jotaf **Journal of Tekirdag Agricultural Faculty**
Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi

Eylül/September 2019, 16(3)
Başvuru/Received: 12/02/19
Kabul/Accepted: 06/05/19
DOI: 10.33462/jotaf.526167

http://jotaf.nku.edu.tr/

ARAŞTIRMA MAKALESİ **RESEARCH ARTICLE**

Domates Bakteriyel Kanser ve Solgunluk Hastalığı Etmeni *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*' in Tohumda Aranması ve Farklı Tohum Uygulamalarının Hastalık Gelişimi Üzerine Olan Etkisinin Belirlenmesi

Detection of Tomato Bacterial Canker and Wilt Disease Agent *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on/in Tomato Seeds and Efficacy of Different Seed Treatments on Pathogen Development

Şebnem TİRENG KARUT[1] Sümer HORUZ[2] Yeşim AYSAN[3*]

Öz

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis* (*Cmm*), domateste tohum kökenli bakteriyel kanser ve solgunluk hastalığına neden olur. Bu hastalık tüm dünyada seralarda ve tarlada yetiştirilen domateslerde ciddi kayıplar oluşturmaktadır. Hastalığa karşı etkin bir mücadele yöntemi bulunmamaktadır. Bu çalışmanın amaçlarından biri ülkemizde kullanılan 41 adet ticari domates tohumlarında patojen *Cmm* varlığının fidede belirti izleme, tohum çalkalama suyundan King B ve SCM besi yerlerine ekim ile bakteri izolasyonu yapılarak türe spesifik ELISA ve BIO-PCR yöntemleriyle tespit etmektir. Diğer amacı ise, tohum kökenli inokulumu yok edebilecek veya azaltabilecek farklı tohum uygulamalarının etkisini belirlemektir. Bu amaçla, yapay olarak patojenle bulaşık domates tohumlarına K_2C kodlu bölgesel bir antagonist bakteri, Serenade, ISR 2000, sodyum hipoklorit, üzüm sirkesi, elma sirkesi, sıcak su ve laktik asit uygulanmıştır. Tohum çalkalama suyundan yapılan ELISA testlerinde bir adet tohum partisinde (tohum partisi 13) ve SCM besi yerinde gelişen bakterilerin toplanmasıyla yapılan ELISA testlerinde iki farklı tohum partisinde (tohum partisi 6 ve 13) *Cmm* bulaşıklığı saptanmıştır. Yapılan çeşitli tohum uygulamaları, tohumdaki bakteri yoğunluğunu %77-100, bulaşık tohum sayısını % 31-100 oranında azaltmıştır. Sodyum hipoklorit, üzüm sirkesi, elma sirkesi, sıcak su ve laktik asit uygulamaları başarılı tohum uygulamaları olarak saptanmıştır. Çalışma ile, konvansiyonel ve organik tarım yetiştiriciliğinde patojene karşı üzüm ve/veya elma sirkesi tohum uygulamalarının kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Domates, *Clavibacter*, tohum, mücadele, organik tarım

Abstract

Seed-borne pathogenic bacterium, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*), causes bacterial canker and wilt disease on tomato plants. Disease raises severe economic losses both on greenhouse or field grown tomatoes worldwide. No effective management strategy is available to avoid the disease. The aims of this study were (1) to detect *Cmm* on/in seeds of 41 individual seedlots using the methods seedling grow-out assay, pathogen isolation from seed washing water dilutions onto King's Medium B and SCM with the aid of *Cmm* specific ELISA and BIO-PCR, (2) to determine the efficacy of seed treatments like regional antagonistic bacterium coded K_2C,

[3]***Sorumlu Yazar/Corresponding Author:** Yeşim Aysan, Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü 01330 Adana, E-mail: aysanys@cu.edu.tr OrcID: 0000-0003-2647-5111
[1]Şebnem Tireng Karut, Biyolojik Mücadele Araştırma Enstitüsü, 01321, Adana sebnem.tirengkarut@tarimorman.gov.tr, OrcID: 0000-0002-1634-724X
[2] Sümer Horuz, Erciyes Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü 38039 Kayseri, E-mail: shoruz@erciyes.edu.tr OrcID: 0000-0002-5374-7082
Atıf/Citation: Tireng Karut Ş, Horuz S, Aysan Y. 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

©Bu çalışma Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi tarafından Creative Commons Lisansı (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) kapsamında yayınlanmıştır. Tekirdağ 2019

Serenade, ISR 2000, sodium hypochloride, grape and apple vinegars, hot water and lactic acid to reduce/eliminate pathogen inoculum from tomato seeds. *Cmm* specific ELISA could detected one contaminated seed lot (seed lot 13) from seed washing water and two contaminated seedlots (seedlot 6 and 13) from seed dilutions onto semi selective medium SCM. Seed treatments successfully reduced pathogen inoculum on/in seeds and contaminated seeds from 77 to 100% and from 31 to 100%, respectively. In this study, the seed treatments sodium hypochlorite, grape and apple vinegars, hot water and lactic acid proved to be most efficient. As a result, the study concluded that grape and apple vinegars can be used as seed treatments in conventional and organic farming systems to avoid *Cmm* contamination.

Keywords: Tomato, *Clavibacter*, seed, control, organic farming

Extended Summary

Tomato is grown and consumed as many purposes worldwide for years. Tomato bacterial canker and wilt disease caused by the bacterium *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*) is one of the most destructive tomato disease. The pathogen induces disease symptoms on all above green parts and fruits and reduces yield. Disease control is a challenge due to the absence of resistant cultivars, the pathogen is seed borne and copper applications are ineffective. The first aim of this study was to detect *Cmm* in commercial 41 individual tomato seedlots widely used in Turkey. The seedlots tested using seedling grow-out assay, pathogen isolations from seed washing water dilutions onto King's Medium B (KB) and SCM with the aid of *Cmm* specific ELISA and BIO-PCR. Two seed groups (per 150 tomato seeds) were counted from each seedlots. First group of 150 tomato seeds were sown in sterilized soil and kept under favourable conditions until the observation of wilt symptoms on seedlings. Randomly picked cotyledons were homogenized and isolations onto KB and SCM media and BIO-PCR tests conducted from the suspensions. Second group of 150 tomato seeds agitated in nutrient broth and overnight for 24 h and were centrifuged to get a pellet. A hundred fold seed dilutions made and a 100 µl suspension was spread onto King B and SCM from each dilution serial. The second aim of the study was to assign the ability of several seed treatments to reduce/eliminate pathogen from seeds. Artificially pathogen inoculated tomato seeds were treated with a regional antagonistic bacterium coded K_2C, Serenade, ISR 2000, sodium hypochlorite, apple and grape vinegars, hot water and lactic acid and the efficacy of these treatments on pathogen development and seed germinations were evaluated. The wilting symptoms on cotyledons were not induced by the bacterium and no *Cmm* detected from seedling grow out assays using the methods ELISA and BIO-PCR. *Cmm* specific ELISA could detect one contaminated seed lot (seed lot 13) from seed washing water and two contaminated seedlots (seed lot 6 and 13) from seed dilutions onto semi selective medium SCM. This result proved the high contamination of the seedlots. 1 g of tomato seeds could artificially inoculated with a population of $2.76x10^4$ cfu ml- *Cmm*. Pathogen development did not observe on tomato cotyledons treated with apple and grape vinegars, hot water and lactic acid, respectively. Seed treatments pressured *Cmm* populations ranged from 77.4 to 100%. A percentage of 92.5% tomato seeds were contaminated with the pathogen. Seed treatments successfully eliminated pathogen inoculum on contaminated seeds from 30.6 to 100%. The seed treatments grape, apple vinegars and hot water totaly eliminated the pathogen from seeds. Unlike hot water treatment reduced seed germinations up to 12.5%. Thus, this study concluded to include seed treatments of grape and apple vinegars in both conventional and organic farming systems.

Domates (*Solanum lycopersicum* Mill.) *Solanaceae* familyasından bir tür olup dünyada yaygın olarak yetiştirilmektedir (Anonim, 2018). Domates hem taze olarak sofralık, hem de işlenmiş haliyle salça, püre, konserve, ketçap yapımında kullanılmaktadır (Bayrak ve Kaya, 2009). Domates yetiştiriciliği ülkemizin her bölgesinde yaygın bir şekilde yapılmaktadır. Ülkemizde 2016 yılı üretim sezonunda 12 milyon 600 bin ton domates üretimi ile dünyada dördüncü sırada yer almıştır (FAO, 2016).

Fidelik, sera ve tarla koşullarında domates üretimini kısıtlayan en önemli faktörlerden biri bitki hastalıklarıdır. Şimdiye kadar araştırıcılar tarafından tespit edilen 200'e yakın bitki patojeni domatesi hastalandırmaktadır (Chetelat, 2014). Bakteriyel hastalık etmenleri içerisinde en önemlileri *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*), *Pseudomonas syringae pv. tomato* ve *Xanthomonas* spp. türleridir. Hastalık etmenleri bitkinin toprak üstü tüm aksamında hastalık oluşturabilirler.

Hastalığa dayanıklı domates çeşidinin olmayışı, etmenlerin tohumda uzun süre yaşayabilmesi ve bakır uygulamalarının etkisiz olmasından dolayı domateste bakteriyel hastalıklarla mücadele oldukça zordur. Primer enfeksiyonların önlenmesinde tohum bulaşıklılığının giderilmesi oldukça önemlidir. Hastalıklarla mücadelede Bronopol, Thiram, Sodyum hipoklorit, Hidroklorik asit ve Bakır asetat gibi çeşitli kimyasallar, dayanıklılığın teşvik edilmesi, bitkisel esaslı ekstrakt ve uçucu yağlar, çeşitli antibiyotikler ve sıcak su gibi fiziksel uygulamalar tohumdaki inokulumu yok etmek veya azaltmak için kullanılan çok farklı yöntemlerdir (Fatmi ve ark., 1991; Özaktan, 1991; Soylu ve ark., 2003; Mengüllüoğlu ve Soylu, 2012; Horuz ve ark., 2018) .

Domates üretiminde hastalıksız tohumla işe başlamak gerekir. Ancak bakteriyel etmenlerin tohumda hastalık belirtisi oluşturmadan latent olarak bulunabilmesi, tohumdaki düşük inokulum miktarının saptanmasında kullanılabilecek hassas yöntemlerin olmayışı, tohum mikroflorasının patojen gelişimi üzerine etkisi ve patojenlerin tohum içerisine özellikle embriyoya yerleşebilme özelliklerinden dolayı tohumların sağlıklı testlenmesi oldukça zorlaşmaktadır. Tohumlarda bulunan hastalık etmenlerinin saptanması ve tanılanması konusunda Uluslararası Tohum Testleme Birliği (ISTA) çeşitli yöntemler geliştirmekte ve sonuçları tohum testleyen birimlerle ve araştırıcılarla paylaşmaktadır. Laboratuvarlar ISTA'nın belirlediği yöntemleri kullanmakta ve yeni yöntemler geliştirmeye devam etmektedir.

Bu çalışma iki aşamadan oluşmuştur. Çalışmanın ilk kısmında, 2012-2015 yılları arasında ülkemizde kullanılan ticari domates tohumlarında tohum kökenli bakteriyel hastalık etmeni *Cmm*'in varlığının tespit edilmesi araştırılmıştır. Bu aşamada, fidede belirti izleme, tohum çalkalama suyundan genel ve seçici besi yerlerine ekim, türe spesifik ELISA ve türe spesifik BIO-PCR tanılama yöntemleri kullanılmıştır. Çalışmanın ikinci kısmında *Cmm*'in domates tohumlarından uzaklaştırılması veya azaltılmasında fidelik/sera gibi alanlarda kullanılabilecek çeşitli tohum uygulamalarının etkisini ortaya koymak amaçlanmıştır. Bu amaçla suni olarak patojenle bulaştırılmış tohumlara; ticari biyopreparat, Serenade, yöresel bir antagonistik bakteri, ticari bitki aktivatörü, ISR 2000, sodyum hipoklorit, üzüm sirkesi, elma sirkesi, laktik asit ve sıcak su uygulamaları yapılarak çeşitli uygulamaların patojen gelişimi üzerine ve tohumun çimlenme gücüne etkileri araştırılmıştır.

Materyal ve Yöntem

Patojen İzolat ve Besi Yerleri: Çalışmada CMM 3/1A kodlu *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* izolatı kullanılmıştır (Aysan ve Çetinkaya Yıldız, 2006). Rifampisine dayanıklı *Cmm* elde edilmesinde Nutrient Broth (NB), petride geliştirilmesinde King B (King ve ark., 1954) ve tohumdan bakteri aranmasında yarı seçici SCM (Fatmi ve Schaad, 1988) besi yerleri kullanılmıştır.

Çalışmada Kullanılan Kimyasallar: Patojenin antibiyotiğe dayanıklılık kazandırılmasında Rifampisin (Sigma, K10514807912) antibiyotiği, tohum denemelerinde %98'lik laktik asit (Sigma, 088K1230), %5'lik Sodyum hipoklorit (NaOCl), üzüm ve elma sirkeleri çalışmada kullanılmıştır.

Antagonist Bakteri ve biyolojik preparatlar: K_2C kodlu antagonist bakteri izolatı (Çetinkaya-Yıldız, 2007), ISR-2000 ve Serenade kullanılmıştır.

Testlenen Domates Tohumları ve Çeşitler: Çalışmada farklı ticari firmalardan temin edilen 41 farklı hibrit domates çeşitlerine ait tohumlar *Cmm* varlığı/yokluğu yönünden incelenmiştir. Tohum partilerinin ticari çeşitler olması nedeniyle bunlara kod verilmiş ve yayında kod isimleri kullanılmıştır.

ELISA Tanı Kiti: Agdia marka (Agdia Inc., Belkart, USA) BRA 44001 Reagent Set kodlu *Cmm*'e spesifik monoklonal antiserum içeren Antigen coated plate (ACP) ELISA ticari tanı kiti kullanılmıştır.

PCR Çalışmaları: Çalışmada etmene spesifik CMM5 (5'- GCG AAT AAG CCC ATA TCA A -3') ve CMM6 (5'- CGT CAG GAG GTC GCT AAT A -3') primerleri kullanılarak PCR gerçekleştirilmiştir.

Fidede Belirti İzleme Testi:

41 farklı tohuma ait her bir domates tohum partisinden (1.000-5.000 adet tohum) iki adet 150 şer adet tohum sayılmıştır. Her tohum partisine ait 150 adet tohum steril torf içeren 42x28x17 cm (boy, en, yükseklik) boyutundaki plastik kaplara ekilmiş, 28 ºC ve % 85 neme sahip iklim odasında muhafaza edilmişlerdir. Gelişen fidelerde solgunluk belirtisi gösteren bitkilerin sayısı not edilmiştir. Gelişen fidelerden rastgele seçilen kotiledon yapraklar steril havanda homojenize edilmiştir. Oluşan süspansiyondan King B ve SCM besi yerlerine izolasyon, kotiledon yapraklardan BIO-PCR yapılmıştır.

Tohum Örneklerinden *Cmm*'in İzolasyonu:

Her bir tohum partisinden fidede belirti izleme testi için gerekli tohumlar ayrıldıktan sonra geriye kalan tohumlar tartılmış ve not edilmiştir. Tohumlar steril havanda dövülerek tohumda yara açılması sağlanmıştır. Ardından tohumlar içerisinde ağırlıklarının 10 katı kadar NB sıvı besi yeri içeren erlenlere aktarılmıştır. Tohumlar 24 saat süreyle 25 °C de 250 rpm hızda çalkalayıcıda çalkalanmıştır. Her bir tohum partisine ait tohum ekstraktı steril tülbentten süzülerek tohum parçaları uzaklaştırılmış ve 50 ml lik tüplere aktarılmıştır. Ekstrakt 15.000 rpm hızda 10 dakika santrifüj edilmiş ve oluşan pellet alınmıştır. Pellet bulunan 50 ml'lik tüplere 4 ml NB eklenerek tüp çalkalayıcısında çalkalanmıştır.

Elde Edilen Yıkama Suyundan *Cmm*'in İzolasyonu:

İçerisinde nutrient broth bulunan ekstraktan 1 ml alınmış ve steril fizyolojik su (% 0.85 NaCI çözeltisi) içerisinde 1/10, 1/100 ve 1/1000 oranında üç kez seyreltilmiştir. Her bir seyreltmeden King B ve SCM besi yerlerine yayma işlemi gerçekleştirilmiştir. SCM besi yerinde gri renkte ortası siyah noktalı koloni gelişimleri incelenmiş ve şüpheli olan kolonilerden saflaştırmalar gerçekleştirilmiştir.

Tohumda *Cmm* Varlığının ELISA Testi ile Tespiti:

Petriye ekim sonrası geriye kalan tohum çalkalama suyu, kotiledon yapraklardan elde edilen süspansiyon ve petriye yayma sonucu gelişen bakterilerin toplanması sonucu elde edilen karışım *Cmm* varlığı/yokluğu yönünden testlenmiştir. Yöntem olarak ticari firmanın önerdiği protokol izlenmiştir. Her örnek iki tekrarlı ve her tekrar 200 µl olarak ELISA pleyt'inde belirtilen çukurlara yüklenmiştir. Örnekler ELISA pleyt okuyucusunda (Medispec, ESR 200) 405 nm absorbans değerinde okunmuştur. Negatif kontrolün iki katı ya da daha yüksek değerler pozitif olarak yorumlanmıştır.

PCR Testi ile Tohumda *Cmm*'in Tespiti:

Tohum çalkalama suyu, kotiledon yapraklardan elde edilen süspansiyon ve petriye yayma sonucu gelişen bakterilerin toplanmasıyla elde edilen karışım *Cmm* varlığı/yokluğu yönünden BIO-PCR ve türe spesifik PCR testiyle incelenmiştir. Her bir süspansiyondan 1 ml alınarak genomik DNA Nejat ve ark. (2009)'un bildirdiği yöntem modifiye edilerek izole edilmiştir. PCR işlemlerinde Dreier ve ark. (1995)'in bildirdiği PCR programı kullanılmıştır. Buna göre 95 ºC'de 3 dakika ısınma, 94 ºC'de 30 saniye ilk denatürasyon, 55 ºC'de 30 saniye primerlerin bağlanması, 72 ºC'de 1 dakika yeni DNA fragmentlerinin uzaması bir döngü olacak şekilde bu aşama 30 döngüye tamamlanmıştır. 72 ºC'de 10 dakika son uzama ile program tamamlanmıştır. Elde edilen PCR ürünleri % 1.5 oranında hazırlanan agaroz jelde 614 bp büyüklüğünde bant varlığı/yokluğu yönünden incelenmiştir.

Domates Tohumlarına Patojen İnokulasyonu ve Tohum Uygulamaları:

Çalışmanın ikinci aşamasında, 25 g domates tohumu (cv. H-2274) 100 mg/l rifampisin antibiyotiğine dayanıklılık kazandırılmış *Cmm* ($1.1x10^8$ hücre/ml) süspansiyonuna daldırılmış ve 30 dakika vakumlama işlemi sonrası bir gün süreyle patojen süspansiyonu içinde bekletilip etmenle bulaştırılmıştır (Özaktan, 1991). Ardından tohumlar kurutma kağıtları üzerine alınıp iyice kurumaya bırakılmıştır. Tohumlar +4 °C'de tekrar kullanılıncaya kadar bekletilmiştir.

Tohum uygulamalarında her bir uygulama için hazırlanan, patojenle bulaştırılmış 1 gram ve ayrıca 100 adet domates tohumu % 0.25'lik NaOCl, % 30'luk laktik asit çözeltisine, % 10'luk üzüm ve elma sirkesine, K_2C kodlu antagonist bakteri süspansiyonuna (10^9 hücre/ml), Serenade (15 ml/l dozunda) ve ISR 2000 (1 ml/l dozunda) içerisine ayrı ayrı konulup 30 dakika 150 rpm hızdaki çalkalayıcıda 25 °C de çalkalanmak suretiyle tohuma farklı uygulamalar yapılmıştır. Ayrıca aynı miktarda domates tohumu 55 °C sıcak suda 25 dakika bekletilerek fiziksel tohum uygulaması da yapılmıştır. Uygulama yapılmış tohumlar 25 °C de filtre kağıdı üzerinde bir gün bekletilerek kurumaya bırakılmıştır.

Farklı Tohum Uygulamalarının Tohumdaki Bakteri Popülasyonuna Etkisi:

Uygulama görmüş ve görmemiş domates tohumlarındaki bakteri sayısını karşılaştırmak için 9 ml steril fizyolojik su içerisine bandırılan 1 g hastalıklı tohum, 150 rpm hızdaki çalkalayıcıda 30 dakika süreyle çalkalanmıştır. Elde edilen süspansiyon üç kez seyreltilmiş ve her bir seyreltmeden 100 mg/l rifampisin bulunan King B besi yerine yayılmıştır. İnkübasyondan 4-6 gün sonra petrilerde gelişen koloni sayıları belirlenmiştir. Sadece patojenle bulaştırılan tohumlar pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Ayrıca, her uygulamada besi yerinde gelişen, *Cmm* olabileceği düşünülen toplam 39 adet bakteri kolonisi saflaştırılmış, gram reaksiyonu ile gram pozitif oldukları tespit edilmiş, patojen olup olmadıkları Akşamsefası bitkisinde oluşturdukları aşırı duyarlılık reaksiyonlarına göre belirlenmiştir.

Farklı Tohum Uygulamalarının Bulaşık Tohum Oranına Etkisi

Farklı tohum uygulamalarına maruz bırakılan 100'er adet hastalıklı tohum 100 mg/l rifampisin içeren besi yerine 10'ar adet olmak üzere yerleştirilmiştir. Petrilerin 25 ºC'de 7-10 gün inkübasyonundan sonra çevresinde sarı renkli bakteri gelişen tohum sayıları kaydedilerek bulaşık tohum yüzdesi hesaplanmıştır. Sadece patojenle bulaştırılan tohumlar pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Böylece uygulama görmüş tohumlardaki bulaşık tohum %'si saptanmıştır.

Farklı Tohum Uygulamalarının Tohum Çimlenme Gücüne Etkisi

Patojen ile bulaşık olmayan sağlıklı 100'er adet domates tohumuna farklı tohum uygulamaları yapılarak uygulamaların tohumun çimlenme gücüne etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla, içerisinde torf bulunan küvetlere 100'er adet domates tohumu ekilmiştir. Deneme üç tekrarlı kurulmuştur. Kontrol olarak hiçbir tohum uygulaması yapılmamış sağlıklı tohum kullanılmıştır. Denemeler 25±2 ºC sıcaklıkta, % 70 nem, 16/8 saat aydınlık/karanlık koşullara sahip iklim odasında yürütülmüştür. Deneme günlük takip edilmiş ve çimlenen tohum sayıları not alınarak uygulama görmüş tohumlardaki çimlenme %'si hesaplanmıştır.

Denemelerin Değerlendirilmesi ve İstatistiki Analiz

Farklı uygulamaların tohumdaki bulaşıklık düzeyine ve çimlenmeye etkisi hesaplanırken Abbott formülünden yararlanılmıştır. Uygulamalar arasındaki istatistiki farklar MSTAT istatistik programında Duncan çoklu karşılaştırma testiyle ($P \leq 0.05$) yapılmıştır. Aynı istatistiki grupta yer alan uygulamalar aynı harfle işaretlenmiş ve sonuçlar yorumlanmıştır.

Bulgular ve Tartışma

Tohum partilerinde patojen *Cmm* Aranması

Çalışma ile toplamda 41 adet farklı domates tohumu *Cmm* varlığı/yokluğu yönünden testlenmiştir. Fidede belirti izleme testinde fidelerden King B ve SCM besi yerlerine yapılan izolasyonlarda King B besi yerinde sarı renkte, SCM besi yerinde de gri renkte herhangi bir koloni gelişimi olmamıştır. Bu nedenle, fidelerde gözlenen lekelerin *Cmm* kaynaklı olmadığı saptanmıştır. Ayrıca lekeli ve lekesiz fidelerden gerçekleştirilen ELISA ve BIO-PCR testlerinde de *Cmm* varlığına rastlanılmamıştır.

Tohum çalkalama suyundan yapılan ELISA testlerinde bir adet tohum partisinde (tohum partisi 13) ve SCM besi yerinde gelişen bakterilerin toplanmasıyla yapılan ELISA testlerinde iki adet tohum partisinde (6 ve 13 numaralı tohum partileri) *Cmm* bulaşıklılığı saptanmıştır (Çizelge 1).

Çizelge 1. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm)'e Spesifik Antiserumla Yapılan ELISA Testi Sonuçları

Table 1. ELISA test results of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

Çeşit	ELISA Okuma Değerleri (405 nm)	Sonuç
Negatif Kontrol	0,54	-
Pozitif Kontrol (*Cmm*)	**3,31**	+
tohum çalkalama suyu		
Tohum partisi 1	0,62	-
Tohum partisi 2	0,63	-
Tohum partisi 3	0,63	-
Tohum partisi 4	0,66	-
Tohum partisi 5	0,68	-
Tohum partisi 6	0,68	-
Tohum partisi 7	0,63	-
Tohum partisi 8	0,63	-
Tohum partisi 9	0,49	-
Tohum partisi 10	0,51	-
Tohum partisi 11	0,63	-
Tohum partisi 12	0,65	-
Tohum partisi 13	**1,25**	+
	SCM Besi yerinde Gelişen Bakterilerden Yıkama	
Tohum partisi 1	0,83	-
Tohum partisi 2	0,65	-
Tohum partisi 3	0,71	-
Tohum partisi 4	0,68	-
Tohum partisi 5	0,83	-
Tohum partisi 6	**2,90**	+
Tohum partisi 7	0,76	-
Tohum partisi 8	0,68	-
Tohum partisi 9	0,83	-
Tohum partisi 10	0,64	-
Tohum partisi 11	0,49	-
Tohum partisi 12	0,68	-
Tohum partisi 13	**1,22**	+

ELISA testi, ölü bakteri hücrelerini de tanıyabildiğinden tohum örneklerinin testlenmesinde çok fazla tercih edilmez. Ancak yarı seçici besi yerinde yoğun olarak gelişen bakteri süspansiyonundan yapılan ELISA testinde de pozitif sonuçların alınması tohum partisi 13 ve tohum partisi 6 adıyla testlenen tohum lotlarında canlı *Cmm* populasyonunun bulunduğunun kanıtıdır.

Farklı Tohum Uygulamalarının Tohumdaki Bakteri Popülasyonuna Etkisi

Patojen ile bulaştırılmış 1 g tohumdaki patojen bakteri sayısı $2.76x10^4$ bakteri hücresi olarak belirlenmiştir. Patojen ile yapay bulaştırılmış domates tohumlarına yapılan üzüm ve elma sirkesi, sıcak su ve laktik asit uygulamalarının hiçbirinde bakteri gelişimi gerçekleşmemiştir. Yapılan tohum uygulamaları tohumdaki patojen popülasyonunu % 77.4-100 oranlarında baskılamıştır (Çizelge 2).

Çizelge 2. Farklı Tohum Uygulamalarının Tohumdaki Bakteri Popülasyonuna Etkisi

Table 2. Efficacy of several seed treatments on pathogen population

Uygulamalar	Bakteri Koloni sayısı (cfu/ml)	% Etki
Pozitif Kontrol	275.7 [a*]	
Antagonist (K_2C)	62.3 [b]	77.4
Serenade	39.0 [c]	85.9
ISR 2000	30.3 [c]	89.0
Sodyum hipoklorit	0.3 [d]	99.9
Üzüm sirkesi	0.0 [d]	100.0
Elma sirkesi	0.0 [d]	100.0
Sıcak su	0.0 [d]	100.0
Laktik asit	0.0 [d]	100.0

*Aynı sütunda aynı harfe sahip ortalamalar arasında Duncan çoklu karşılaştırma testine göre ($P \leq 0.05$) istatistiksel olarak fark yoktur.

Üzüm sirkesi, elma sirkesi, sıcak su, laktik asit ve sodyum hipoklorit uygulamaları sonucunda elde edilen ortalama bakteri yoğunluğu aynı grup içerisinde yer almış ve dolayısıyla istatistiksel olarak aralarında fark gözlenmemiştir. Serenade ve ISR 2000 uygulamaları sonucunda ortalama bakteri yoğunluğu 39.0 ve 30.3 olarak belirlenmiş ve bu uygulamalar istatistiki olarak aynı grup içerisinde yer almışlardır. Antagonist bakteri (K_2C) uygulamasında ortalama bakteri sayısı 62.3 olarak belirlenmiş ve bu sonuç diğer tüm uygulamalardan istatistiksel olarak farklı bulunmuştur.

Farklı Tohum Uygulamalarının Bulaşık Tohum Oranına Etkisi

Suni olarak patojenle bulaştırılan tohumların % 92.50'sinin *Cmm* ile bulaşık olduğu saptanmıştır. Farklı tohum uygulamaları bulaşık domates tohumlarındaki *Cmm*'i % 30.6-100 oranında engellemiştir. Sıcak su, üzüm ve elma sirkesi uygulamaları patojeni tohumdan tamamen yok ederek en yüksek başarıyı göstermiştir. Sodyum hipoklorit ve laktik asit de % 95.7 ve % 96.8'lik etkiyle bir diğer etkili uygulamalar arasında yer almışlardır. Tüm uygulamalar istatistiksel olarak pozitif kontrolden farklı harf almış ve başarılı uygulamalar olmuştur (Çizelge 3).

Çizelge 3. Farklı Tohum Uygulamalarının Bulaşık Tohum Oranına Etkisi

Table 3. Efficacy of several seed treatments on contaminated seed

Uygulamalar	Toplam Tohum Sayısı	Bulaşık Tohum Sayısı
Pozitif Kontrol	93	86
Antagonist bakteri (K_2C)	92	59
Serenade	99	19
ISR 2000	97	15
Sodyum hipoklorit	100	4
Laktik Asit	100	3
Üzüm Sirkesi	100	0

Elma Sirkesi	100	0
Sıcak Su	100	0

*Aynı sütunda aynı harfe sahip ortalamalar arasında Duncan çoklu karşılaştırma testine göre ($P \leq 0.05$) istatistiksel olarak fark yoktur.

Farklı Tohum Uygulamalarının Tohum Çimlenme Gücüne Etkisi

Yapılan çalışmada en yüksek çimlenen tohum sayısı ortalama 88.0 adet ile hiçbir uygulama yapılmayan negatif kontrolde elde edilmiş, bunu 86.7, 86.3, 86.0, 85.3, 84.7, 83.3, 83.0 ve 77.0 ortalama ile sırasıyla antagonist bakteri (K_2C), sodyum hipoklorit, ISR 2000, pozitif kontrol, laktik asit, elma sirkesi, üzüm sirkesi ve sıcak su uygulamaları izlemiştir. Sıcak su uygulaması tohumların çimlenme gücünü %12.5 ile en yüksek oranda azaltmıştır. Serenade uygulamasında tohum çimlenme yeteneği %7.2, üzüm sirkesi ve elma sirkesi %5.7 ve %5.3, laktik asitte %3.8, pozitif kontrolde ise %3 oranında azalmıştır (Çizelge 4).

Çizelge 4. Farklı Uygulamaların Domates Tohumlarının Çimlenme Gücüne Etkisi

Table 4. Efficacy of several seed treatments on seedling germination

Uygulamalar	Çimlenen tohum sayısı	% Etki
Negatif Kontrol	88.0	
Pozitif Kontrol	85.3	-3.0
Antagonist bakteri (K_2C)	86.7	-1.5
Serenade	81.7	-7.2
ISR 2000	86.0	-2.3
Sodyum hipoklorit	86.3	-1.9
Üzüm Sirkesi	83.0	-5.7
Elma Sirkesi	83.3	-5.3
Sıcak Su	77.0	-12.5
Laktik Asit	84.7	-3.8

Sonuç

Bu çalışmada her bir tohum partisinden 1.000-5.000 adet tohum patojen varlığı yönünden incelenmiştir. Patojenin tohumda bulunduğu yer patojenin saptanması açısından önemlidir. Bakteriyel etmen hem tohum kabuğuna hem de embriyoya yerleşebilmektedir (Gleason ve ark., 2014). Bu nedenle çalışmada testlenen tohumlarda yara açılarak tohum çalkalama suyu ve besi yerinde patojenin gelişmesi gerçekleşmiş, böylece embriyoya yerleşen patojenin de saptanabilmesi sağlanmıştır.

Serolojik bir yöntem olan ELISA testinde düşük popülasyondaki patojen saptanamamaktadır. Kullanılan ticari kit 10^4 hücre/ml yoğunluğundaki bakteri popülasyonunu saptayacak duyarlılıktadır. Tohum çalkalama suyu ve yarı seçici besi yerine ekim sonrası gelişen bakterilerden yapılan ELISA testlerinde iki örneğin *Cmm* ile bulaşık olması testlenen iki tohum partisinin yüksek oranda bakteri popülasyonuyla bulaşık olduğunun da bir göstergesidir. Ancak bu çalışmada tohumda düşük popülasyonlarda latent olarak bulunan bakteri ELISA testiyle saptanamamıştır.

Bir patojenin konukçu bitkide hastalık oluşturabilmesi için kritik inokulum yoğunluğunun üzerinde bulunması gerekir. Bunun yanında konukçu bitkinin duyarlı ve çevre koşullarının (sıcaklık ve nem) patojenin gelişimi için uygun olması şarttır. Chang ve ark. (1992) C*mm*'in 10^2-10^5 hücre/g tohum popülasyonuyla bulaşık tohumlarda, optimum koşullarda altı hafta sonra sistemik enfeksiyon sonucu bitkilerde solgunluk gözlemlemişken, Tokgönül (1998) ise sekiz hafta sonra hastalık belirtilerini gözlemlemiştir. Bizim çalışmamızda bulaşık tohumdaki patojen

popülasyonu $2.76x10^4$ hücre/g tohum olarak saptanmış ve sekiz hafta sonra patojenle bulaştırılan tohumlarda herhangi bir hastalık belirtisi tespit edilmemiştir. Çalışmada kullandığımız H-2274 çeşidi domates tohumlarının bu etmene duyarlı olduğu göz önüne alındığında hastalık gelişimi için uygun çevresel faktörlerin iklim odasında yeterince sağlanamadığı ve patojenin latent kaldığı görüşü oluşmuştur.

Tohumların çimlenme yetenekleri de dikkate alındığında, sıcak su uygulamasında tohumların çimlenmesi %12.5 oranında azalmıştır. Aynı şekilde Fatmi ve ark. (1991) ve Tokgönül (1998) sıcak su uygulamasının *Cmm*'i tohumdan yok edebildiğini, ancak çimlenmeyi önemli oranda azalttığını bildirmişlerdir. Özaktan (1991) farklı olarak 56 ^oC sıcaklıkta 30 dakika sıcak suda bekletilen tohumların çimlenme gücünde sadece %4 oranında bir azalma tespit etmiştir. Domateste yapılan bir başka çalışmada Horuz ve ark. (2018) bakteriyel benek hastalığı etmeni *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Pst)'nun tohumdan eliminasyonunda 50 ^oC sıcaklıkta 30 dakika sıcak su uygulamalarının patojen gelişimini tamamen yok ettiğini ve tohumların çimlenme yeteneğinde ve bitki gelişiminde hiçbir olumsuz etkisi olmadığını bildirmiştir. Bu farklılık kullanılan tohum çeşidiyle alakalı olabilmektedir (Tokgönül, 1998). Ayrıca bu çalışmada sıcak suda bekletilen tohumlar çimlense de fide gelişmelerinin daha zayıf ve cılız olduğu gözlenmiştir. Bu durum göstermiştir ki farklı tohum uygulamaları tohum çeşitlerinin çimlenmesi üzerinde farklı etkiye sahip olabilir. Fatmi ve ark. (1991)'in bildirdiği gibi tohum uygulamaları, ön çimlendirme testleri yapıldıktan sonra tüm tohum partisine uygulanmalıdır.

Cmm'in domates tohumlarından arındırılmasında kullanılabilecek tohum uygulamaları bu çalışmada araştırılmıştır. Laktik asit, sıcak su, Sodyum hipoklorit, üzüm ve elma sirkesi uygulamaları tohumdaki bakteri yoğunluğunu yok etmede başarılı olmuştur. Uygulama görmüş tohumlar besi yerine ekildiğinde de yine bu uygulamalar en başarılı olarak bulunmuş, her iki çalışmanın sonuçları birbirini desteklemiştir. Benzer şekilde Horuz ve ark. (2018) sodyum hipoklorit uygulanmış domates tohumlarında % 90-95 oranında *Pst* popülasyonunun azaldığını ve çimlenmede olumsuz etkileri olmadığını saptamıştır. Bitki sağlığı dışında çeşitli organik asitler insan sağlığında tohumlarla bulaşabilen bakterilerin tohumdan uzaklaştırılmasında da kullanılmıştır. Lang ve ark. (2000) yonca tohumlarına bulaşan *Esherichia coli* popülasyonunu laktik ve asetik asit uygulamalarıyla başarılı bir şekilde yok etmiş ve tohumların çimlenmesinin iyi olduğunu bildirmişlerdir. Benzer şekilde Nei ve ark. (2013) maş fasulyesi tohumlarındaki gıda kaynaklı bulaşan *Esherichia coli* ve *Salmonella* bakterilerinin yoğunluğunu sıcak su uygulamasının ardından klorin uygulamasıyla tamamen yok etmiştir. Yapılan bu çalışmalar bizim çalışmamızla benzer sonuçlar ortaya koymuştur. Çeşitli uygulamalar tohuma bulaşan insan ya da bitki patojeni bakterilerin mücadelesinde etkili olarak kullanılabilmektedir. Çok düşük orandaki bakteri bulaşıklılığı bile tohum partilerinin bulaşmasına kaynak oluşturacağından uygulamaların tamamen etkili olması istenir. Bu nedenle bu çalışmada sodyum hipoklorit ve laktik asidin tohuma uygulanmaları başarılı olarak bulunmuş ve konvansiyonel tarımda bu iki uygulama *Cmm*'in tohumdan eliminasyonunda önerilmişken, organik tarım için önerilmemiştir.

Yapılan çalışmada üzüm sirkesi ve elma sirkesi uygulamalarının tohum uygulaması olarak hem konvansiyonel hem de organik tarımda öncelikle kullanılabileceği sonucuna varılmıştır. Ayrıca tohumlara yapılacak priming uygulamalarında sirkeden faydalanılabileceği açıktır. Ekim öncesinde tohum canlılığı ve gücünü arttırmaya yönelik tohumların bir çözeltide bekletilmesi esasına dayanan priming yönteminde çeşitli asitlerden faydalanılmaktadır (Sivritepe, 1999). Ancak üzüm veya elma sirkesi içerisinde 12 saat gibi bir süre bekletilecek

olan tohumlarda priming gerçekleşip kolayca çimlenebilme yeteneği olacağından tohumların o yıl içerisinde kullanılması uygun olacaktır.

Kaynakça

Anonim, 2018. Domatesin Türkiye ve dünyadaki durumu, BATEM. http://www. batem.gov.tr/urunler/sebzelerimiz/domates/domates.htm, erişim tarihi 2.12.2018.

Aysan, Y., Sahin, F., Çetinkaya-Yıldız, R., Mirik, M. and Yucel, Y., 2004. Occurence and primer inoculum sources of bacterial stem rot caused by *Erwinia* species on tomato in the Eastern Mediterranean region of Turkey. Journal of Plant Diseases and Protection, 112:42-51.

Aysan, Y., ve Çetinkaya-Yıldız, R., 2006. Domates bakteriyel solgunluk hastalığına karşı bitki büyüme düzenleyici rizobakterilerle dayanıklılığın teşviki, TOVAG–105 O 465 no'lu Proje Sonuç Raporu, 34 sayfa.

Chang, R. J., Ries, S. M., and Pataky, J. K., 1992. Local sources of *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* in the development of Bacterial Canker on Tomatoes. Phytopathology, 82:553-560.

Chetelat R.T. 2014. Tomato diseases, pests and disorders. In: Jones, J.B, Zitter, T.A., Momol, T.M. and Miller, S. (Eds.) Compendium of tomato diseases and pests. 2nd edition. APS Press. St. Paul, Minnesota, 55121, USA, 1-5.

Çetinkaya-Yıldız, R., 2007. Domates Bakteriyel solgunluk hastalığı etmeni [*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis Et. Al.]'nin tanılanması ve bitki büyüme düzenleyici rizobakteriler ile biyolojik mücadele olanaklarının araştırılması. Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Adana, 173s.

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

FAO, 2016. FAOSTAT Agriculture. http://faostat.fao.org/site/567/-DesktopDefault. aspx?PageID=567#ancor, Erişim tarihi 02.12.2018.

Fatmi, M. Schaad, N. W. 1988. Semiselective agar medium for isolation of *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense* from tomato seed. Phytopathology, 78:121-126.

Fatmi, M., Schaad, N. W., and Bolkan, H. A., 1991. Seed treatments for eradicating *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* from naturally infected tomato seeds. Plant Disease, 75:383-385.

Gleason, M.L. Gitaitis R.D. Miller, S.A. 2014. Bacterial canker. In: Jones, J.B, Zitter, T.A., Momol, T.M. and Miller, S. (Eds.) Compendium of tomato diseases and pests. 2nd edition. APS Press. St. Paul, Minnesota, 55121, USA, 50-53.

Horuz S. Sari A. and Aysan Y. 2018. Efficacy of hot water and chemical seed treatments on bacterial speck of tomato in Turkey. Fresenius Enviromental Bulletin, 27(5): 3185-3190.

King, E.O. M.K. Ward, and D.E. Raney, 1954. Two simple media for the demonstration of pyocianin and floresin. J.Lab. Clin. Med. 44:301-307.

Lang, M.M., Ingham, B.H. and Ingham, S.C. 2000. Efficacy of novel organic acid and hypochlorite treatments for eliminating Escherichia coli O157:H7 from alfalfa seeds prior to sprouting. International Journal of Food Microbiology 58 : 73–82.

Mengulluoglu, M., and Soylu, S. 2012. Antibacterial activities of essential oils from several medicinal plants against the seed-borne bacterial disease agent *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. Research on Crops, 13: 641-646.

Nei, D., Bari, M.L. and Enomoto, K. 2013. Validation of hot water and chlorine treatments to inactivate pathogens inoculated on mung bean seeds: Influence of the seed production area. Food Control 32: 186-189.

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

Özaktan, H, 1991. Domates bakteriyel solgunluğu (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) ile savaşım olanakları üzerine araştırmalar. Ege Üniversitesi Doktora Tezi, Bornova-İzmir, 98s.

Soylu, S., Baysal, Ö. and Soylu, E.M. 2003. Induction of disease resistance by the plant activator, acibenzolar-s-methyl (ASM), against bacterial canker (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) in tomato seedlings. Plant Science 165: 1069-1075.

Sivritepe, H.Ö. 1999. Sebze tohumlarında kalite ve performansın arttırılması üzerine ozmotik koşullandırmanın etkileri. Türkiye 3. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi, 14-17 Eylül 1999, Ankara, s. 525-529.

Tokgönül, S., 1998. Ticari domates tohumlarında bakteriyel solgunluk etmeni (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*)'nin saptanması ve etmene karşı mücadele olanakları üzerine araştırmalar. Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Adana, 93s