplam üretim içindeki payı % 0.3-0.6 gibi çok küçük miktarlarda kalmaktadır<sup>2</sup>. Bunun da önemli bir kısmı Ortadoğu ülkelerine yapılan ihracat olup Avrupa ülkelerine ise ihracatımız hemen hemen yoktur. İhracatımızın bu denli az olmasındaki nedenlerden en önemlileri depo koşullarının uygun düzeyde olmaması, ihracatta zorunlu standardın bulunmaması ve ülkemizde var olduğu öne sürülen Patates Halka Çürüklüğü Hastalığıdır.

Halkalı Çürüklük Hastalığı (*Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*) dünyada en tehlikeli patates hastalıklarından biridir. Bütün dünya ülkelerinde karantinaya tabi olup patates tohumluk sertifikasyonunda toleransı sıfırdır. Dünya patates ticaretinde önemli bir yeri olan hastalık CMI (Commonwealth Mycological Institute) kayıtlarına göre A.B.D., Kanada, Panama, Peru, Venezuela, Danimarka, Finlandiya, Norveç, Polonya, İsveç, Japonya, Kore, Lübnan ve Türkiye'nin de aralarında bulunduğu bazı ülkelerde mevcut olduğu bildirilmektedir.

*C.m.sepedonicus*'un ülkemizdeki varlığı ile ilgili ilk kayıt Bremer et al. (1947)'e ait olup, hastalığın Adapazarı'nda mevcut olduğunu bildirmiştir. Karel ve Karahan (1962) hastalığın Ankara'da birdepoda Nevşehir ve Ürgüp orijinli patates yum-

1 Ziraat Mücadele Araştırma Enstitüsü, 06172, Yenimahalle ANKARA.

2 Başbakanlık Hazine ve Dış Ticaret Müsteşarlığı EBİM kayıtları.

Yazının Yayın Kutulu'na geliş tarihi (Received): 25.05.1994

ularında %37.47, Ankara kaynaklı patateslerde ise % 15.16-29.04 oranında zarar yaptığını rapor etmiştir. 1981-1983 yılları arasında yapılan patates hastalıkları sürvey çalışmaları sonucunda ise hastalığın Türkiye'de izine dahi rastlanmadığı bildirilmiştir (Turkensteen, 1985).

1989 yılında ülkemizden Avrupa topluluğu ülkelerine yönelik patates ihracatıyla ilgili olarak toplulukça görevlendirilen bir uzman grubu patates alanlarımızı dolaşmıştır. Bu grubun sunmuş olduğu resmi raporlarda ülkemizde patates ihracatında yasaklamaya konu teşkil eden hastalıkların bulunup bulunmadığının laboratuvar testleriyle ortaya konduktan sonra ihracatın gerçekleştirilebileceğini ifade etmiştir.

Bu çalışma, ülkemiz patates üretiminin yaklaşık % 50'sinin gerçekleştirildiği Orta Anadolu Bölgesinin patates ekim alanlarında Patates Halka Çürüklüğü etmeninin bulunup bulunmadığını kesin olarak ortaya koymak amacıyla ele alınmış ve Avrupa Topluluğunun EUR 11288 EN sayılı raporunda belirtilen yöntem çerçevesinde planlanarak yürütülmüştür.

## MATERYAL VE METOT

### 1. Örneklerin Toplanması

Bu amaçla Orta Anadolu Bölgesinde patates üretiminin yoğun olarak yapıldığı illerden tesadüfi olarak Çizelge 1'de belirtilen sayıda hasat ve hasat sonrası devrede herbiri 200 yumru içeren patates yumru örnekleri toplanmıştır.

**ÇİZELGE 1.** 1990-1991 yıllarında patates yumru örneği alınan iller, üretim miktarları, ekiliş alanları ve örnek sayıları.

İller	Üretim* ton	Ekiliş Alanı* ha	Örnek Sayısı		Toplam Örnek sayısı
			1990	1991	
Afyon	126.101	6.098	—	7	7
Bolu	252.626	11.669	36	20	56
Nevşehir	812.185	25.317	70	12	82
Niğde	607.288	24.526	—	31	31
<b>TOPLAM</b>	<b>1.798.200</b>	<b>67.610</b>	<b>106</b>	<b>70</b>	<b>176</b>

\* Başbakanlık Devlet İstatistik Enstitüsü, Tarım İstatistikleri, 1986.

### 2. Örneklerin Hazırlanması

Her örnekteki 200 yumru musluk suyunda yıkandıktan sonra, her yumruda stolonların başladığı kısımda epidermis steril bir bistüri kullanılarak soyulmuştur. Her yumruda soyulan kısımdaki yaklaşık 0.5 g'lık iletim demetlerinin bulunduğu doku par-

çası bistiiri ile koni şeklinde çıkarılmıştır. Her örnekte 200 yumrudan çıkarılan doku parçaları 24 saat içinde işleme tabi tutulmuştur. Ayrıca dip kısımları çıkarılan yumrular bir bıçakla ortadan ikiye kesilerek halkalı çürüklük belirtileri yönünden görsel olarak incelenmiştir.

### 3. Bakterilerin Ekstarksiyonu

200 yumrudan elde edilen doku parçaları 30 ml steril 0.05 M PBS'de ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ : 4.26 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ : 2.72 g, NaCl: 8 g, Tween 20: 1 ml, Tetra Sodium Pyrophosphate: 1 g, Destile su: 1 l) 30 sn süreyle parçalanmıştır. Elde edilen karışım, üzerinde Whatman-1 filtre kağıdı konmuş sintered glass filter no: 2'den vakum pompası yardımıyla filtre edilmiş ve alınan filtrat 6000 g'de 20 dak. santrifüj edilmiştir. Bu işlemden sonra üst sıvı atılmış ve çökelti 1 ml steril 0.01 M PBS'te ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ : 2.7 g,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ : 0.4 g, Destile su: 1 l, pH: 7.2) çözülmüştür. Süspansiyon ikiye bölünerek yarısı  $-20^\circ\text{C}$ 'de referans olarak saklanmış, kalan yarısı ise Gram boyama, IF testi patlıcan testinde kullanılmıştır.

### 4. Gram Boyama

Hazırlanan süspansiyondan ya da yumrulardan Halkalı Çürüklük belirtisine benzer belirtiler görüldüğünde, örnekler Hucker'in modifiye edilmiş yöntemi ile Gram boyama yapılmıştır. Pozitif kontrol olarak Hollanda'dan temin edilen PD-460 veya NCPPB-2140 (National Collection of Plant Pathogenic Bacteria, Harpenden-İngiltere) no'lu *C.m. sepedonicus* izolatları kullanılmıştır.

### 5. IFAS (Immunofluorescent antibody staining) Testi

Bunun için indirekt immunofluoresan antikor boyama testinden yararlanılmıştır. Antiserum olarak 1990 yılı çalışmalarında Dr. Slack (University of Wisconsin, Madison-A.B.D.), 1991 yılı çalışmalarında ise Dr. Janse'den (Wageningen, Hollanda) sağlanan poliklonal antiserumlar kullanılmıştır.

Hazırlanan süspansiyondan steril PBS ile 1/10, 1/100 ve 1/1000 sulandırma serileri hazırlanmış, direkt örnek ve seyreltme serilerinden çok pencereci lamın her penceresine iki tekerrürlü olarak 25  $\mu\text{l}$  konmuştur. Ayrıca bir lama da bilinen *C.m. sepedonicus* (PD-460 veya NCPPB-2140) süspansiyonundan ( $10^6$  hüç/ml) 25  $\mu\text{l}$  konarak pozitif kontrol hazırlanmıştır. Hazırlanan lamlar havada kurutulmuş ve alevde fikse edilmiştir.

### IF Boyama

1. Çok pencereci lamın üst sırasındaki pencereciere 1/400, alt sırasındaki pencereciere ise 1/800 oranında seyreltilmiş antiserum 25  $\mu\text{l}$  konmuştur.

2. Lamlar oda sıcaklığında 30 dak. nemli hücrede inkube edilmiştir.

3. Lamlar, PBS ile 3 kez 5'er dak. yıkanmış ve dikkatlice kurulanmıştır.

4. FITC (Fluorescein iso thiocyanate) bağlı anti-tavşan serumu (Dakopatts, F-205) 1/40 seyreltilerek yine her pencereciere 25  $\mu\text{l}$  konmuştur.

5. 2 ve 3 tekrarlanmıştır.

6. Her pencereye 0.1 M Glycerol tamponundan ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ : 3.2 g,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ : 0.15 g, Glycerol: 50 ml, destile su: 100 ml, pH: 7.6) 5 ul konarak üzerine lamel kapatılmıştır. Hazırlanan preparatlar 487909 filtre seti ve HB 050 ışık kaynağı ile donatılmış Zeiss epifluoresan mikroskopta yaklaşık 400-1000 büyütmede neofluar objektif altında incelenmiştir.

Mikroskopta yapılan incelemelerde pozitif kontrollerde benzerlik gösteren ve yeşil fluoresans veren örnekler pozitif olarak kabul edilmiş ve bu örnekler patlıcan testi uygulanmıştır.

### 6. Patlıcan Testi

Bu test için saksılarda yetiştirilen Black Beauty çeşidi patlıcan bitkileri kullanılmıştır. IF testinde pozitif sonuç veren örnekler ait süspansiyonlar bitkilerin 2-3 yapraklı olduğu devrede ilk gerçek yaprak sapı ile gövdenin birleştiği kısma steril şırınga ile inokule edilmiştir. Bu amaçla her örneğin testlenmesinde 25 patlıcan bitkisi kullanılmıştır. Ayrıca 25 bitki bilinen *C.m. sepedonicus* bakterisi süspansiyonu, 25 bitki de steril PBS ile inokule edilmiştir. İnokulasyondan sonra patlıcan bitkileri 14 saat/gün ışık periyodunda gündüz sıcaklığı yaklaşık 21-24°C, gece 15°C olduğu koşullarda 40 gün boyunca inkube edilmişlerdir. İnkübasyon süresince yapılan incelemelerde patlıcan yapraklarında tipik solma, sararma ve nekrotik lezyonlar oluşan örnekler pozitif kabul edilmiştir.

## SONUÇLAR

1990 yılında Bolu ve Nevşehir illerinde, 1991 yılında Afyon, Bolu, Nevşehir ve Niğde illerinde patates ekim alanlarından hasat sırasında ve hasat sonrası depolardan alınan 176 örnek (yaklaşık 35.200 yumru) Gram boyama, IF ve patlıcan testinden oluşan yöntemle göre *C.m. sepedonicus*'un varlığı yönünden incelenmiştir.

Yumruların kesilerek yapılan görsel incelemelerinde tipik halkalı çürüklük belirtisine rastlanmamıştır. Ayrıca her örneğe ait süspansiyonlarda yapılan Gram boyamalarda belirgin Gram (+) hücreler görülmemiştir. İndirekt antikor boyama (IFAS) testinde ise bazı örneklerde özellikle düşük titrede (1/400) fluoresans veren bakteri hücrelerine rastlanmıştır. Ancak bu örnekler ait süspansiyonlarda patlıcan testi uygulamalarında hiç bir örnekte pozitif sonuç alınmamıştır. Yapılan çalışmalarla ilgili sonuçlar Çizelge 2'de verilmiştir.

ÇİZELGE 2. 1990-1991 yıllarında Afyon, Bolu, Nevşehir ve Niğde illerinde alınan patates yumurtlu örnek sayısı, patates çeşitleri ve yapılan test sonuçları.

İli	Patates çeşidi	Örnek sayısı	Görsel inceleme	Gram boyama	IF testi negatif	şüpheli	Patlıcan testi
Afyon	Agria	3	--	--	3	0	--
	Granola	4	--	--	4	0	--
Bolu	Ausonia	7	--	--	7	0	--
	Concorde	1	--	--	1	0	--
	Granola	2	--	--	2	0	--
	Marfona	13	--	--	12	1	--
	Planta	16	--	--	14	2	--
	Resy	17	--	--	16	1	--
Nevşehir	Agria	8	--	--	7	1	-
	Ausonia	6	--	--	6	0	--
	Granola	23	--	--	22	1	--
	Ilona	3	--	--	2	1	--
	Marfona	7	--	--	7	0	--
	Resy	6	--	--	6	0	--
	R.Burbank	13	--	--	11	2	--
	Shepody	1	--	--	1	0	--
	Diğer Çeş.	15	--	--	15	0	--
Niğde	Agria	2	--	--	1	1	--
	Ausonia	1	--	--	1	0	--
	Granola	14	--	--	13	1	--
	Ilona	4	--	--	3	1	--
	Marfona	8	--	--	8	0	--
	Resy	2	--	--	2	0	--
<b>TOPLAM</b>		<b>176</b>	--	--	<b>164</b>	<b>12</b>	--
<i>C.m.sep.</i>	PD-460		+	+	+		+
<i>C.m.sep.</i>	NCPB-2140		+	+	+		+

(+) pozitif sonuç, (-) Negatif sonuç

Çizelge 2 incelendiğinde Afyon, Bolu, Nevşehir ve Niğde illerinde alınan toplam 176 örnek incelenmiş ve bu örneklerden hiçbirinde görsel incelemelerde halkalı çirüklük belirtisine rastlanmamış, Gram boyama ve patlıcan testlerinden negatif sonuç alınmıştır. IF testinde ise 164 örnekte fluoresans veren bakteri hücrelerine rastlanmıştır ancak 12 örnekte morfolojik olarak *C.m.seprochiticus* bakterisine benzerlikle birlikte fluoresans veren (düşük titrede) hücrelere rastlanmıştır ancak bu örneklerden hiçbir patlıcanla testlilik belirtili olmamıştır.

### TARTIŞMA VE KANI

Ülkemizde ilk kez Bremer et al. (1947) halkalı çürüklük hastalığının Adapazarı'nda var olduğunu bildirmiş, Karel ve Karahan (1962) ise hastalığın Ankara'daki depolarda Nevşehir, Ürgüp ve Ankara kaynaklı patates yumrularında zarar yaptığını rapor etmişlerdir. Buna karşın Hollanda'lı bir araştırmacı olan Turkensteen tarafından 1981-1983 yılları arasında yapılan Türkiye patates hastalıkları surveyi sonucunda bu hastalığın ülkemizde mevcut olmadığı bildirilmiştir.

Yukarıda söz edilen çalışmalardan anlaşılacağı gibi Halkalı Çürüklük hastalığının ülkemizdeki varlığı ile ilgili simptomatolojik tanılara dayalı çelişkili bulgular mevcuttur. İki yıl boyunca ülkemiz tohumluk patates üretiminin merkezi sayılan Afyon, Bolu, Nevşehir ve Niğde illerinde yapmış olduğumuz çalışmalarda toplam 176 örnek (yaklaşık 35.200 yumru) Avrupa Topluluğunca önerilen bir yöntemle göre testlenmiş, yapılan çalışmalar sonucunda *C.m.sepedonicus*'a rastlanmamıştır. Etmenin saptanmasına yönelik çalışmalarımızda kullanılan yöntem tipik halkalı çürüklük belirtisi gösteren yumruların yanısıra latent infeksiyonların da saptanmasına olanak sağlayan çok duyarlı bir yöntemdir. Özellikle IF testi 1 g doku yaklaşık  $10^2$  bakteriyi saptayabilecek duyarlılıktadır (De Boer & Copeman, 1980). Patlıcan testi ise  $10^2 - 10^3$  hücre/ml bakteri konsantrasyonlarında bile pozitif sonuç verebilmektedir (Janse & Vaerenberg, 1987).

Çalışmalarımızda bazı örneklerle ait süspansiyonlarda IF testlerinde düşük titrede zayıf fluoresan veren bakteri hücrelerine rastlanmıştır. Mikroskopta yapılan incelemelerde pozitif sonuç veren bu bakterilerin morfolojik olarak pozitif kontrol *C.m.sepedonicus* hücrelerinden farklı olduğu gözlenmiştir. Şüpheli olarak bulunan bu örneklerle ait süspansiyonların hiçbirisi patlıcan bitkilerinde belirti oluşturmamıştır. IF testinde kullandığımız antiserumlar poliklonal özellikte olup, bu tür antiserumların Gram+ veya Gram- bazı diğer bakteri türleri ile çapraz reaksiyonlar verebileceği diğer araştırmacılarca da ortaya konmuştur (Crowley & De Boer, 1982; De Boer & Copeman, 1974).

Patates Halkalı Çürüklük hastalığı dünyada üzerinde en çok durulan ve patates ticaretini engelleyen en önemli patates hastalıklarından biridir. Orta Anadolu Bölgesinde önemli patates üretim alanlarında yapılan bu çalışma ile hastalığın bölgemizde mevcut olmadığı anlaşılmaktadır. Ancak ülkemizde patates tohumluk talebi büyük ölçüde ithalat yoluyla karşılanmaktadır. Patates tohumluk ithalatı yaptığımız ülkeler arasında Hollanda, Almanya, A.B.D. ve Kanada bulunmaktadır. Nitekim çalışmalarımızda testlenen Russet ve Burbank ve Shepody çeşitleri Amerika ve Kanada orijinli patateslerdir. Bakteriyel halka çürüklüğü hastalığı bu ülkelerde mevcut olup tohumluk patates üretiminde üzerinde titizlikle durulduğu ve pek çok tohumluk tarlasının bu nedenle A.B.D. ve Kanada'da sertifika alamadığı bildirilmektedir (De Boer & Slack, 1984). Ancak hastalığın latent karakterde yumrulara bulunma durumu bu ülkelere ithal edilen tohumluklarla *C.m.sepedonicus*'un ülkemize girme riskini arttırmaktadır.

Sonuç olarak ülkemizde bir an önce doku kültürüne dayalı yöntemlerle patates tohumluk üretimine yönelik çalışmaların başlatılması, hastalığın mevcut olduğu (A.B.D., Kanada, Danimarka vb.) ülkelere tohumluk ithalatı yapılmaması, diğer ülkelere ithal edilen patates tohumluklarının da uygulanan bu yöntem çerçevesinde karantina teşkilatı tarafından rutin olarak kontrollerinin yapılmasının uygun olacağı kanısındayız.

## SUMMARY

### EXAMINATION OF THE POTATO GROWING AREAS OF CENTRAL ANATOLIA FOR THE PRESENCE OF RING ROT DISEASE

*Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*, casual organism of bacterial ring rot is one of the most important and destructive disease of potato and its tolerance on the seed certification is zero. There were contradictory reports, based on symptomatological findings whether or not ring rot disease was present in potato growing areas of Türkiye. In this study, the presence of *C.m. sepedonicus* was investigated with accepted and recommended detection method by EC in the potato growing areas of Afyon, Bolu, Nevşehir and Niğde in 1990-1991. Totaly 176 samples-each was containing 200 tubers-were collected from four different provinces mentioned above. Tubers were examined visually at first and then Gram staining, IFAS and egg plant test were applied. Consequently, about 35.200 tubers were examined and it was determined that *C.m. sepedonicus* was not present in Central Anatolia.

## LİTERATÜR

- BREMER, H., G. İŞMEN., H. KAREL and M. ÖZKAN, 1947. Studies on the parasite fungi of Turkey. İstanbul Üniv., Fen Fak. mecmuası, Seri-B 13 : 1-55.
- CROWLEY, C.F. and S.H. DE BOER, 1982. Non-pathogenic bacteria associated with *Corynebacterium sepedonicum* in immunofluorescence. Am. Potato Jour. 59: 1-8.
- DE BOER, S.H. and R.J. COPEMAN, 1974. Endophytic bacterial flora in *Solanum tuberosum* and its significance in bacterial ring rot diagnosis. Can. Jour. of Plant Science, 54: 115-122
- \_\_\_\_\_ and \_\_\_\_\_, 1980. Bacterial ring rot testing with indirect fluorescent antibody staining procedure. Am. Potato Jour., 57: 457-465.
- \_\_\_\_\_ and S. A. SLACK, 1984. Current status and prospects for detecting and controlling bacterial ring rot of potatoes in North America. Plant Disease, 68: 841-844.
- JANSE, J.D. and J. VANVAERENBERGH, 1987. Interpretation of the EC method for the detection of latent *Corynebacterium sepedonicum* infections in potato. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, 17: 1-10.
- KAREL, G. ve O. KARAHAN, 1962. Orta Anadolu Bölgesinde patateslerde erken kuruma ve yumru çürümelerine neden olan faktörler. Zir. Müc. Arşt. Enst. yayınları No: 42, Tarım Bakanlığı, Ankara.
- TURKENSTEEN, L.J., 1985. Türkiye patates hastalıkları sürveyi. Ege Bölge Zir. Arşt. Enst. yayınları, No: 62, Menemen, İzmir.