

Kabakgil Tohumlarında Karpuz Bakteriyel Fide Yanıklığı ve Meyve Lekesi Hastalığı Etmeni *Acidovorax citrulli*'nin Varlığının Belirlenmesinde Kullanılabilecek Uygun Yöntem(ler)in Saptanması

Sümer Horuz*¹

Yeşim Aysan²

¹Erciyes Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, 38039-KAYSERİ, sumer_536@yahoo.com

²Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, 01330-ADANA, aysanys@cu.edu.tr

*Sorumlu yazar email: sumer_536@yahoo.com

Geliş Tarihi (Received): 16.02.2018

Kabul Tarihi (Accepted): 12.03.2018

Karpuz bakteriyel fide yanıklığı ve meyve lekeli hastalığı etmeni *Acidovorax citrulli* (Ac) tohumla taşınan bir bakteriyel etmendir. Bakteri tohum kabuğunda ve embriyosunda uzun yıllar yaşamını sürdürür. Bu çalışma, tohum kökenli hastalık etmeni Ac'nin tohumda varlığının belirlenmesinde kullanılabilecek en uygun, hızlı ve güvenilir yöntem(ler)in belirlenmesi amacıyla yapılmıştır. Bu amaçla kabakgil tohumları parçalayıcıda parçalanarak homojenize edilmiş, daha sonra sıvı besi yerinde 24 saat orbital çalkalayıcı içinde çalkalanmıştır. Tohumda etmenin aranmasında fidede belirti izleme, tohum çalkalama suyundan genel bir besi yeri olan King B, yarı seçici besi yerleri P-278 ve mEBB'ye ekim ile bakteri izolasyonu yapılmış, tanılama çalışmalarında türe spesifik ELISA ve türe spesifik BIO-PCR yöntemleri kullanılmıştır. Çalışma sonucunda, tohumdan gelişen fidede kotiledon yapraklarda su emmiş alanlar olduğu gözlenmiştir. Ancak tohum çalkalama suyunun genel besi yerine ekimi ile yapılan DAS-ELISA ve PCR testi sonuç vermemiştir. Yarı seçici besi yerlerine ekim ve gelişen bakterilerin toplanarak etmene spesifik PCR testleriyle patojenin varlığı başarılı bir şekilde belirlenmiştir. Geliştirilen bu yöntemle karpuz, karpuz anacı, kavun ve hıyar tohumlarını içeren 22 farklı kabakgil tohum örneği Ac varlığı yönünden incelenmiş ve dört örneğinin (bir hıyar, bir kavun ve iki karpuz) patojenle bulaşık olduğu saptanmıştır. Çalışma sonucunda belirlenen bu BIO-PCR yöntemine göre, kabakgil tohumları fide haline getirilmeden uygun ve hızlı bir şekilde bu patojenin varlığı yönünden incelenebilir.

Anahtar Kelimeler: BIO-PCR, ELISA, karpuz, tohum, patojen

Determination of Appropriate Method(s) to Detect Watermelon Seedling Blight And Fruit Blotch Disease Agent *Acidovorax citrulli* in Cucurbit Seeds

Watermelon seedling blight and fruit blotch caused by *Acidovorax citrulli* (Ac) is a seed-borne bacterial disease. The bacterium survives in/on seeds for years. The aim of this study was to determine the most favourable, reliable and fast method for detection Ac from cucurbit seeds. Cucurbit seeds were homogenised using a blender and left in orbital shaker for 24 h in a nutrient broth. The methods seedling grow out, pathogen isolation from seed washing water dilutions onto semi selective media P-278 and mEBB and general medium King B, DAS-ELISA and BIO-PCR were used for detection. Water-soaked lesions observed on cotyledons. Since DAS-ELISA and PCR tests with seed dilutions onto King B has failed to detect Ac from seed lots, Ac specific PCR with dilutions from semi selective media has successfully detect the pathogen. As a result of this study, four (one cucumber, one melon and two watermelon seed lots) out of twenty two tested cucurbit seeds were contaminated with Ac. This study recommended that this BIO-PCR is safe, reliable and fast for detection Ac from cucurbit seeds without any seedling growth.

Key words: BIO-PCR, ELISA, watermelon, seed, pathogen

Giriş

Cucurbitaceae familyasında yer alan sebze türleri meyveleri ve çiçekleri için yetiştirilirler. Afrika, Asya

ve Akdeniz'in sıcak bölgelerinde yetişen ve *Cucurbitaceae* familyasına giren *Citrullus* cinsi içerisinde dört tür bulunmakta ve bu türler diploid (2n=22) kromozom sayısına sahiptirler (Robinson

ve Decker-Walters, 1997). Adı geçen türlerden *Citrullus lanatus* günümüzde ticari olarak yetiştiriciliği yapılan ve karpuz olarak tüketilen türdür. Diğer türler ise, *C. colocynthis* (L.) Schrad., *C. eccirrhosus* Cogn. ve *C. rehmii* De Winter'dir (Robinson ve Deckers-Walters, 1997). *Citrullus lanatus* ve *C. rehmii* tek yıllık türler iken, *C. colocynthis* ve *C. eccirrhosus* çok yıllık türlerdir (Jarret ve Newman, 2000). Tüm *Citrullus* türlerinin gen merkezi Afrika'dır (Robinson ve Deckers-Walters, 1997).

Ülkemizde erken ürün hasadını sağlaması amacıyla karpuz, örtü altında alçak tünellerde yetiştirilmekte ve ilk hasat Mersin ili Tarsus ilçesi Kulak Köyü'nde Mayıs ayı başlarında yapılmaktadır. Ardından Adana ili Karataş ilçesi Tuzla Beldesi'nde kumlu topraklarda yetiştirilen karpuzlar hasada gelmektedir. Erken dönem hasadından sonra Adana'nın çeşitli ilçelerinde (Merkez, Ceyhan, Karataş, Yumurtalık) ve Osmaniye ili Kadırlı ilçesinde yetiştirilen karpuzlar hasat edilmektedir. Bölgemizde en geç hasada gelen karpuzlar ise Adana'nın Karaisalı ilçesinde üretilmektedir. Ülkemizin karpuz üretiminin yaklaşık %75'lik kısmı Çukurova Bölgesinde yapılmaktadır (Horuz, 2014).

Geleneksel karpuz üretiminde karpuz üretimini kısıtlayan en önemli bakteriyel hastalık *Ac*'nin neden olduğu bakteriyel fide yanıklığı ve bakteriyel meyve lekesi hastalığıdır. Bu hastalık ilk olarak, ABD'nin Georgia eyaletinde, Türkiye'den ithal edilen iki farklı karpuz tohum partisinin (174103 ve 174104) fidelerinde Webb ve Goth (1965) tarafından saptanmıştır. Araştırmacılar hastalığın tohum kökenli olabileceğini bildirmiş ancak hastalığa neden olan bakterinin tür düzeyinde tanısını yapamamıştır. Hastalık belirtilerinin ABD'de pek çok fidelikte ortaya çıkışı sonucu, hastalık etmeninin tohumla taşındığı ilk olarak Sowell ve Schaad (1979) tarafından kanıtlanmıştır. Tohum kökenli bu inokulumla ilk mücadele çalışmaları olan tohum uygulamaları, Wall (1989) tarafından araştırılmıştır. *Ac*'nin neden olduğu bakteriyel meyve lekesi hastalığı ilk kez 1987 yılında Büyük Okyanusun batısında, Filipinler'in doğusunda yer alan ABD'ye bağlı bir adalar ülkesi olan Mariana Adaları'nın Guam ve Tinian bölgelerinde karpuz üretim tarlalarında büyük bir epidemiyi yapmış ve tüm dikkatleri üzerine çekmiştir (Wall ve Santos, 1988). Ülkemizde ise ilk defa 1996'da Edirne'nin Enez ilçesinde ortaya çıkmış ve üretim alanı yakılarak temizlenmiştir (Demir, 1996). Mirik ve ark. (2006) tarafından Çukurova Bölgesinde karpuz üretim alanlarında 2004 yılında

ilk kez tespit edilen *Ac* etmeninin ülkemizdeki en şiddetli epidemisi 2009 yılının Haziran ayında gerçekleşmiştir (Aysan ve ark., 2011). Hastalık etmeni ülkemizde karantinaya tabidir. Bu nedenle hastalık tespit edilen alanlar karantinaya alınarak bulaşık tarlalar derin sürüm yapılmış ve dört sene boyunca herhangi bir kabakgil ürünü ekimi yasaklanmıştır (Aysan ve ark., 2011).

Hastalık için ilk inokulum kaynağı bulaşık tohumlardır. Hastalık etmeni bakteri uygun koşullarda depolandığında tohumda otuz yıl kadar yaşamını devam ettirebilir (Block ve Shepherd, 2008). Patojenle bulaşık tohumlar ekildiğinde inokulum kolaylıkla yeni gelişen fidelere geçer (Johnson ve Walcott, 2013). Son yirmi yıldır tüm karpuz ve kavun yetiştirilen ülkelerde kullanılan tohumlar Çin'de üretilmektedir (Feng ve ark., 2013). Kabakgil tohumlarında sıfır toleransı olan bu patojenin, Çin'de tarlalarda (Ren ve ark., 2006) ve kabakgil tohumlarında (Ren ve ark., 2004; Ren ve ark., 2006; Zhao ve ark., 2006; Xu ve ark., 2008) varlığının saptanması tüm dünya için tehlike olarak değerlendirilmektedir (Feng ve ark., 2013). Ülkemizde, bu hastalığın epidemiyi yaptığı yerlerde yapılan çalışmalar sonucunda hastalığın hem yerli hem de ithal F1 tohumları ile üretim yapılan alanlarda da bulunduğu belirlenmiştir. Yaşanan bu epidemiden sonra tüm dikkatler ülkede kullanılan tohumlara yönelmiştir. Özellikle fide firmalarının satın aldığı ithal karpuz tohumu analizi önem taşımaktadır. Özel tohum firmaları, tohum ithalatı için Zirai Karantina Müdürlüğüne başvurarak Zirai Karantina Yönetmeliği'ne göre EK/II-B (Türkiye'de varlığı sınırlı olarak bulunan zararlı organizmalar) listesinde olan bakteriyel meyve leke hastalığı yönünden karpuz tohumlarını analiz ettirmek zorundadırlar.

Bu çalışma kapsamında 2012-2013 yılları arasında ülkemizde kullanılan ticari kabakgil tohumlarında tohum kökenli karpuz bakteriyel meyve lekesi hastalığı etmeni *Ac* varlığı ve izolasyonunda kullanılabilecek en uygun, güvenilir, hızlı ve ekonomik yöntem araştırılmıştır. Tohumda etmenin aranmasında fidede belirti izleme, tohum çalkalama suyundan genel bir besi yeri olan King B, yarı seçici besi yerleri P-278 ve mEBB'ye ekimiyle bakteri izolasyonu, türe spesifik ELISA ve türe spesifik BIO-PCR tanılama yöntemleri kullanılmıştır.

Materyal ve Yöntem

Besi Yeri: Patojen bakterinin çoğaltılmasında genel besi yeri olarak King B (20 g Proteose peptone, 1,5

g K₂HPO₄. 3H₂O, 1,5 g MgSO₄. 7H₂O, 10 g Glycerol, 15 g Agar, 1000 ml Distile Su, pH: 7.0-7.2) (King ve ark., 1954) besi yeri ve yarı seçici P-278 (1.5 g MgSO₄.7H₂O, 1.5 g K₂HPO₄, 15 ml gliserin, 20 g proteose peptone, 1.5 ml brothymol blue (10 mg/ml stok solüsyon), 100 µl Methyl violet (10 mg ml⁻¹ stok solüsyon), 1000 ml Distile Su pH: 7.0-7.2, otoklav sonrası 1 ml cycloheximide, 1 ml vancomycin, 1 ml ampicillin, 100 µl gentamycin, 1 ml 5-fluorouracil ve 2 ml cefaclor) (Randhawa ve ark., 2001) ve mEBB (2.6 g NH₄H₂PO₄, 0.8 g K₂HPO₄, 0.3 g KH₂PO₄, 0.2 g KCl, 0.2 g MgSO₄×7H₂O, 0.3 g yeast extract, 0.5 g boric acid, 16 g agar, 1000 ml saf su, 0.6 ml bromocresol purple (15 mg ml⁻¹ stok solüsyon), 1 ml brilliant blue R (10 mg ml⁻¹ stok solüsyon) pH: 5.3-5.5, otoklav sonrası 10 ml ethanol ve 2 ml cycloheximide) (Zhao ve ark., 2009) besi yerleri kullanılmıştır.

Karşılaştırma kültürü: Testlerde pozitif kontrol olarak Dr. Hatice Selçuk (Selçuk, 2014) tarafından izole edilen ve tanılanan Taşçı-1 kodlu *Ac* izolatu kullanılmıştır.

Testlenen kabakgil tohumları ve çeşitler: Çalışmada yöntem geliştirildikten sonra farklı ticari firmalardan temin edilen tohumlar *Ac* varlığı/yokluğu yönünden incelenmiştir. Buna göre farklı hibrit karpuz çeşitleri (Dizayn MK 14, Starburst, Şahmaran, Üstün, Zeugma F1), karpuz anacı (AG 1355 F1, Cremna, Ferro RZ, TZ 148), kavun çeşidi (Ali Bey) ve hıyar çeşidi (E-Z 2003 F1) testlenmiştir. Toplamda 22 adet farklı kabakgil tohumu *Ac* varlığı/yokluğu yönünden testlenmiştir.

İklim odasının özellikleri: Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü Fitopatoloji Anabilim dalında bulunan 25±2°C, %70 nem, 16 saat aydınlık 8 saat gece koşullarına sahip klima ile ısıtılan iklim odasında çalışma yürütülmüştür.

ELISA tanı kiti: Agdia marka (Agdia Inc., Belkart, USA) SRA 14800 Reagent Set kodlu *Ac*'ye spesifik monoklonal antiserum içeren Double Antibody Sandwich (DAS)-ELISA ticari tanı kiti kullanılmıştır.

PCR malzemeleri: Çalışmada Walcott ve Gitaitis (2000)'in bildirdiği gen dizilimi Iontek (İstanbul) firması tarafından sentezlenen etmene spesifik WFB1 (5'-GAC CAG CCA CAC TGG GAC-3') ve WFB2 (5'-CTG CCG TAC TCC AGC GAT-3') primerleri, PCR master mix (Thermo Fisher Scientific, K0171), agaroz (Sigma, A9539), TAE Buffer (Merck, 1.06023), nuclease free water, PCR tüpü, 100 bp DNA ladder (Thermo Fisher Scientific, SM0241) kullanılmıştır.

Fidede belirti izleme testi: Her bir kabakgil tohum partilerinden (1.000-25.000 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 °C ve % 85 neme sahip iklim odasında muhafaza edilmişlerdir. Çimlenen tohumlarda kotiledon lekeleri kontrol edilmiştir. Kotiledon yapraklar su emmiş leke varlığı/yokluğu yönünden incelenmiştir. Lekeli ve lekesiz kotiledon yapraklardan rastgele seçilerek steril havanda homojenize edilmiştir. Oluşan süspansiyondan King B, P-278 ve mEBB besi yerlerine izolasyon, kotiledon yapraklardan BIO-PCR yapılmıştır.

Tohum örneklerinden *Ac*'nin izolasyonu: 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. Anaç tohumlar gibi daha büyük tohumlar ise parçalayıcıdan geçirilmiştir. Ardından tohumlar içerisinde ağırlıklarının 10 katı kadar nutrient broth 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 15000 rpm hızda 10 dakika santrifüj edilmiş ve pellet alınmıştır. Pellet bulunan 50 ml lik tüplere 4 ml nutrient broth eklenerek tüp çalkalayıcısında çalkalanmıştır.

Elde edilen yıkama suyundan *Acidovorax citrulli*'nin izolasyonu: İçerisinde nutrient broth bulunan ekstraktan 1 ml alınmış ve steril salin buffer (% 0.85 NaCl çözeltisi) içerisinde 1/10, 1/100 ve 1/1000 oranında üç kez seyreltilmiştir. Her bir seyreltmeden King B, P-278 ve mEBB besi yeri içeren petrilere 100 µl eklenerek üç tekrarlı olarak yayma işlemi gerçekleştirilmiştir. P-278 besi yerinde 48 saat inkübasyon sonrası 3-4 mm çapında, lila (açık mor) renkte, yaşlandıkça (7-10 gün sonra) ortası koyu yeşil etrafı açık mor renkte koloniler ve mEBB besi yerinde ise 7 gün inkübasyondan sonra 1-2 mm çapında, mavimsi yeşil renkte kolonilerin varlığı incelenmiş ve şüpheli olan kolonilerden saflaştırmalar gerçekleştirilmiştir.

DAS-ELISA testi ile tohumda *ac* varlığının tespiti: Petriye ekim sonrası geriye kalan tohum çalkalama suyu, kotiledon yaprakların havanda ezilmesi sonucu elde edilen süspansiyon ve petriye yayma sonucu gelişen bakterilerin toplanması sonucu elde edilen karışım *Ac* varlığı/yokluğu yönünden DAS-

ELİSA testiyle testlenmiştir. Pozitif kontrol olarak Taşçı-1 ve negatif kontrol olarak DAS-ELİSA tanı kiti ile beraber gönderilen sağlıklı karpuz yaprağı ekstraktı kullanılmıştır. 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 veya daha yüksek olan değerler pozitif olarak değerlendirilmiştir.

PCR testi ile tohumda *Acidovorax citrulli*'nin izolasyonu : Tohum çalkalama suyu, kotiledon yaprakların havanda ezilmesi ile elde edilen süspansiyon ve petriye yayma sonucu gelişen bakterilerin toplanmasıyla elde edilen karışım *Ac* varlığı/yokluğu yönünden BIO-PCR ve türe spesifik PCR testiyle testlenmiştir. Pozitif kontrol olarak Taşçı-1 ve negatif kontrol olarak PCR karışımı kullanılmıştır. Her bir süspansiyondan 1 ml alınarak genomik DNA Nejat ve ark., (2009)'un bildirdiği yöntem modifiye edilerek izole edilmiştir. PCR karışımı bir mikrosantrifüj tüpte (200 µl) 12.5 µl PCR Master Mix, 6.5 µl nukleaz free water, her bir primerden 2 µl ve 2 µl DNA örneği olmak üzere 25 µl'ye tamamlanmıştır. Tüpler etiketlenerek thermocycler cihazına yerleştirilmiştir. PCR işlemlerinde Walcott ve ark., (2000)'in bildirdiği thermalcycler programı modifiye edilerek kullanılmıştır. Buna göre 95 °C'de 3 dakika ısınma sağlanmış, 95 °C'de 45 saniye ilk denatürasyon, 55 °C'de 45 saniye primerlerin ilgili bölgelere bağlanması, 72 °C'de 45 saniye oluşan yeni DNA fragmentlerinin uzaması şeklinde bir döngü olacak şekilde bu aşamalar 35 döngüye tamamlanmıştır. 72°C'de 10 dakika son uzama ile program tamamlanmıştır. Elde edilen PCR ürünleri % 1.5 agaroz jelde 360 bp bant varlığı/yokluğu yönünden incelenmiştir.

Bulgular ve Tartışma

Fidede belirti izleme yöntemiyle *ac*'nin aranması:

Fidede belirti izlemek amacıyla ekilen tohumlardan gelişen kotiledon yapraklarda su emmiş leke oluşumu 3 adet farklı karpuz tohum örneğinde gözlenmiştir (Şekil 1). Su emmiş lekelerden King B besi yerine izolasyon yapılmış ve patojen bakteri izole edilmiştir. Patojen *Ac* tanısı karpuz fidelerinde patojenite testi ve türe spesifik PCR testiyle teyit edilmiştir.

Çimlenen tohumlardan gelişen fidelerden hastalık belirtisi gözlenmeyen örneklerde, rastgele yaprak örnekleri alınarak steril havanda ezilmesiyle elde edilen pellet seyreltilerek King B, P-278 ve mEBB besi yerlerinde geliştirildikten sonra tüm bakteri kolonileriyle yapılan DAS-ELISA testinde patojen varlığı saptanamamıştır. King B besi yerinde gelişen tüm bakteri kolonileriyle yapılan PCR testinde herhangi bir bant elde edilemezken, P-278 ve mEBB besi yerinde gelişen bakterilerle yapılan PCR testinde 360 bp büyüklüğünde bant görülmüş ve pozitif olarak değerlendirilmiştir. Genel bir besi yeri olan King B besi yerinde pek çok bakteri cinsi gelişebilmektedir. Özellikle *Pseudomonas*'lar diğer cinslere göre bu besi yerinde daha iyi gelişmektedir. *Acidovorax* cinsine ait türler King B besi yerinde gelişene kadar *Pseudomonas* cinsine ait türler hızla gelişerek bu besi yerini kaplamakta ve az miktarda olan *Ac* popülasyonunun gelişmesini engellemektedir. Yarı seçici P-278 ve mEBB besi yerlerinde *Acidovorax* cinsi diğer cinslere göre daha kolay geliştiğinden az sayıdaki popülasyon ELISA ile saptanamazken, PCR testlerinde saptanmıştır. Sonuç olarak tohumlar ekilip gelişen fidelerden elde edilen pellet seyreltilerek petriye ekildiğinde gelişen bakteri kolonileriyle yapılan türe spesifik PCR testiyle *Ac* varlığı başarıyla saptanmıştır. Ancak tohumdan fide elde edilmesini beklemek zaman kaybına neden olmaktadır.



Şekil 1. Karpuz kotiledon yapraklarında gözlenen su emmiş lekeler (ok)

Figure 1. Water soaked lesions on watermelon cotyledons (pointed)

Elde edilen yıkama suyundan bakteri izolasyonu:

Testlenen tohum örneklerinin bir çoğunun fungusitle kaplı olmasından dolayı tohum çalkalama suyundan uygun pellet elde edilememiş, bu nedenle direk DAS-ELISA ve PCR testlerine tabi tutulamamıştır. Sonuç olarak, *Ac* tohum örneklerinin çalkalanmasıyla elde edilen pelletin incelenmesi yöntemiyle her zaman patojen tespit edilememiştir.

Pellet elde edilen örneklerde ise genel besi yeri King B besi yerinde gelişen bakteri kolonileriyle

yapılan DAS-ELISA testinde patojen varlığı saptanamamıştır. Ancak P-278 ve mEBB besiyerinde gelişen bakteri kolonilerinin toplanmasıyla elde edilen pellet ile yapılan DAS-ELISA ve PCR testinde patojen saptanmıştır. Bu yöntemle göre tohum çalkalama suyundan, P-278 ve mEBB besi yerinde gelişen bakterilerden elde edilen süspansiyondan yapılan DAS-ELISA testinde, bir adet karpuz örneğinde *Ac* bulaşıklığı saptanmıştır (Tablo 1).

Tablo 1. *Acidovorax citrulli* spesifik antiserumla yapılan DAS-ELISA testi sonuçları

Table 1. DAS-ELISA test results of *Ac* specific antiserum

Çeşit	ELISA Okuma Değerleri (405 nm)	Sonuç
Negatif Kontrol	0,065	-
Pozitif Kontrol (<i>Ac</i>)	3,063	+
Petride gelişen bakterilerden yıkama		
Karpuz 1	1,112	+
Karpuz anacı 1	0,119	-
Karpuz anacı 2	0,170	-

DAS-ELISA testiyle patojen varlığının tespiti:

Testlenen 22 adet tohum örneği nutrient broth sıvı besi yerinde çalkalandıktan 24 saat sonra elde

edilen tohum çalkalama suyundan direk yapılan DAS-ELISA testlerinde bir adet kavun örneğinde *Ac* bulaşıklığı saptanmıştır (Tablo 2).

Tablo 2. *Acidovorax citrulli* spesifik antiserumla yapılan DAS-ELISA testi sonuçları

Table 2. DAS-ELISA test results of *Ac* specific antiserum

Çeşit	ELISA Okuma Değerleri (405 nm)	Sonuç
Negatif Kontrol	0,615	-
Pozitif Kontrol (<i>Ac</i>)	3,316	+
tohum çalkalama suyu		
Kavun 1	0,526	-
Kavun 2	2,160	+

PCR testi ile tohumda *Ac*'nin aranması: Tohum çalkalama suyunun yarı seçici besi yerine yayma işlemlerinden elde edilen süspansiyon ile yapılan türe spesifik PCR testinde bir adet hıyar tohumu, bir adet kavun tohumu ve 2 (iki) adet karpuz çeşidine ait tohumlarda pozitif kontrolde olduğu gibi 360 bp büyüklüğünde bant oluşumu görülmüş ve testlenen hıyar, kavun ve karpuz çeşitlerinin *Ac* ile bulaşık olduğu saptanmıştır.

Patojenin tohumda bulunduğu yer patojenin saptanması açısından önemlidir. Bakteriye etmen tohumun hem kabuğuna hem de embriyosuna yerleşebilmektedir. Bu nedenle çalışmada testlenen tohumlarda yara açılması sağlanarak embriyoya yerleşen patojenin de saptanabilmesi sağlanmıştır. Dutta ve ark., (2012) *Ac*'nin tohumda bulunduğu yerin, tohum sağlık testlerinde patojenin saptanmasına etkisinin olup olmadığını araştırmışlardır. Patojen, karpuzda stigmadan pistil inokulasyonu veya ovaryumdan perikarp inokulasyonu yapılarak bulaştırılmıştır. Bu meyvelerden elde edilen tohumlar, parçalanmadan tüm halde ve parçalandıktan sonra ekstraksiyon sıvısında çalkalanarak, tohumdaki etmenin varlığı yarı seçici besi yerine ekim ve quantitative realtime PCR ile araştırılmıştır. Patojen, karpuzda stigmadan pistil inokulasyonu sonucu bulaşmışsa tohum embriyosuna yerleşmiştir. Patojen, karpuzda ovaryumdan perikarp inokulasyonu sonucu bulaşmışsa tohum kabuğuna yerleşmiştir. Pistil inokulasyonu sonucu embriyoya yerleşen bakteriyi ararken, tohum tüm olarak kullanıldığında patojenin varlığı belirlenememişken, tohum parçalanarak kullanıldığında tohumdaki patojen bakterinin varlığı saptanmıştır.

Serolojik bir yöntem olan ELISA testinde düşük popülasyondaki patojen saptanamamaktadır. Horuz, (2014) doktora çalışmasında 10^4 hücre/ml ve üzeri yoğunluktaki *Ac* popülasyonunu DAS-ELISA testinde başarılı bir şekilde saptarken, 10^3 ve altındaki *Ac* popülasyonunu bu testle belirleyememiştir. Ayrıca kullanılan ticari kitin 10^4 hücre/ml yoğunluğundaki bakteri popülasyonunu saptayacak duyarlılıkta olduğunu bildirmiştir. Bu çalışmada da tohumda düşük popülasyonlarda latent olarak bulunan bakteri DAS-ELISA testiyle saptanamamıştır.

Yapılan bu çalışma ile fidede belirti izleme yöntemine göre hastalık belirtisi gözlenen fidelerden etmen izole edilebilirken, belirti göstermeyen fidelerden alınan örneklerden sadece birinde etmen saptanabilmiştir. Fidede belirti

izleme testinin tek başına kullanılamayacağı, diğer serolojik ve moleküler yöntemlerle kombine halde kullanılması gerektiği saptanmıştır. Çalışmamıza benzer şekilde Walcott ve ark., (2003) karpuzun çiçeklenme evresinde *Ac*'nin çiçeğe bulaştığında, o bitkiden elde edilen tohumlardaki patojenin, bulaşıklılık oranını belirlemeyi amaçladıkları çalışmalarında, tohumda bakteriyi saptarken serolojik test olan immuno-magnetic-separation ve moleküler bir test olan PCR'ı (IMS-PCR) birlikte kullanmışlardır. IMS-PCR ile, bulaşık tohum partilerinin %44'ünde patojen saptanırken, fidede belirti izleme yönteminde sadece %27'sinde patojenin varlığı saptanmıştır. Fidede belirti izleme yöntemiyle diğer serolojik ve moleküler yöntemlerin kombine edilerek kullanıldığı durumda testlemelerin daha duyarlı olacağı ifade edilmiştir. Bir başka çalışmada Walcott ve ark., (2006) *Ac*'nin tohumlardan saptanması için IMS PCR'ı kullanmışlardır. Bu yöntemle fidede belirti izleme yöntemi karşılaştırıldığında, IMS-PCR çok daha duyarlı olarak saptanmıştır. 10.000 adet patojenle bulaşık tohumla yapılan çalışmada IMS-PCR ile patojenin varlığını belirleme oranı % 87.5 iken, fidede belirti izleme testinde bu oran % 37.5 olarak belirlenmiştir. Yeni geliştirilen bu yöntemin kabakgil tohum partilerinin incelenmesi aşamasında fidede belirti izleme yöntemine göre alternatif olarak değerlendirilmiştir.

Bu çalışmada testlenen 22 adet kabakgil tohumundan dört tanesinin (bir hıyar, bir kavun ve iki karpuz) *Ac* ile bulaşık olduğu tohum çalkalama suyundan elde edilen pelletin P-278 ve/veya mEBB adlı yarı seçici besi yerlerine ekim ve gelişen bakterilerin toplanarak etmene spesifik PCR testleriyle başarılı bir şekilde belirlenmiştir. Çalışma sonucunda belirlenen bu BIO-PCR yöntemine göre, kabakgil tohumları fide haline getirilmeden hızlı bir şekilde bu patojenin varlığı yönünden incelenebileceği ortaya konmuştur. Benzer şekilde Ren ve ark., (2004) kavun tohumlarını su ve PBST içerisinde çalkaladıktan sonra elde edilen pelletten direk DNA'yı izole edip *Ac*'ye spesifik primerle PCR çalışmaları yapmışlardır. Bu yöntemle Çin Halk Cumhuriyeti'nde marketlerden satın aldıkları 11 kavun çeşidinden sekizinde patojen bakterinin varlığını tespit etmişlerdir. Bahar ve ark., (2008) *Ac*'nin kavun ve karpuz tohumlarından saptanmasında dizayn ettikleri primerle Immuno-magnetic-separation ile moleküler bir test olan PCR'ın kombinasyonu ile oluşturulan yeni yöntemle (IMS-PCR), 5000 adet kavun veya karpuz tohumundan sadece biri bu patojenle bulaştırıldığında kullanılan bu yöntemle patojenin

varlığı tohumlarda saptanmıştır. Geliştirilen bu yöntemle patojenin tohum çalkalama suyundan son derece uygun, hızlı, duyarlı ve spesifik olarak saptandığı belirtilmiştir. Zhao ve ark., (2009) kavun ve karpuz tohumlarından *Ac*'nin varlığının saptanmasında yarı seçici besi yerine (EBB ve EBBA) ekim ve real-time PCR'a dayalı bir "real-time BIO-PCR" yöntemi geliştirmişlerdir. Tohumlar parçalandıktan sonra Vancomycin içeren bir tohum ekstraksiyon sıvısında çalkalanmış ve tohum çalkalama suyu EBB ve EBBA besi yerlerine ekilmiştir. Besi yerinde gelişen bakteri kolonileri toplanarak real-time PCR işlemleri uygulanmıştır. Sadece canlı bakteri hücrelerinin reaksiyon oluşturduğu PCR işlemi olan real-time BIO-PCR ile ml'deki tek bir *Ac* hücresi pozitif olarak saptanmıştır. Feng ve ark., (2013) kabakgil tohumlarından *Ac*'nin saptanmasında bugüne kadar kullanılan yöntemlerin karşılaştırmasını yaptığı derlemede, genel ve yarı seçici besi yerinin, fidede belirti izleme, serolojik teknikler (immünizasyon, immuno-strip, MFIS, immuno-sensor) ve moleküler tekniklerin (klasik PCR, BIO-PCR, IMC-PCR, IMS-PCR, MCH-PCR, EMA-PCR, Real time PCR) etki durumunu değerlendirmişlerdir. BIO-PCR, IMC-PCR, IMS-PCR, MCH-PCR, Real time PCR'ı en etkili yöntemler olarak bildirmişlerdir.

Sonuç

Kabakgil tohumlarında bakteriyel patojenlerin aranmasında ISTA, ISHI veya EPPO gibi uluslararası kuruluşların önerdiği gibi tohum partileri testlenirken en az 10.000 adet tohum kullanılmalıdır. Geliştirilen BIO-PCR yöntemiyle, bu çalışmada testlenen hibrit çeşitlerden 1.000 adet, anaç olarak kullanılan çeşitlerde ise 2.500-25.000 adet tohum kullanılmıştır. Hibrit tohumların testlendiği laboratuvarlarda *Ac* bulaşıklığı saptanırken 10.000-30.000 adet tohumun kullanılması önerilmektedir.

Çalışma sonucunda, yarı seçici besi yerlerine ekim ve gelişen bakterilerin toplanarak etmene spesifik PCR testleriyle patojenin varlığı başarılı bir şekilde belirlenmiştir. Geliştirilen bu yöntemle karpuz, karpuz anacı, kavun ve hıyar tohumlarını içeren 22 farklı kabakgil tohum örneği *Ac* varlığı yönünden incelenmiş ve dört örneğin (bir hıyar, bir kavun ve iki karpuz) patojenle bulaşık olduğu saptanmıştır. Belirlenen bu BIO-PCR yöntemine göre, kabakgil tohumları fide haline getirilmeden uygun ve hızlı bir şekilde bu patojenin varlığı yönünden incelenebilir.

Sonuç olarak, tohum kökenli olan ve doğada pek çok yerde yaşama yeteneğindeki bu bakterinin mücadelesinde sağlıklı ya da hastaliksız tohumlarla üretime başlamak, etkili tohum uygulamalarını kullanmak (Mengulluoglu ve Soyulu, 2012), uygun bitki besleme programlarının takip edilmesi (Zimerman-Lax ve ark., 2016), biyolojik mücadele elemanlarının kullanılması (Horuz ve Aysan, 2018) gibi yöntemler hastalığın mücadelesi açısından önemlidir.

Teşekkür

Bu çalışma Çukurova Üniversitesi BAP birimi tarafından ZF2011D5 (ID:2249) kodlu projeye desteklenmiştir.

Kaynaklar

- Aysan, Y., S. Horuz, R. Cetinkaya Yildiz, M. Mirik ve H. Saygılı, 2011. Karpuz üretim alanlarında *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*'nin yayılmasında tohum kökenli bulaşmaların önemi. Türkiye IV. Tohumculuk Kongresi, 14-17 Haziran 2011, Samsun, 292-293 s.
- Bahar, O., M. Efrat, E. Hadar, B. Dutta, R.R. Walcott, and S. Burdman, 2008. New subspecies-specific polymerase chain reaction based assay for the detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. Plant Pathology, 57 (4):754-763.
- Block, C.C. and L.M. Shepherd, 2008. Long-term survival and seed transmission of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in melon and watermelon seed. Plant Health Progress, DOI:10.1094/PHP-2008-1219-01-BR.
- Demir, G. 1996. A new bacterial disease of watermelon in Türkiye: Bacterial fruit blotch of watermelon (*Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (Schaad et al.) Williams et al.). Journal of Turkish Phytopathology, 25(2):43-49.
- Dutta, B. M.A.C. Vernaiz, A.C. Castro-Sparks, H. Scherm, and R.R. Walcott, 2012. Location of *Acidovorax citrulli* in watermelon seeds affects efficiency of pathogen detection by seed health testing. Seed Science and Technology, 40 (3):309-319.
- Feng, J.J. J.O. Li, R.R. Walcott, G.M. Zhang, L.X. Luo, L. Kang, Y. Zheng, and N.W. Schaad, 2013. Advances in detection of *Acidovorax citrulli*, the causal agent of bacterial fruit blotch of cucurbits. Seed Science and Technology, 41 (1):1-15.
- Horuz, S. 2014. Karpuzda bakteriyel meyve lekesi hastalığı etmeni *Acidovorax citrulli*'nin tanısı, moleküler karakterizasyonu ve bakteriyel antagonistlerle biyolojik mücadelesi. Ç.Ü, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilim Dalı Doktora tezi, 203 s.
- Horuz, S. and Y. Aysan 2018. Biological control of watermelon seedling blight caused by *Acidovorax citrulli* using antagonistic bacteria from the genera *Curtobacterium*, *Microbacterium* and *Pseudomonas*. Plant Protection Science (basımda).
- Jarret, R.L. and M. Newman, 2000. Phylogenetic relationships among species of *Citrullus* and the

- placement of *C. rehmanii* De Winter as determined by Internal Transcribed Spacer (ITS) Sequence heterogeneity. Genetic Resources and Crop Evolution, 47(2):215-222.
- Johnson, K.L. and R.R. Walcott, 2013. Quorum sensing contributes to seed-to seedling transmission of *Acidovorax citrulli* on watermelon. Journal of Phytopathology, 161 (7):562-573.
- King, E.O. M.K. Ward, and D.E. Raney, 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and floresin. J.Lab. Clin. Med. 44:301-307.
- Mengulluoglu, M. and S. Soylu 2012. Antibacterial activities of essential oils extracted from medicinal plants against seed-borne bacterial disease agent, *Acidovorax avenae* subsp *citrulli*. Research on Crops 13 (2): 641-646.
- Mirik, M. Y. Aysan, and F. Sahin, 2006. Occurrence of bacterial fruit blotch of watermelon caused by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in the Eastern Mediterranean Region of Turkey. Plant Disease, 90(6):829.
- Nejat, N. K. Sijam, S.N.A. Abdullah, G. Vadamalaj, 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.
- Randhawa, P.S. S.S. Pannu and N.W. Schaad 2001. Improved Bio-PCR test for detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in watermelon and cantaloupe seeds. APS/Msa/Son Joint Meeting, August, 25-29, p. 1-4.
- Ren, Y.Z. H. Li, G.Y. Li, X.D. Wang, G. Wan, and L. Fang, 2004. Detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in melon seed using the polymerase chain reaction. Xinjiang Agricultural Sciences, 41(5):329-332.
- Ren, Y.Z. H. Li, G.Y. Li, and Q.Y. Wang, 2006. First report of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* infecting edible seed watermelon (*Citrullus lanatus* var. *lanatus*) in China. Plant Disease, 90 (8):1112.
- Robinson, R.W. and D.S. Decker-Walters, 1997. Cucurbits. CAB International, New York, NY, USA
- Selçuk, H. 2014. *Acidovorax citrulli*'nin karpuzun tohum, fide, meyvesinden izolasyonu ve farklı tohum uygulamalarının bakteriyel fide yanıklığı hastalığının çıkışı üzerine etkisi. Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilim Dalı, Doktora Tezi, 126 s.
- Sowell, G. and N.W. Schaad, 1979. *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli* on watermelon-Seed transmission and resistance of plant introductions. Plant Disease Reporter, 63:437-441.
- Walcott, R.R. and R.D. Gitaitis 2000. Detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in watermelon seed using immunomagnetic separation and the polymerase chain reaction. Plant Disease, 84(4):470-474.
- Walcott, R.R. D.B. Langston, F.H. Sanders and R.D. Gitaitis 2000. Investigating intraspecific variation of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* using DNA fingerprinting and whole cell fatty acid analysis. Phytopathology, 90(2):191-196.
- Walcott, R.R., Gitaitis, R.D. and Castro, A.C. 2003. Role of blossoms in watermelon seed infestation by *Acidovorax avenae* subsp *citrulli*. Phytopathology, 93 (5):528-534.
- Walcott, R. R. A. C. Castro, A. Fessehaie, and K. Ling, 2006. Progress towards a commercial PCR-based seed assay for *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. Seed Science and Technology, 34(1):101-116.
- Wall, G.C. and V.M. Santos, 1988. A new bacterial disease of watermelon in the Mariana Islands. *Phytopathology*, 78 (5), 1605.
- Wall, G.C. 1989. Control of watermelon fruit blotch by seed heat treatment. *Phytopathology*, 79 (8):1191.
- Webb, R.E. and R.W. Goth, 1965. A seedborne bacterium isolated from watermelon. *Plant Disease Reporter*, 49:818-821.
- Xu, F.S. X. Wang, G.L. Xie, T. Su, and S.H. Yu, 2008. Detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* from seeds of watermelon by immunocapture PCR. *Journal of Fruit Science*, 25(2):215-218.
- Zhao, L.H. X. Wang, G.L. Xie, F.S. Xu, and G.X. Xie, 2006. Detection of the pathogen associated with bacterial fruit blotch of watermelon by immunocapture PCR. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 14(6):946-951.
- Zhao, T.J. Feng, A. Sechler, P. Randhawa, J. Li, and N.W. Schaad, 2009. An improved assay for detection of *Acidovorax citrulli* in watermelon and melon seed. *Seed Science and Technology*, 37 (2):337-349.
- Zimmerman-Lax, N. M. Shenker, D. Tamir-Ariel, R. Perl-Treves and S. Burdman 2016. Effects of nitrogen nutrition on disease development caused by *Acidovorax citrulli* on melon foliage. *European Journal of Plant Pathology*, 145 (1):125–137.