

Bitki Koruma Bülteni / Plant Protection Bulletin

http://dergipark.gov.tr/bitkorb

Original article

Determination of the presence of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on tomato seedlings used in Tokat province

Tokat ilinde kullanılan domates fidelerinde *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in varlığının belirlenmesi

Sabriye BELGÜZAR ^a, Yusuf YANAR ^a, Yeşim AYSAN ^b

^a Tokat Gaziosmanpaşa University, Faculty of Agriculture, Department of Plant Protection, Tokat, Turkey

^b Çukurova University, Faculty of Agriculture, Department of Plant Protection, Adana, Turkey

ARTICLE INFO

Article history:

DOI: 10.16955/bitkorb.489802

Received : 29.11.2018

Accepted : 14.05.2019

Keywords:

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis*, tomato bacterial cancer and wilt disease, Tokat, PCR.

* Corresponding author:

Sabriye BELGÜZAR

✉ sabriye.yazici@gop.edu.tr

ABSTRACT

This study aimed to determine *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*) caused tomato bacterial cancer and wilt disease on tomato seedling used by farmers in Tokat province. In 2013, 2015, 2016, 2017 and 2018 years 104, 82, 94, 102 and 169 tomato seedling samples were taken from seedling providers located in Central, Turhal, Pazar, Niksar and Erbaa in Tokat, respectively. The disease agent was detected on tomato seedling by specific polymerase chain reaction (PCR) assay after streaking on semiselective medium and extracting DNA of the bacteria growing on the medium. In 2013, 2015 and 2016, 19 out of 104, 7 out of 82 and 4 out of 94 tomato seedlings were infected with pathogen, respectively. On the other hand the disease agent was not detected in tomato seedlings samples collected in 2017 and 2018 years. According to results of this study, in seedling entered to the province, contamination ratio with *Cmm* decreased at important level.

GİRİŞ

Domates ülkemizde üretimi ve tüketimi en fazla olan sebzedir. Ülkemizde yetiştiriciliği hızla artan domates hem açıkta sofralık olarak hem de örtü altında turfanda yetiştirilmektedir. Özellikle Marmara, Akdeniz ve Ege Bölgelerinde büyük alanlarda domates üretimi yapılmaktadır. Tokat ilinde de domates, üreticilerin önemli gelir kaynaklarından birini oluşturmaktadır. Tokat ilinde Merkez ve ilçeler dahil 2017 yılında 59.969 da ekiliş alanından 456.873 ton sofralık ve salçalık domates üretimi gerçekleştirilmiştir (TÜİK 2018).

Tokat ilinde domates yetiştiriciliğinde çok sayıda hastalık sorun olmaktadır. Bu sorunlardan dolayı hem verim ve ürün azalmakta hem de kalite düşmektedir. Domates bakteriyel kanser ve solgunluk hastalığı domates

üretiminde sorun olan en önemli hastalıklardan birisidir. Hastalık etmeni *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis et al. (*Cmm*) ilk kez Amerika Birleşik Devletlerinin Michigan eyaletinde saptanmış olup, Dünya'nın domates yetiştirilen bütün bölgelerine de yayılmıştır (EPPO 2019, Gleason et al. 1993). Hastalık etmeninin inokulum kaynakları, başta bulaşık tohum ve fideler olmak üzere *Cmm* ile bulaşık toprak, topraktaki bitki artıkları, yabancı otlar, enfekteli bitkilerdir (Gitaitis et al. 1989). *Cmm* sistemik taşınan bir hastalık etmeni olduğu için özellikle enfekteli tohumlarla yayılmaktadır. Üretim materyalindeki %0.01-0.05 (1000 fide başına 1-5 hastalıklı tohum) gibi düşük bir tohum bulaşma oranı bile tarlada önemli bir epideminin başlangıcı olabilmektedir

(Chang et al. 1991). Hastalık etmeni ile mücadelede en etkin yöntem, başlangıç inokulumunun azaltılmasıdır. Bu bağlamda, sertifikalı hastaliksız tohum ve fide kullanımı bakteriyel kanser ve solgunluk hastalığının mücadelesinde büyük önem arz etmektedir. Enfekteli tohumlar ve yine bu tohumlardan elde edilen fidelerin kullanımı ile hastalık yayılabilmekte ve büyük ürün kayıplarına neden olabilmektedir (Chang et al. 1992).

Tokat ilinde özellikle 2010 yılından itibaren *Cmm*'in neden olduğu Domates bakteriyel kanser ve solgunluk hastalığı büyük epidemiyi yapmış ve yıllara göre değişmekle beraber %100'lere varan ürün kayıplarına neden olmuştur. Domates üretiminin yoğun olarak yapıldığı Tokat ilinde 2011 ve 2012 yıllarında yapılan çalışmada, Domates bakteriyel kanser ve solgunluk hastalığının bölgede 2011 yılında %18-88, 2012 yılında ise %0-62 oranlarında yaygın olduğu belirlenmiş ve biyokimyasal testler ile moleküler yöntemlerle etmenin tanısı yapılmıştır (Belgüzar et al. 2016). Bölgede patojenin epidemiyolojisine yönelik yapılan çalışmalarda etmenin toprakta ve toprağa karıştırılan bitki artıklarında bir sonraki sezona kadar canlılığını sürdüremediğini ortaya koymuştur. Ancak bulaşık tohumlarda uzun süre canlı kalabildiği belirlenmiştir (Belgüzar et al. 2018). Bu bulgular doğrultusunda, 2010 yılı ve sonrasında bölgede domates üretim alanlarında görülen bakteriyel solgunluğun fide kaynaklı olabileceği kanısına varılmıştır.

Tokat ve çevresinde domates üretiminin çoğu Mersin ve Antalya'dan gelen hazır fidelerle gerçekleşmektedir. Bu nedenle fide kaynaklı enfeksiyonların hastalığın epidemiyi oluşturmada önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Hastalık belirtisi göstermeyen domates fidelerinde tarlaya şaşırtılmadan önce *Cmm*'in varlığının belirlenmesi büyük önem taşımaktadır. Çalışma, 2013, 2015, 2016, 2017 ve 2018 yıllarında Tokat yöresinde kullanılan domates fidelerinde Domates bakteriyel kanser ve solgunluk hastalığına sebep olan hastalık etmeni *Cmm*'in varlığının belirlenmesi amacıyla yapılmıştır.

MATERYAL VE METOT

Domates fideleri

Çalışmada kullanılan domates fideleri 2013, 2015, 2016, 2017 ve 2018 yıllarında Tokat ili ve ilçelerinde domates fidesi satışı yapan zirai ilaç bayilerinden toplanmıştır.

Besi yerleri

Çalışmada nutrient broth (NB) (23 g nutrient broth, 1000 ml distile su) ve yarı seçici SCM [(0.1 g yeast extract, 10 g sucrose, 1.5 g H₃BO₃ (boric acid), 0.25 g MgSO₄.7H₂O, 2 g K₂HPO₄, 1.5 g KH₂PO₄, 15 g agar, 1000 ml distile su, 1.0 ml potassium tellurite (%1 Chapman tellurite solüsyonu

Difco), 121 °C'de 15 dk. otoklav işleminden sonra soğuk steril edilen 30 mg nalidixic acid, 100 mg (20 mg/ml distile su) nicotinic acid, 200 mg cycloheximide (200 mg/ml metanol)] (Fatmi and Schaad 1988) besi yerleri kullanılmıştır.

Primer çifti

Çalışmada *Cmm*'e spesifik CMM5:5'-GCGAATAAGCCCATATCAA-3' ve CMM6:5'-CGTCAGGAGGTTCGCTAATA-3' primer dizimleri (Dreier et al. 1995, Iontek marka) kullanılmıştır.

Yürütülen çalışmada 2013, 2015, 2016, 2017 ve 2018 yıllarında Nisan-Haziran aylarında Tokat Merkez, Turhal, Pazar ve Erbaa ilçelerinde domates fidesi satışı yapan zirai ilaç bayilerine gidilerek domates fide örneklemeleri yapılmıştır. 2013 yılında 104 adet, 2015 yılında 82 adet, 2016 yılında 94 adet, 2017 yılında 102 adet, 2018 yılında ise 169 adet domates fide örneği alınmıştır. Bayilerden alınan fideler naylon poşetlere konularak çeşit isimleri, fidelik isimleri, lot numaraları, fidenin alındığı bayinin ismi, fide örneğinin alındığı tarih gibi bilgiler yazılarak etiketlenmiştir. Domates fidelerinde *Cmm*'in varlığı/yokluğu Belgüzar et al. (2017)'nin belirlediği yöntemle yapılmıştır.

Toplanan domates fide örneklerinin kök boğazı kısımlarından kesilerek yeşil aksamları alınmıştır. Yeşil aksam kısımlarının ağırlıkları tartılmış, ağırlığının 10 katı NB sıvı besi yerine konularak 3 saat çalkalanmıştır. Süre bitiminde, bitki parçaları süzgeçten süzülerek uzaklaştırılmış ve kalan sıvı 15.000 rpm'de 10 dk. santrifüj edilerek pelet toplanmıştır. Elde edilen peletler 9'ar ml saline buffer (%0.85 g NaCl) içinde tekrar süspansiyon edilmiştir. Süspansiyon 3 kez seyreltilerek elde edilen seyreltme serileri yarı seçici SCM besi yerine iki tekrarlı olarak yayma yöntemi ile ekim yapılmıştır. 28 °C'de 5 günlük inkübasyondan sonra uygun seriden SCM besi yerlerinde gelişen tüm bakteri kolonileri steril bir öze yardımıyla toplanarak, 9 ml NB sıvı besi yerine alınmış ve DNA izolasyonunu takiben PCR analizleri yapılmıştır. Gelişen bakterilerin DNA izolasyonu Nejat et al. (2009)'a göre yapılmıştır. DNA izolasyonundan sonra patojene spesifik olan CMM5:5'-GCGAATAAGCCCATATCAA-3' ve CMM6:5'-CGTCAGGAGGTTCGCTAATA-3' primer dizimleri kullanılarak yapılan PCR çalışmasında %1'lik agaroz jel üzerinde 614 bp büyüklüğünde bant oluşumu pozitif olarak değerlendirilmiştir (Dreier et al. 1995).

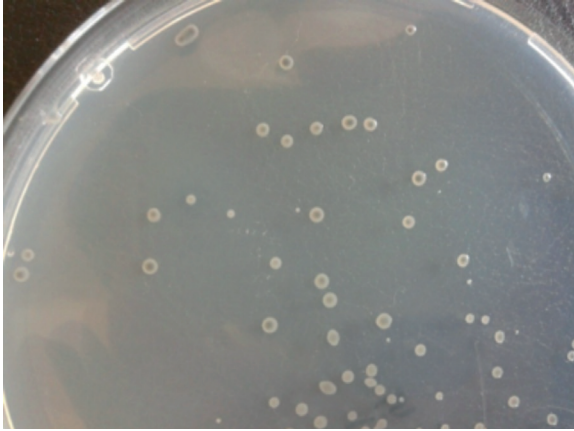
SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Tokat ilinde üreticiler tarafından kullanılan domates fidelerinde Domates bakteriyel kanser ve solgunluk

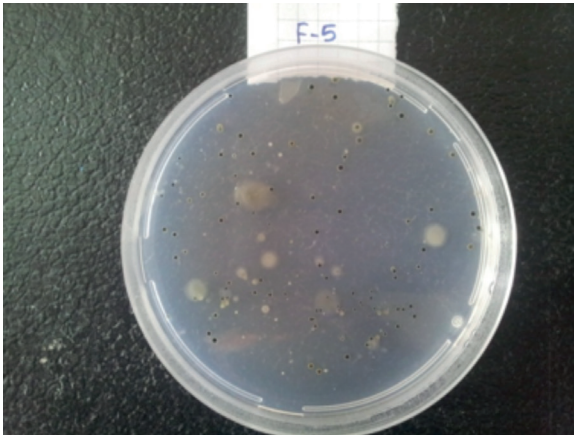
Çizelge 1. 2013, 2015, 2016, 2017 ve 2018 yıllarında Tokat iline gelen domates fidelerinin *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* ile bulaşıklık düzeyleri

| Yıllar | Örnek sayısı (adet) | Cmm ile bulaşık fide sayısı (adet) | Cmm ile bulaşıklık oranı (%) |
|--------|---------------------|------------------------------------|------------------------------|
| 2013 | 104 | 19 | 18.26 |
| 2015 | 82 | 7 | 8.53 |
| 2016 | 94 | 4 | 4.25 |
| 2017 | 102 | 0 | 0 |
| 2018 | 169 | 0 | 0 |

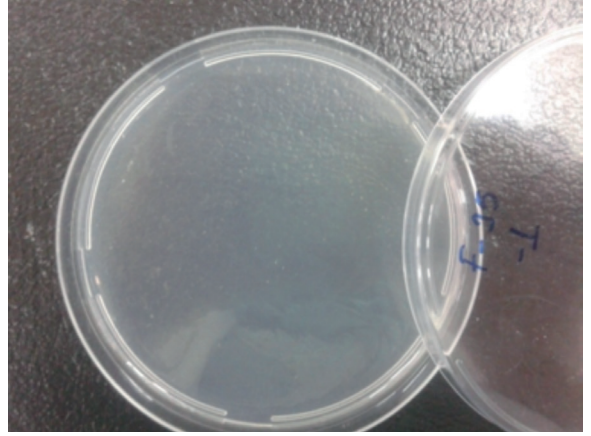
hastalığı etmeni *Cmm*'in epifitik popülasyonunun belirlenmesi için, fidelerden elde edilen süspansiyonlar SCM besi yerine ekilmiş, besi yerinde koloni gelişimini takiben DNA izolasyonu ve PCR çalışması yapılmıştır. 2013, 2015, 2016, 2017 ve 2018 yıllarında Tokat iline gelen domates fidelerinin *Cmm* ile bulaşıklık düzeyleri Çizelge 1'de verilmiştir. Yapılan çalışmalarda elde edilen bulgulara göre, 2013 yılında çalışılan 104 fide örneğinden 19'unda (%18.26) Domates bakteriyel kanser ve solgunluk hastalığı etmeni *Cmm* ile bulaşıklık belirlenmiştir (Şekil 1 ve Şekil 2).



Şekil 1. SCM besi yerinde *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in gelişimi



Şekil 2. SCM besi yerinde F-5 fidesinden gelişen koloniler



Şekil 3. F-35 fide örneğinde SCM besi yerinde koloni gelişimi görülmemiştir

2015 yılında yürütülen çalışmada ise testlenen 82 fideden 8'i SCM besi yerinde *Cmm*'ye benzer koloni gelişimi göstermiştir. Bu 8 fide ile yapılan PCR çalışmasında ise 7 fidede *Cmm* hastalık etmenine rastlanılmıştır. Bu bilgilere göre 2015 yılında toplanan 82 fide örneğinin 7'sinde (%8.53) *Cmm* tespit edilmiştir.

Çalışmanın devamı olarak 2016, 2017 ve 2018 yıllarında ise bu oran daha da düşmüştür. 2016 yılında 94 domates fidesi ile çalışma yapılmıştır. Testlenen 94 fide örneğinin 4'ünde (%4.25) hastalık etmenine rastlanılmıştır. 2017 yılında 102 adet, 2018 yılında ise 169 adet domates fidesi toplanmış olup, yapılan testlerde her iki yılda toplanan fidelerin hiçbirinde (%0) hastalık etmenine rastlanılmamıştır (Şekil 3).

Benzer çalışmalar çeşitli araştırmacılar tarafından da gerçekleştirilmiş olup, yapılan çalışmalarda semptomsuz bitkilerde hastalık etmeninin varlığının ELISA, BIO-PCR, yağ asit profil testleri ile belirlenebileceği bildirilmiştir. Gitatis et al. (1991), Güney Georgia'da 24 araziden toplanan 24.000 fide ile yaptıkları çalışmada yarı seçici (mCNS) besi yeri kullanmışlardır. Toplanan fidelerin yalnızca 3'ünde mCNS besi yerinde *Cmm*'e rastlanılmıştır. Elde edilen sonuçlar yapılan ELISA ve yağ asit profil testleriyle de teyit edilmiştir. Burokiene (2006) tarafından yapılan bir diğer çalışmada ise domates fidelerinde *Cmm*'in varlığı BIO-PCR metodu ile saptanmıştır. Çalışmada türe spesifik CMM5 ve CMM6 primerleri kullanılmış ve elde edilen sonuçlara göre, ilk enfeksiyon aşamasında bile patojenin varlığının tespit edilebileceği ortaya konulmuştur.

Sonuç olarak bu çalışma ile, 2013, 2015, 2016, 2017 ve 2018 yıllarında Tokat iline gelen domates fidelerinin *Cmm* ile bulaşıklık düzeyleri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar, fide kaynaklı bulaşıklık oranının yıllara göre azalma eğilimi gösterdiğini ve özellikle 2017 ve 2018 yıllarında örneklenen

fidelerin tamamen hastalısız olduğunu göstermektedir. Buna ilaveten Belgüzar et al. (2018) tarafından Tokat ilinde hastalık etmeni *Cmm*'in epidemiyolojisi ile ilgili yapılan bir çalışmada, Tokat ili domates üretim alanlarında *Cmm* ile bulaşık topraklarda yaz aylarında 15 gün, kış aylarında 30 gün, toprakta bulunan bitki artıklarında ise 30 gün canlı kalabildiği belirlenmiştir. Aynı çalışma içerisinde patojenin tohumdaki yaşam süresi ise 370 gün olarak belirlenmiştir. Bu çalışma, bulaşık tohumların birincil inokulum kaynağını oluşturduğunu ve tohumlardaki inokulumun hastalığı başlatacak yeteneğe sahip olduğunu göstermektedir. Bu durum, hastalığın Tokat ilindeki epidemiyolojisinde, yayılışında kullanılan fidelerdeki bulaşıklığın rolünü de ortaya koymaktadır. Bu bağlamda, Tokat iline giren domates fidelerindeki epifitik bulaşmaların saptanması ve bunu engellemeye yönelik tedbirlerin alınarak bulaşık fide kaynaklı hastalığın üretim alanında yayılmasının engellenmesi, oluşacak ekonomik kayıpların minimuma indirilmesi açısından önem arz etmektedir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Tokat Valiliği İl Özel İdaresi tarafından desteklenmiştir. Bu çalışmaya ait 2013 yılı verileri ilk yazarın doktora çalışmasından üretilmiştir. Ayrıca 2015 yılı verileri de Uluslararası Katılımlı Türkiye VI. Bitki Koruma Kongresi'nde özet bildiri (poster) olarak sunulmuştur.

ÖZET

Bu çalışma, üreticiler tarafından Tokat ilinde kullanılan, hastalık belirtisi göstermeyen domates fidelerinde Domates bakteriyel kanser ve solgunluk hastalığı etmeni *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*)'in varlığının belirlenmesi amacıyla yapılmıştır. Tokat Merkez, Turhal, Pazar, Niksar ve Erbaa ilçelerinden 2013 yılında 104, 2015 yılında 82, 2016 yılında 94, 2017 yılında 102 ve 2018 yılında 169 adet domates fide örneği toplanmıştır. Toplanan örneklerden hazırlanan süspansiyonlar yarı seçici besi yerine ekilmiş, gelişen bakteriler toplanarak DNA izolasyonundan sonra etmene spesifik primerler ile polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) analizi yapılmıştır. Yapılan çalışma sonucunda, 2013 yılında Tokat Merkez ve ilçelerinden toplanan 104 fide örneğinin 19'unda, 2015 yılında 82 fide örneğinin 7'sinde, 2016 yılında 94 fide örneğinin 4'ünde etmene rastlanılırken, 2017 yılında toplanan 102 fide örneğinde ve 2018 yılında toplanan 169 fide örneğinde hastalık etmenine rastlanılmamıştır. Bu çalışma sonuçlarına göre, bölgeye giriş yapan fidelerde *Cmm* ile bulaşıklık oranı önemli düzeyde azalmıştır.

Anahtar kelimeler: *Clavibacter michiganensis* subsp.

michiganensis, domates bakteriyel kanser ve solgunluk hastalığı, Tokat, PCR

KAYNAKLAR

Belgüzar S., Yanar Y., Aysan Y., 2016. Tokat ilinde domates bakteriyel solgunluk hastalığının yaygınlığı ve etmenin (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) tanınması. Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Dergisi, 33 (2), 34-40.

Belgüzar S., Horuz S., Aysan Y., Yanar Y., 2017. Investigation on the appropriate method for determination of epiphytic population of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on tomato. The Journal of Turkish Phytopathology, 46 (3), 89-99.

Belgüzar S., Yanar Y., Aysan Y., 2018. Tokat ilinde Domates bakteriyel solgunluk hastalığının (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) epidemiyolojisi. Journal of Tekirdag Agricultural Faculty, 15 (3), 9-16.

Burokiene D., 2006. Early detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seedlings. Agronomy Research, 4, 151-154.

Chang R.J., Ries S.M., Pataky J.K., 1991. Dissemination of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* by practices used to produce tomato transplants. Phytopathology, 81, 1276-1281.

Chang R.J., Ries S.M., Pataky J.K., 1992. Local sources of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in the development of bacterial canker on tomatoes. Phytopathology, 82, 553-560.

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

EPPO, 2019. European and Mediterranean Plant Protection Organization-IMI, <https://gd.eppo.int/taxon/CORBMI/distribution> (Erişim tarihi: 05.04.2019).

Fatmi M., Schaad N.W., 1988. A semiselective agar medium for isolation of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* from tomato seed. Phytopathology, 81, 1519-1523.

Gitaitis R.D., Beaver R.W., Dhanvantari B.N., 1989. Detection of *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense* in tomato transplants. (A.W. Seattler, N.W. Schaad and D.A. Roth, Eds.). The American Phytopathological Society, Minnesota, USA, 116-122.

Gitaitis R.D., Beaver R.W., Voloudakis A.E., 1991. Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in

symptomless tomato transplants. *Plant Disease*, 75 (8), 834-838.

Gleason M.L., Gitaitis R.D., Ricker M.D., 1993. Recent progress in understanding and controlling bacterial canker of tomato in Eastern North America. *Plant Disease*, 77, 1069-1076.

Nejat N., Sijam K., Abdullah S.N.A., Vadamalai G., Dickinson M., 2009. Molecular characterization of a phytoplasma associated with Coconut Yellow Decline (CYD) in Malaysia. *American Journal of Applied Sciences*, 6 (7), 1331-1340.

TÜİK, 2018. Türkiye İstatistik Kurumu. www.tuik.gov.tr/https://biruni.tuik.gov.tr/medas/?kn=92&locale=tr (Erişim tarihi: 03.09.2018)