

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İÇ ANADOLU BÖLGESİNDE
FASULYE TOHUMLARINDA
Pseudomonas syringae pv. *phaseolicola*
BULAŞIKLILIĞININ
BİYOKİMYASAL VE MOLEKÜLER
YÖNTEMLERLE BELİRLENMESİ

DİLEK KENDİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

KONYA-2009

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İÇ ANADOLU BÖLGESİNDE FASULYE TOHUMLARINDA
Pseudomonas syringae **pv. phaseolicola**
BULAŞIKLILIĞININ BİYOKİMYASAL VE MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE
BELİRLENMESİ

DİLEK KENDİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. KUBİLAY KURTULUŞ BAŞTAŞ

KONYA-2009

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İÇ ANADOLU BÖLGESİNDE FASULYE TOHUMLARINDA
Pseudomonas syringae pv. *phaseolicola*
BULAŞIKLILIĞININ BİYOKİMYASAL VE MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE
BELİRLENMESİ

Dilek KENDİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

Bu tez 22.05.2009 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği ile kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Nuh BOYRAZ
(Üye)

Yrd. Doç. Dr. Kubilay K. BAŞTAŞ
(Danışman)

Yrd. Doç. Dr. Ercan CEYHAN
(Üye)

ÖZET**YÜKSEK LİSANS TEZİ****İÇ ANADOLU BÖLGESİNDE FASULYE TOHUMLARINDA
Pseudomonas syringae pv. *phaseolicola*
BULAŞIKLILIĞININ BİYOKİMYASAL VE MOLEKÜLER
YÖNTEMLERLE BELİRLENMESİ****Dilek KENDİ****Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Bitki Koruma Ana Bilim Dalı****Danışman: Yrd. Doç. Dr. Kubilay Kurtuluş BAŞTAŞ****2009, 82 Sayfa****Jüri: Doç. Dr. Nuh BOYRAZ
Yrd. Doç. Dr. Kubilay Kurtuluş BAŞTAŞ
Yrd. Doç. Dr. Ercan CEYHAN****ÖZET**

Pseudomonas syringae pv. *phaseolicola*, fasulyelerde haleli yanıklık hastalığına sebep olan, tohumla taşınan ve ciddi zararlara yol açan bakteriyel etmendir. İç Anadolu Bölgesindeki 12 ilden ve ekonomik anlamda fasulye ekimi yapılan alanlardan, ekilen arazi büyüklüğü esas alınarak, tohum örnekleri toplanılmıştır. Patojenin izolasyonu ve tanısında; NA, MSP, King B besi yerlerinde gelişim, levan oluşumu, oksidaz reaksiyonu, pektolitik aktivite testi, arginine dehidrolaz testi, karbon kaynaklarının kullanımı, arbutin hidrolizi, jelatinin hidrolizi, nitrat indirgenmesi, H₂S üretimi, tütün yaprağında (White Burley) aşırı duyarlılık reaksiyonu testleri esas alınmıştır. Patojenisite testlerinde, Dermason çeşidi fasulye bitkilerine yapılan 10⁸ hücre/ml *P. s.* pv. *phaseolicola* süspansiyonu ile inokulasyon sonucu tipik yaprak lekeleri gözlenmiştir. Etmenin moleküler karakterizasyonu, Bio-PCR yöntemi ve phaseolotoksin geninin amplifikasyonu ile tespit edilmiştir. Elde edilen bulgulara göre, toplam 175 bakteriyel izolattan 38 adedi *P. s.* pv. *phaseolicola* olarak tanılanmış 12 ilde tohumla taşınma oranı Ankara %2.28,

Aksaray %5.14 Çorum %0, Eskişehir %0, Kayseri %1.71, Kırşehir %0, Kırıkkale %1.71, Konya %6.85, Nevşehir %1.14, Niğde %1.71, Sivas %1.14, Yozgat %0 ve İç Anadolu Bölgesinde etmenin tohumla taşınma oranı %21 olarak belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler; Fasulye, Tohum, *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, Bio-PCR

ABSTRACT**MS Thesis****DETERMINATION of INFECTION RATE of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* on BEAN SEEDS with BIOCHEMICAL and MOLECULAR METHODS in CENTRAL ANATOLIA REGION****Dilek KENDİ****Selçuk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Plant Protection****Advisor: Assist. Prof. Dr. Kubilay Kurtuluş BAŞTAŞ****2009, 82 Page****Jury: Assoc. Prof. Dr. Nuh BOYRAZ
Assist. Prof. Dr. Kubilay Kurtuluş BAŞTAŞ
Assist. Prof. Dr. Ercan CEYHAN****ABSTRACT**

Pseudomonas syringae pv. *phaseolicola*, cause halo blight disease on bean, is bacterial agent transmitted by seed and causing serious damages. It was collected seeds of dry bean from 12 provinces in Central Anatolia Region and economically bean growing areas which based size of sowing field. The isolation and identification of pathogen was based growth on NA, MSP, King's B, levan production, oxidase reaction, pectolytic activity, arginine dehidrolase, utilizing of carbon sources, arbutin hydrolysis, gelatin hydrolysis, nitrate reduction, H₂S production, hypersensitive reaction on tobacco (cv. White Burley) tests. It was obtained typically leaf symptoms on bean cultivar Dermason which inoculated a suspension 10⁸ cfu/ml of *P. s.* pv. *phaseolicola* in the pathogenicity tests. Molecular characterization of the agent was obtained by Bio-PCR method and amplification of phaseolotoxin gen. According to obtained data, it was identified 38 isolates as *P. s.* pv. *phaseolicola* from totally 175

bacterial isolates and Ankara %2.28, Aksaray %5.14 Çorum %0, Eskişehir %0, Kayseri %1.71, Kırşehir %0, Kırıkkale %1.71, Konya %6.85, Nevşehir %1.14, Niğde %1.71, Sivas %1.14, Yozgat %0 determined transmission ratio as 21% by bean seeds in Central Anatolia Region.

Key Words; Bean, Seed, *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, Bio-PCR

TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesinde bana önderlik eden, laboratuvar çalışmaları ve yazım aşamasında yardımlarını ve eleştirilerini esirgemeyen değerli fikir ve katkılarıyla çalışmalarımı yönlendiren danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Kubilay K. BAŞTAŞ'a, tezim boyunca bölümün tüm olanaklarından yararlanmamı sağlayan bölüm başkanımız Sayın Prof. Dr. Ahmet GÜNCAN'a, değerli hocam Sayın Doç. Dr. Nuh BOYRAZ'a, Tarla Bitkileri Bölümü hocalarımızdan Sayın Yrd. Doç. Dr. Ercan CEYHAN'a, çalışmalarım sırasında desteklerini gördüğüm çalışma arkadaşlarıma, tüm hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen ve gösterdikleri anlayışla bugünlere gelmemi sağlayan sevgili aileme en içten teşekkürlerimi sunarım.

Konya, 2009**Dilek KENDİ**

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖZET	I
ABSTRACT	III
TEŞEKKÜR	V
İÇİNDEKİLER	VI
ŞEKİLLER LİSTESİ	VIII
ÇİZELGELER LİSTESİ	X
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	4
3. MATERYALVE METOD	16
3.1. Materyal.....	16
3.1.1. Bitki Materyali.....	16
3.1.2. Referans Kültürler.....	16
3.1.3. Çalışmada Kullanılan Laboratuar Alet Ve Ekipmanları.....	16
3.2. Metod.....	17
3.2.1. Örnekleme metodu.....	17
3.2.2. <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> 'nın izolasyonu.....	18
3.2.3. Patojenin tanısı.....	20
3.2.3.1. Koloni morfolojisi.....	20
3.2.3.2. Biyokimyasal testler.....	20
3.2.3.2.1. Gram reaksiyon testi.....	25
3.2.3.2.2. Arjinin Dihidrolaz testi (Arginine Dehidrolase Testi).....	25
3.2.3.2.3. Levan (Fruktan) testi.....	26
3.2.3.2.4. Oksidaz testi.....	26
3.2.3.2.5. Arbutin hidrolizi.....	27
3.2.3.2.6. Karbon kaynaklarının kullanımı.....	27
3.2.3.2.7. Jelatinin hidrolizi.....	28
3.2.3.2.8. Esculin hidrolizi.....	28
3.2.3.2.9. Hidrojen sülfid (H ₂ S) oluşumu.....	29
3.2.3.2.10. Floresan pigment üretimi.....	29
3.2.3.2.11. Katalaz testi.....	30
3.2.3.2.12. Nitrat redüksiyon testi.....	30
3.2.3.2.13. Pektinaz testi.....	30
3.2.3.2.14. Nişastanın hidrolizi.....	31
3.2.3.3. Patojenisite testi.....	32
3.2.3.4. Tütünde aşırı duyarlılık (Hipersensitive Reaction =HR)testi.....	32
3.2.3.5. Moleküler tanılama.....	33
3.2.3.5.1. BIO-PCR.....	33
3.2.3.5.1.1. <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> 'nın DNA amplifikasyonu için spesifik primerlerin kullanımı.....	33
3.2.3.5.1.1.1. <i>phaseolotoxin</i> geni için spesifik primer.....	33
3.2.3.5.1.1.2. <i>tox</i> gen bölgesi için spesifik primer.....	33
3.2.3.5.2. Moleküler tanıda kullanılan kimyasallar.....	34
3.2.3.5.3. <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> 'nın DNA amplifikasyonu için Polymerase Chain Reaction (PCR) karışımının hazırlanması.....	34

3.2.3.5.4. <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> 'nın DNA amplifikasyonu için spesifik primerlerle uygulanan PCR protokolleri.....	35
3.2.3.5.4.1. <i>phaseolotoxin</i> geni PCR protokolü	35
3.2.3.5.4.2. <i>tox</i> geni PCR protokolü.....	36
3.2.3.5.5. PCR ürünlerinin elektroforez sisteminde belirlenmesi.....	36
3.2.3.5.5.1. Agaroz jelin ve elektroforez tampon solüsyonunun hazırlanması.....	36
3.2.3.5.5.2. Amplifiye edilen bakteriyel DNA örneklerinin elektroforez sisteminde yürütülmesi.....	36
3.2.3.5.5.3. Agaroz jelin görüntülenmesi ve sonuçların incelenmesi.....	37
3.3.4. Kültürlerin Saklanması.....	37
4.ARAŞTIRMA BULGULARI.....	38
4.1. Örnekleme Sonuçları.....	38
4.2. Patojenin Tanısı.....	41
4.2.1. Koloni morfolojisi.....	41
4.2.2. Biyokimyasal Test Sonuçları.....	42
4.2.2.1. Gram Reaksiyon Testi.....	42
4.2.2.2. Arjinin dehidrolaz testi (Arginine Dihydrolase Testi).....	42
4.2.2.3. Levan (Fructan) testi.....	42
4.2.2.4. Oksidaz testi.....	43
4.2.2.5. Arbutin hidrolizi testi.....	43
4.2.2.6. Karbon kaynaklarının kullanımı.....	43
4.2.2.7. Jelatinin hidrolizi.....	44
4.2.2.8. Esculin hidrolizi.....	44
4.2.2.9. Hidrojen sülfid (H ₂ S) oluşumu.....	45
4.2.2.10. Floresan pigment üretim testi.....	45
4.2.2.11. Katalaz testi.....	46
4.2.2.12. Nitrat indirgenmesi testi.....	46
4.2.2.13. Pektinaz testi.....	46
4.2.2.14. Nişastanın hidrolizi.....	46
4.2.3. Patojenisite testi.....	47
4.2.4. Tütünde aşırı duyarlılık (Hipersensitive Reaction =HR)testi.....	48
4.2.5. Moleküler tanılama.....	53
4.2.5.1. BIO-PCR amplikasyon sonuçları.....	53
5. TARTIŞMA	55
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	61
7. KAYNAKLAR.....	66
ÖZGEÇMİŞ.....	82

ŞEKİLLER LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 3.1. İç Anadolu Bölgesinde fasulye örnekleri elde edilen iller.....	16
Şekil 4.1. A. MSP Besiyerindeki 24 Saatlik İnkubasyon Sonucunda Koloni Rengi ve Yapısı B. MSP Besiyerindeki 48 Saatlik İnkubasyon Sonucunda Besiyeri Rengindeki Değişiklik, Koloni Rengi ve Yapısı.....	41
Şekil 4.2. King B Besiyerindeki 24 Saatlik İnkubasyon Sonucundaki Koloni Rengi ve Yapısı.....	41
Şekil 4.3. Gram Reaksiyon Testi Sonucu.....	42
Şekil 4.4. %5 SNA besiyerinde konveks, mukoid koloni oluşumu.....	42
Şekil 4.5. Oksidaz Testi Sonucu A. Negatif kontrol B. <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>	43
Şekil 4.6. Karbonhidratlardan Asit Üretimi Testi Sonucu A. Negatif kontrol B. Pozitif kontrol (NCPPB52) C. <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> D. <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> E. <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	43
Şekil 4.7. Jelatinin Hidrolizi Testi Sonucu A. Negatif kontrol B. <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> C. <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> D. <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>	44
Şekil 4.8. Esculin Hidrolizi Testi Sonucu A. Negatif kontrol B. <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> C. <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> D. <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> E. <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	44
Şekil 4.9. Hidrojen Sülfid Oluşumu Testi Sonucu A. Negatif kontrol B. <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> C. <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>phaseoli</i>	45
Şekil 4.10. Floresan Pigment Üretimi Testi Sonucu.....	45
Şekil 4.11. Katalaz Testi Sonucu oluşan kabarcık çıkışı.....	46
Şekil 4.12. Dermason çeşidi fasulyelerde <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> izolatları için yapılan patojenisite testi sonucu yapraklarda görülen nekrotik alanlar.....	47
Şekil 4.13. <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> tarafından yapraklarda oluşturulan hale leke belirtileri.....	47

Şekil 4.14. A. <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> izolatının (PspAk6) B. Kontrol (su) tütünde göstermiş olduğu hipersensitif reaksiyon	48
Şekil 4.15. P5.1-P3.1 primer çifti ile 500 bp da bant oluşumu.....	53
Şekil 4.16. HM6-HM13 primer çifti ile 1900 bp da bant oluşumu.....	54

ÇİZELGELER LİSTESİ**Sayfa No**

Çizelge 1. İç Anadolu Bölgesinde fasulye ekiliş alanlarından elde edilen verim ve örnekleme sayıları.....	18
Çizelge 2. <i>Pseudomonas</i> Türlerinin Tanılanmasında Kullanılan Biyokimyasal Testler.....	21
Çizelge 3. <i>Pseudomonas syringae</i> 'nin Patovarylarının Genel Tanılanmasında Kullanılan Testler.....	23
Çizelge 4. İç Anadolu Bölgesinde örnekleme yapılan 12 ilden elde edilen toplam bakteriyel izolat sayısı ve <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> izolatları.....	39
Çizelge 5. İç Anadolu Bölgesi'ndeki örnekleme yapılan 12 ilde <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> 'nın illere göre taşınma oranları.....	40
Çizelge 6. İç Anadolu Bölgesinde fasulye tohumlarından elde edilen 38 <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> izolatının biyokimyasal testlere vermiş oldukları reaksiyonlar.....	49

1. GİRİŞ

Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) insan beslenmesinde çok önemli yeri olan protein kaynağı yüksek, A, B1, B2 ve C vitaminlerince zengin, vücutta biriken asidi nötralize eden bir sebzedir. Fasulye baklalarında bulunan phasol ve phaseolin maddelerinin şeker hastalığında kullanılan insülin karakterinde olduğu ve bu yüzden kandaki şeker miktarının düşürülmesinde kullanıldığı, vücudun çalışmasını, gelişmesini ve tamirini sağlamanın yanı sıra pankreas bezini, böbrekleri, karaciğeri ve kalbi kuvvetlendirdiği bildirilmektedir (Anonim, 2008).

Leguminaceae familyasının bir üyesi olan fasulyenin önemli özelliklerinden bir diğeri ise toprakta bulunan *Rhizobium* bakterileri ile ortak yaşamak suretiyle atmosferde %78 oranında bulunan moleküler azotu toprağa bağlamalarıdır. Bu durum azotlu gübre kullanımını azaltmakta ve kendinden sonra ekilecek bitkinin verimini olumlu yönde etkilemektedir. Biyolojik azot fiksasyonu ile toprağa yıllık 139–170 milyon ton saf azot bağlanmaktadır. Bu miktar ticari olarak üretilen (65 milyon ton) azotla karşılaştırıldığında iki katına denk gelmektedir (Halitligil ve ark. 2002).

Fasulye, yemeklik tane baklagiller arasında ekim alanı ve üretim bakımından dünyada ilk sırayı almaktadır. Ülkelere göre ekim alanı ve üretim durumlarına bakıldığında; Hindistan'ın ilk sırada yer aldığı izlenilmektedir. Kuru fasulye tarımı, gelişmekte olan ülkelerde yaygın olmasına karşın, verimi gelişmiş ülkelerde daha yüksektir. En önemli kuru fasulye ihracatçı ülkeler ise sırasıyla; ABD, Çin ve Myanmar'dır (Anonim,1997). Dünya kuru fasulye ekim alanı 26,9 milyon ha, üretim miktarı 18,7 milyon ton ve verimi 69,53 kg/da'dır. Ülkemizde ise ekim alanı 1.290.515 da, üretimi 195 bin ton ve verimi ise 152 kg/da'dır (Anonim, 2009b).

Ülkemizde en fazla üretimi yapılan sebze türlerinden birisi olan fasulyenin hem sahil, hem de iç bölgelerimizde yetiştiriciliği yapılmaktadır ve 1000 m² den daha yukarılarda kolaylıkla yetişmektedir. Üretim genellikle açık tarla şartlarında sırk ve bodur tiplerle yapılmaktadır. Fasulye hem taze hem de kuru olarak değerlendirildiği gibi konserve edilerek, dondurularak, güneşte ve yapay yollarla yeşil olarak kurutularak da tüketilmektedir. Ülkemizde yetiştirilen fasulyelerin hemen tamamı *Phaseolus vulgaris* türü içinde yer alır (Anonim, 2008a).

Tohum, tarımsal girdiler içinde en önemli bitkisel üretim materyali olarak kabul edilmektedir. Dünyada yılda tahminen 127.400.000 ton tohumluk kullanıldığı ve bu miktarın parasal değerinin 40–50 milyar dolar olduğu bildirilmektedir. Bazı tahminlere göre; ticari amaçlı tohum üretimi ise yaklaşık 30 milyon dolarlık bir paya sahiptir (Erkan, 1998).

Fasulyelerde görülen bakteriyel hastalıklar öncelikle tohum kaynaklı olarak ortaya çıkmakta, önemli kalite ve kantite zararına sebep olmaktadır. Bu etmenler içerisinde en yaygın ve tahripkâr olarak belirlenenleri *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*, *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*'dir.

Pseudomonas syringae pv. *phaseolicola* ((Burk.) Young ve ark.) isimli hastalık etmeni serin ile orta derecede sıcak ve nemli ortamlarda ve yaralanmış bitkilerde daha fazla ortaya çıkmaktadır. Patojen infekteli bitki artılarında canlı kalmakta ya da tohumda canlılığını sürdürmektedir. Tohumla taşınabilen bu hastalık uygun epidemi koşullarında ve hassas çeşitlerin ekildiği bölgelerde %100'e varan zararlar meydana getirebilmektedir (Anonim, 1993). *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* etmeni bodur ve çalı fasulyelerde önemli zararlar oluşturmaktadır. Kuzey Amerika'da birçok çeşidin bulunduğu bölgelerdeki bazı kültürlerin hale yanıklığına karşı dayanıklı olduğu saptanmıştır. Avrupa'daki çeşitler ise çok duyarlı olup bu bölgedeki çalı fasulyelerinde önemli zararlara neden olmuştur. %0.4 oranında bir enfeksiyon durumunda; %34 kapsül ve %12.5 ürün zararı belirlenirken, %2.6'lık enfeksiyon kaynağı bulunduğunda ise, %62.5 kapsül ve %43 ürün zararı olduğu rapor edilmiştir (Smith, 1986). Bakterinin meydana getirdiği tane kayıpları Michigan'daki araştırma tarlalarında %23–43 oranında değişmektedir (Schwartz, 1989). Ankara Zirai Mücadele Enstitüsü ve Eskişehir Geçit Kuşağı Araştırma Enstitüsü tarafından yapılan çalışmalarda Niğde, Nevşehir, Afyon, Eskişehir, Bursa yörelerinde %50 lere varan zararı tespit edilmiştir (Benlioğlu ve ark, 1991).

Enfekteli bitki artıkları ya da tohumlarda olumsuz koşulları geçiren bakteri çimlenmekte olan sürgünler ve tohumlar üzerinde çoğalmakta ve rüzgâr, yağmur ve sulama suyu ile etrafa dağılmaktadır. Hastalık etmeni bitki yaprakları üzerinde hastalık meydana getirmeksizin epifitik olarak kalabilir ve daha sonra uygun ortamını bulduğunda hastalığı başlatabilir. Bakteriyel hale yanıklığı sıcaklık orta ya

da serin ve nemin yüksek olduğu ortamlarda şiddetli belirtiler oluşturmaktadır. Ayrıca sertifikasız tohumların kullanılması da hastalığın ortaya çıkmasında asıl faktör olabilir.

Günümüzde, insan, hayvan ve bitkilerde görülen hastalıkların tanısında genellikle hastalık belirtileri, patolojik bulgular ve etmenlerin izolasyonu yanında daha çok immunolojik yöntemler ile teşhise yardımcı olan diğer testlerden faydalanılmaktadır. Bu klasik tekniklerle bazı hastalıkların teşhisi yüksek oranda doğrulukla yapılabilmesine karşın birçok hastalık etmenlerinin tanısı ya çok zaman almakta ya da kesin sonuçlar vermemektedir. Bu nedenle son 5–10 yıl içinde uygulamaya konulan nükleik asit temelli tekniklere dayalı teşhis ve tanı yöntemleri erken, kesin ve güvenilir sonuçlarıyla oldukça yararlı olmaya ve klasik tekniklerin boşluklarını doldurmaya başlamıştır. Özellikle PCR gibi bazı teknikler patojenin tek bir hücrenin bile tespitine ve tanılanmasına olanak vermektedir.

Çalışmamızda ülkemiz için önemli tarımsal ürünlerden biri olan fasulye bitkisi tohumlarıyla taşınan ve büyük zararlara sebep olan önemli bir bakteriyel patojen olan *P. s. pv. phaseolicola*'nın İç Anadolu Bölgesinde kesin tanısının biyokimyasal ve moleküler düzeyde yapılarak, tohumlarda bulaşıklılık durumunun belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Fasulye (*Phaseolis vulgaris*, *Phaseolus*, *Leguminosae*) bir sıcak iklim bitkisidir. Uygun çimlenme sıcaklığı 18–20 °C olup toprak sıcaklığının 8–10 °C olması istenir. En uygun büyüme sıcaklığı 20–25 °C dir. Fasulye toprak isteği olarak tınlı, kumlu-tınlı ve derin yapıdaki organik maddece zengin toprakları sevmektedir. Bölgemizde 1–15 Mayıs arası en uygun ekim zamanıdır. Ayrıca bölgemizin ana ürününün buğday olmasından dolayı kuru fasulye buğday için mükemmel bir ön bitkidir. Kuru fasulye'den sonra ekilen buğdayda %20'lere varan verim artışı görülmektedir (Anonim, 2009a).

Fasulyelerde, kök çürüklüğü (*Fusarium solani* f.sp. *phaseoli*), antraknoz (*Colletotrichum lindemuthianum*), bakla ve sap yanıklığı (*Diaporthe phaseolorum*), kömür renkli çürüklük (*Macrophomina phaseolina*), mildiyö ve kök çürüklüğü (*Phytophthora phaseoli*), beyaz küf (*Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium rolfsii*), *Alternaria* yaprak lekesi (*Alternaria* spp.), gri küf, bakla çürüklüğü (*Botrytis cinerea*), pas (*Uromyces phaseoli*), adi yaprak yanıklığı (*Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*), hale yanıklığı (*Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*), bakteriyel benek (*Pseudomonas syringae* pv. *syringae*), bakteriyel solgunluk (*Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*), Fasulye Yaygın Mozaik Virüsü (Bean common mosaic virus), Börülce Hafif Benek Virüsü (Cowpea mild mottle virus), Hiyar Mozaik Virüsü (Cucumber mosaic virus), Fasulye Güney Mozaik Virüsü (Southern bean mosaic virus), Soya fasulyesi mozaik virüsü (Soybean mosaic virus) önemli hastalık etmenleri olmalarının yanısıra bozkurt (*Agrotis* spp.), telkurdu (*Agriotes* spp.), tohum sineği (*Hylemia cilicrura*), yeşil kurt (*Heliothis armigera*), fasulye kapsül kurdu (*Etiella zinckenella*), kırmızı örümcek (*Tetranychus* spp.) gibi zararlılarda görülmektedir (Erkan, 1998).

Birçok araştırmacı *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*, *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* ve *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*'in fasulye bitkisinde önemli patojenler olduklarını rapor etmiştir. (Goto, 1992; Vidaer, 1993; Hall, 1994; Howard ve ark., 1994; Agrios, 1997).

Kahverengi benek (*Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (Van Hall)), ve hale yanıklığı (*P. s.* pv. *phaseolicola*, (Burkholder) Young ve ark.) hastalıkları verim ve kaliteyi düşüren ciddi fasulye patojenleridir. (Webster ve ark., 1983; Zaumeyer ve ark., 1957).

Fasulyelerde *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (Burkholder) Young ve ark. isimli bakterinin sebep olduğu bakteriyel hale yanıklığı hastalığının, fasulyenin yaprak ve kapsüllerinde zararlı olduğu ve tüm dünyada görülen bu hastalığın, özellikle ılıman bölgelerde tahripkar zararlar meydana getirebildiği bildirilmiştir (Hagedorn ve Inglis, 1986, Saettler, 1994, Coyne ve ark, 1994).

P. s. pv. *phaseolicola*, bodur ve çalı fasulyelerinde önemli zararlar oluşturmaktadır. Kuzey Amerika'daki bazı kültürlerin hale yanıklığına karşı dayanıklı olduğu saptanmasına rağmen Avrupa'daki çeşitlerin hale yanıklığına karşı duyarlı olduğu ve bu bölgede çalı fasulyelerinde önemli zararlara neden olduğu saptanmıştır (Smith, 1986).

Bitkilerde hastalık yapan bakteriyel patojenlerin tohumlarla taşınmasına ilişkin ilk kayıtlar, 1982 yılında Newyork'ta fasulye tohumlarında *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* adlı bakterinin tespitiyle olmuştur (Erkan, 1998).

Fasulye bitkisinde patojen olan bakteriler (*Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*, ve *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*) tohumla taşınması ve tohumda uzun süre yaşama kapasitesine sahip olması sebebiyle kontrolü zor olan etmenlerdir (Coyne ve Schuster, 1976).

Hastalığın ilk belirtileri başlangıçta yaprak altında görülen küçük ıslak lekeler şeklinde başlayıp bu kısımların zamanla kuruyarak küçük 3-6 mm çapında nekrotik lekeler dönüşmesi ve lekelerin etrafı bakteriyel toksin tarafından neden olunan oldukça geniş yeşilimsi sarı bir hale ile kuşatılması şeklinde ortaya çıkmaktadır. Bu kapsamda nispeten küçük leke etrafında gelişen geniş hale oluşumu ile adi yaprak yanıklığı hastalığının belirtilerinden ayırt edilebilir. Hastalık belirtileri enfeksiyonun ilerleyen döneminde artarak yaprağın tamamen sararması ve sararan yaprağın dökülmesi ile sonuçlanmaktadır. Sistemik olarak gelişen hastalık belirtilerinde hale oluşumuna rastlanılmayabilir. Hastalık belirtilerinin gözlemlendiği yaprakların arasında kalan yapraklarda genel bir sararma gözlenirken bu yaprakların damarları koyu yeşil

renkte görülür. Meyve üzerindeki ıslaklıklar enfeksiyonun ilk döneminde küçük toplu iğne başı büyüklüğünde olup, enfeksiyonun ileri aşamasında bu ıslaklıkların ortasında dışarıya taşan açık sarı-krem renğinde bakteriyel akıntı oluşumlarına rastlanır ve geç dönemlerde bu alanlar kahverengileşerek içe doğru çökmüş nekrotik bir hal almaktadır. Krem rengindeki bakteriyel akıntı etmeni, sarı renkte akıntıya neden olan adi yaprak yanıklığı belirtilerinden ayırt edilmesine yardımcı olur. Hastalık etmeni aynı zamanda gövde de sistemik enfeksiyon sonucu belirtilere neden olabilir. Tipik ıslak lekeler ile başlayan ve uzunlamasına kırmızımsı çizgilere dönüşen gövde belirtileri ilerleyen dönemlerde kuruyup nekrotikleşmesi sonucu gövdelerde kırılmalar oluşabilir (Saygılı ve ark., 2008).

Serin ve yağışlı iklim koşulları, hastalığın yayılması ve enfeksiyon şiddetinin artması için çok uygundur. Etmen, bitki tohumunu da enfekte edebilmekte olup, çoğu kez hastalıklı tohumlar primer enfeksiyon kaynağı olarak hastalığın ortaya çıkmasına neden olur (Smith, 1986).

Bulaşık tohumluk ve hastalıklı bitki artıkları etmenin inokulum kaynaklarıdır. Bakteri, bulaşık bitki artığından sağlıklı bitkilere yağmur damlalarının sıçraması veya toprak partiküllerinin rüzgârla taşınması ile bulaşır. Patojen, bitkiye yüksek nem koşullarında veya bitki yüzeyinde serbest su bulunduğu durumlarda, stoma ve hidatod gibi doğal açıklıklardan veya doğrudan yaralardan giriş yapabilir. Hale yanıklığı hastalığının düşük sıcaklıklarda daha iyi geliştiği düşünülmektedir. 18–22 °C sıcaklıklarda epidemi gerçekleştirme riski daha fazladır (Hagedorn ve Inglis, 1986; Saettler, 1994).

Orantılı nem ve fasulye çeşitleri etmenin yaşamında etkilidir. Bulaşık tohumlarda bakteri 2–12 yıl canlılığını koruyabilir. Yine çeşitli araştırmacıların çalışmaları sonucunda fasulye tohumlarında, *X. c. pv. phaseoli* 15 yıl, *Pseudomonas syringae pv. phaseolicola* nın 2–3 yıl canlılığını sürdürdüğü belirlenmiştir (Agarwal ve ark., 1997; Maude, 1996).

P. s. pv. phaseolicola adlı bakteriyle bulaşık olan fasulye tohumlarının kontrollü koşullarda (7–10 °C sıcaklık ve % 40–50 oransal nem) depolanması halinde 6 yıl süreyle bakteri canlılığını devam ettirebilir (Zapata ve ark., 1985).

Birçok araştırmacı tarafından *P. s. pv. phaseolicola* ile tek pratik m¼cadelenin hastalıksız tohum kullanımını olduğu bildirilmektedir (Schaad, 1989).

P. s. pv. phaseolicola'nın esas konukçusu fasulyedir. Üretimi yapılan çeşitler içinde duyarlıların yanında, dayanıklı ve tolerant olanları da vardır. Fasulye dışında bazı yemlik baklagiller de etmenin konukçuları arasındadır. Patojenin konukçuları içerisinde *Vigna angularis*, *Phaseolus lunatus*, *V. radiata*, *P.coccineus*, *P.acutifolius*, *Glycine max*, *Macroptilium atropurpureum*, *M. bracteatum*, *Cajanus cajan*, *P. polyanthus*, *P. radiatus*, *P. bracteatus*, *P. polystachyus*, ve *Pueraria lobata* yer almaktadır (Saettler, 1989; Goto, 1992; Hall, 1994).

Simptom göstermeyen tohumların enfekteli olabileceği tespit edilmiş ve *P. s. pv. phaseolicola*'nın %50 oranında simptom sergilemeyen tohumla taşındığı saptanmıştır (Goto, 1992).

Ertuğrul ve Güven (1998); Epton ve Deverall (1965), Guthrie ve Fenwick (1967) ve Patel ve Walker (1965), *Pseudomonas syringae pv. phaseolicola*'nın ABD ve İngiltere'de 1 ve 2 nolu ırklarının bulunduğunu; Anonim (1986)'ya göre ise 3 nolu ırkının ise Kolombiya'da CIAT (Centro International de Agricultural Tropical) tarafından belirlendiği bildirilmektedir.

1991–1996 yılları arasında Güney Afrika'da fasulye üretimi yapılan yerlerden 1128 bakteriyel izolat izole edilmiş ve bunların 967'sinin *P. s. pv. phaseolicola* olduğu tespit edilmiştir. Farklı fasulye varyetelerinde, elde edilen izolatlar test edilmiş ve *P. s. pv. phaseolicola*'nın 1, 2, 4, 6, 7, 8 ve 9 ırklarının olduğu belirlenmiştir (Faurie, 1998). Araştırmalar *P. s. pv. phaseolicola* ırklarının virölanslığında farklılıklar olduğunu ve bunun sonucu olarak da *P. vulgaris* bitkileri üzerinde neden oldukları hastalık gelişiminde farklılıklar sergilediklerini göstermiştir (Zaiter ve ark., 1989).

P. s. pv. phaseolicola strainleri arasındaki patolojik farklılık ise ilk kez 1934'te Nebraska'da ortaya konulmuştur. Koloni tipindeki değişiklikler saptanmış, düz ya da kabarık konilere sahip *P. s. pv. phaseolicola* strainlerinin serolojik olarak da farklılıklar gösterdiği tespit edilmiştir. Virölanslığın açıklanmasında yeterli olmamakla birlikte kabarık kolonili bakterilerin düz olanlardan daha zayıf virölanslık sergilediği belirlenmiştir (Schuster ve Coyne, 1981).

Karaca (1977), hale yanıklığı hastalığının Türkiye’de ilk kez Karadeniz Bölgesi ve Bursa yöresinde saptandığını bildirmektedir. Hastalığın aynı zamanda Niğde, Nevşehir, Afyon ve Eskişehir yörelerinde %50’ye yaklaşan oranlarda verim kayıplarına neden olduğu bildirilmiştir (Benlioğlu ve Özakman, 1991).

Ülkemizde ayrıca 1988–1991 yılları arasında fasulye üretimi yapılan 24 farklı bölgeden toplanan 293 fasulye tohumu test edilerek bakteriyel hastalık etmenleri ile bulaşıklılığı test edilmiştir. Test edilen tohumlardan 11 tanesinin *P. s. pv. phaseolicola* nın 1 nolu ırkı ile, 24 tohumun ise etmenin 2 nolu ırkı ile bulaşık olduğu belirlenmiştir (Benlioğlu ve ark. 1994).

Ülkemizde, Ege Bölgesinde yemeklik baklagillerde görülen bakteriyel hastalıkların tespiti ve mücadelesi için yapılan çalışmalarda *P. s. pv. syringae*, *P. s. pv. phaseolicola*, *X. c. pv. phaseoli* etmenleri belirlenmiş olup özellikle son iki etmenin önemli düzeylerde ekonomik kayıplara neden oldukları belirlenmiştir (Demir ve Gündoğdu, 1994).

Ertuğrul ve Güven (1998), Eskişehirdeki fasulye ekim alanlarından toplanan 36 fasulye tohumunda *P. s. pv. phaseolicola* bakterisini aramışlar ve yaptıkları izolasyon sonrasında 120 floresan bakteriyel izolat elde etmişlerdir. Uyguladıkları biyokimyasal testler sonrasında strainlerin 92 sini *P. s. pv. phaseolicola*, 26 sını *P. s. pv. syringae* ve 2 tanesini *P. viridiflava* olarak tanılamışlardır.

P. s. pv. phaseolicola uygun koşullarda ve hassas çeşitlerin ekildiği bölgelerde %100 e varan hasarlar meydana getirebilmektedir (Anonim, 1993). Enfekte olmuş tohumlar enfekte olmuş fideleri verirler fakat bunlar genellikle üründe bulunan fidelerin toplam miktarına göre azdır. Bu primer enfeksiyondan sonra hastalığın yayılışı yağmur sularıyla, genellikle rüzgarın egemen olduğu yöndedir. Amerikada bir primer enfeksiyon kaynağından 26 metre kadar uzakta yeni enfeksiyonlar kaydedilmiştir (Schwartz, 1989).

16.000 bitkide 1 enfekte olmuş bitki, uygun epidemi koşullarında ürünün tamamının kaybı için yeterli olduğu bildirilmiştir (Guthrie ve ark., 1965).

P. s. pv. phaseolicola nın meydana getirdiği tane kayıpları Michigan’daki araştırma tarlalarında %23–43 oranında değişmektedir. Kesin rakamlar olmamasına karşın, verimde meydana gelen ürün kayıpları ortalama %10 ile %50 arasında değişmektedir (Schwartz, 1989).

Güven (2000) tarafından, Eskişehir’de çeşitli fasulye üretim alanlarından toplanan 86 *P. s. pv. phaseolicola* izolatu, bakteriosin üretme yeteneğine göre tiplendirilmiştir. Test edilen tüm izolatlar bakteriosin üretmiş ve 24 bakteriosin grubu test edilmiştir. Bakteriosin grupların ve strainlerin coğrafik orjinleri arasında bir ilişki bulunamamıştır.

Tarla şartlarında yapılan bir çalışmada, *P. s. pv. syringae* ve *P. s. pv. phaseolicola* nın toksin üretmeyen strainlerinin toksin üretenlere göre daha az virulent olduğu rapor edilmiştir. Bu sonuç patojenite için toksin üretiminin ön şart olduğunu göstermiştir (Schuster ve Coyne, 1981).

P. s. pv. phaseolicola da phaseolotoxin üretimi sıcaklığa bağlıdır. Toksin üretimi 18-20°C’de optimum iken 30°C’de saptanabilir miktarlarda olmadığı belirlenmiştir (Goss, 1940; Staskawicz ve Panopoulos, 1979).

Fasulye çeşitlerinde bakteriyel patojenlere karşı tolerans kaynaklarının farklılık sergilediği gözlemlenmiştir. İlk olarak 1942’de hale yanıklığına dayanıklı genotip olarak Red Mexican tanımlanmış, 1955’de ise Ferguson ve ark., bitkide bu dayanıklılığın kırıldığını tespit etmişlerdir. 1964’de *P. s. pv. phaseolicola* nın yeni bir ırkı tanımlanmış ve Red Mexican UI3’ün ırk 1’e dayanıklı, ırk 2’ye hassas olduğu belirlenmiştir. *P. s. pv. phaseolicola* strainlerinin Red Mexican üzerinde küçük halesiz lekeler, Red Kidney üzerinde ise tipik haleli lezyonlara neden olduğu saptanmıştır (Schuster ve Coyne, 1981).

Tohum sağlığı testlerinde, genel olarak tohumlar akan musluk suyunda yıkandıktan sonra saprofitik mikroorganizmalardan arındırmak amacıyla tohumlar %2’lik NaOCl’de 6 dk tutulur ve saf su ile durulanır. Ekstraksiyon için tohumlar fosfat buffer saline ya da likid yarı seçici besiyerine konur ve 3 saat oda sıcaklığında bekletilir. Saprofitik kontaminasyonu önlemek amacıyla 2–3 saat kadar +5 °C’de bekletilmesi önerilmektedir (Van Vuurde ve ark., 1983; Saettler, 1989).

Fasulye tohumlarında *P. s. pv. syringae* için, King B, *P. s. pv. phaseolicola* için MSP (Media syringae phaseolicola) yarı seçici besiyerleri kullanılmaktadır. Etmenler, 20 saat boyunca ve 5°C de % 0.01 Tween–20 içeren 3 L steril salin solüsyonu içinde bekletilen 1 kg tohumdan izole edilebilmektedir (Mohan ve Schaad, 1987).

Fasulye tohumlarından diğerk bir izolasyon, tohum örneklerinin 3 L SST (Steril Salin Tampon) içinde 5°C’de 20 saat boyunca bekletilmesidir (sabit soğuk ekstraksiyon). Her süspansiyon steril bir cam çubukla karıştırılıp 150 ml’lik numune örneği alınmış, alınan bu örneğin 100 ml’lik kısmı 10 dakika boyunca 12000 g’de santrifüj edilmiş ve pellet, 10 ml steril saline (%0.85 NaCl) ile dilüye edilmiştir. MSP (Media syringae phaseolicola) ve King B besiyerlerine ekimi yapılan bakteriler oda sıcaklığında (23±2 °C) 3-4 gün inkübe edilmişlerdir (Sands ve ark., 1980).

Geliştirilmiş bir “tohum ıslatma” analiziyle yeni bir yarı-seçici besi yeri (MSP) uygulamasının birleşimi fasulye tohumlarındaki *P. s. phaseolicola*’nın tespitinde büyük ilerleme kaydedilmesini sağlamıştır (Mohan ve Schaad, 1987). Fakat MSP (Media syringae phaseolicola) besi yeri uygulandığında bile, bazı tohumlarda *P. s. phaseolicola* kolonilerini diğerk florasan *Pseudomonas* türlerinden ayırmak zor olabilmektedir. Böyle durumlarda patojenin onaylanması için ilave biyokimyasal ve patojenik testler gerektiğini bildirmişlerdir (Sands ve ark., 1980).

Yüksek oranda saprofit bakteri popülasyonu barındıran tohum gruplarında *P. s. phaseolicola*’nın ayrımı zorlaşabilmekte, *P. s. pv. syringae*’nin varlığında ise ayrımı mümkün olmamaktadır. Bu iki patojeni birbirinden ayırt etmek oldukça zahmetli ve pahalı biyokimyasal ve patojenik testleri zorunlu kılmaktadır. Bu sebeple, söz konusu patojene özel, yüksek hassaslıkta bir tanı yöntemine büyük ihtiyaç duyulmaktadır. Daha önceden geliştirilmiş olan mikrobiyolojik analizin düzenlenmesine (Staskawicz ve Panopoulos, 1979) ek olarak MSP agara bakteri ekimi ve bunlara yönelik testlerle (Jansing ve Rudolph, 1990) diğerk metodlara karşı kaydedeğer bir üstünlük sağlanmıştır. Fakat bu metod, tohum grubundaki konukçu bitki ve saprofitlerin patojene oranının yüksek olduğu durumlarda kullanışlı olmayabileceği bildirilmiştir.

Van Vuurde ve ark. (1983), *P. s. pv. phaseolicola*’nın teşhisi için 4–24 saat fasulye tohumlarının inkübasyonunu kıyaslamışlardır. 24 saatte, 4 saatten fazla patojen hücresi görülmesine rağmen tüm teşhiste hassasiyet 4 saatte çok daha iyi olmuştur (Saettler, 1989).

P. s. pv. phaseolicola, 0,5–1,0 x 1,5–4,0 µm boyutlarında, düz veya hafif kavisli, bir veya birden fazla polar kamçılı, gram negatif karakterde bir bakteridir. King B ortamında yeşil fluorescent pigment oluşturması karakteristik özelliğidir.

Optimum gelişim sıcaklığı 25–30 °C, maximum 36–37 °C, minimum ise 2–3 °C'dir. DNA'nın G+C yüzdesi 58–71 mol'dür. (Schaad ve ark., 2001, Lelliott and Stead, 1987).

P. s. pv. phaseolicola'nın tanımlanmasında, levan oluşumu, oxidase reaksiyonu (Kovacs, 1956), pektolitik aktivite testi (Kovacs, 1956), arginine dihidrolase testi (Thornley, 1960), karbon kaynaklarının kullanımı, King B besiyerinde gelişim, arbutin hidrolizi, jelatin hidrolizi, nitrat indirgenmesi, L(+) Arginine dehidrolaz aktivitesi, H₂S üretimi, tütün yaprağında aşırı duyarlılık reaksiyonu (Klement, 1963) ve diğer bazı spesifik biyokimyasal testler (Klement ve ark., 1990; Lelliott ve Stead, 1987; Schaad, 2001) esas alınmaktadır.

Patojenisite testlerinde fasulye bitkisi (Canadian Wonder) tohumları plastik saksılara dikilmiş ve 10 gün boyunca serada muhafaza edilmiştir. Etmen King B besiyerinde 48 saat geliştirilmiş ve yoğunluğu aşağı yukarı 10⁸ hücre/ml olacak şekilde ayarlanmıştır. İki inokulasyon tekniği uygulanmıştır. Birinci yöntem, bakteriyel süspansiyonu yaprak yüzeylerine sprey ucunu 10–15 cm de tutularak püskürtülmesinden ibarettir. İkinci yöntem ise bitki yapraklarını yavaşça az miktarda karborandum (silikon karbür) tozuyla aşındırarak ve bakteriyel süspansiyonla ovalayarak yaralamaktan ibarettir. Aşılama sonrası, bitki polietilen torbalara konmuş ve 20°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. Torbalardan çıkartılan bitkiler büyüme odasında hastalık belirtileri görünene kadar 10 gün bekletilmiştir (Güven ve ark., 2004).

Son yıllarda özellikle 1980'li yılların başından itibaren nükleik asit karakterizasyonu, moleküler klonlama, sekans analizi, rekombinant teknolojisi ve genetik materyaller üzerindeki çalışmalar, nükleik asit tabanlı problemlerden yararlanma olanakları giderek artmıştır. Ayrıca prokaryotik ve ökaryotiklerin genomlarındaki modifikasyonlar, restriksiyon analizleri ve sistemleri üzerinde de son zamanlarda yoğun çalışmalar yapılmaktadır. 1985 yılında DNA veya RNA baz sıralarının sayısal olarak artırılması (amplifikasyon) teknolojisine dayanan dolayısıyla mevcut yöntemlerle analiz edilebilmelerini sağlayan Polimeraz Zincir Reaksiyonu'nu geliştirilmiştir (Dönmez, 2004).

PCR'in geliştirilmesi, moleküler teknolojinin ve aynı zamanda kullanım alanının da genişlemesine yol açmıştır. PCR son yıllarda enfeksiyöz etmenlerin

teşhisinde, epidemiyolojide, genetik defektlerin saptanmasında ve diğer alanlarda geniş bir uygulama ortamı bulmuştur. PCR, izole edilen veya patolojik materyallerde bulunan hedef genetik materyallerin (DNA veya RNA) spesifik kısa zincirli oligonükleotit primerler yardımı ile enzimatik olarak sayısal çoğaltılması (amplifikasyon)'dır. Bu hedef genetik materyal çok az sayıda hatta birçok veya sayısız diğer veya ilgisiz DNA'lar arasında olsa bile çoğaltılabilir ve homojen bir DNA materyali haline getirebilir ve kolayca identifiye edilebilir. PCR solüsyonu, aranan hedef DNA sekansları, iki tür spesifik oligonükleotid primerleri (15–30 bazlık tek iplikçikli), DNA polimeraz enzimi (ençok kullanılan Taq polimeraz) ve dört tür dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) şeklinde hazırlandıktan sonra hedef DNA'nın denatürasyonu, primerlerin bağlanması, polimerizasyon, amplifiye edilmiş ürünlerin saptanması aşamaları ile tanıya gidilmektedir (Arda, 1994).

Birçok obligat fungal ve bakteriyel mikroorganizmaların ve kültür ortamında çoğaltılmayan patojenlerin oluşturduğu hastalıkların teşhisi, güvenilirliği yüksek bir metod olan PCR ile kolayca yapılabilmektedir (Arı, 1999).

PCR, tohum saflığının belirlenmesinde, çeşitli türlerin tanısında ve türler arasındaki genetik akrabalığın belirlenmesinde kullanılmaktadır (Ponsonnet ve Nemse 1994; Leite ve ark., 1995; Pascua ve ark., 1995; Santos ve ark., 1997; Pastrik ve Rainey, 1999; Maddox, 1998; Arı 1999; Hyman ve ark., 2000).

Audy ve ark., (1994 ve 1996), fasulyede hastalığa neden olan *X. c. pv. phaseoli* ve *P. s. pv. phaseolicola* nın tanılanmasında PCR in oldukça spesifik sonuç verdiğini tespit etmişlerdir.

X. c. pv. phaseoli ve *P. s. pv. phaseolicola* patojenleri ile kontamine olan fasulye tohumlarında, bakterilerin belirlenmesinde PCR metodunu başarılı bir şekilde kullanmışlardır (Maes, 1993; Slack ve ark., 1996; Hartung ve ark., 1998, Schneider ve ark., 2002).

Patojen-konukçu arasındaki uyumlu reaksiyonu kodlayan bazı genler (Patojenisite, virülanslık, avirülenslık, toksin, enzim ve hormon üretimini kodlayan) vardır. Farklı patojenlerde bu tür genlerin baz dizilişleri, genlerin kromozom üzerindeki dağılımları ve tekrarlanma sıklıkları hakkında elde edilen genetik bilgiler patojenin kimliğini açıklamaktadır. O nedenle yukarıda bahsedilen genlerden bir veya bir kaç için spesifik olarak sentezlenen oligonükleotit primerler yardımı ile

farklı patojenlerden izole edilen genetik materyaller PCR ile kolayca amplifiye edilmektedir. Elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jel üzerinde elektroforez edilmesiyle patojene spesifik bant veya bant profilleri belirlenerek hastalığa neden olan etmenin tanısı ve aynı zamanda da hastalığın teşhisi yapılmaktadır (Miller ve Joaquim, 1993).

Peet ve ark., (1986); Schaad (1989); Prosen ve ark. (1991, 1993); Schaad ve ark. (1995) fasulyelerde tohumla taşınan *P. s. pv. phaseolicola* ve *P. s. pv. syringae*'nin PCR ile tanısı üzerinde araştırmalar yapmışlar ve modifiye edilmiş farklı metodlar ortaya koymuşlardır.

Schaad, (2001) *X. c. pv. phaseoli*, *P. s. pv. phaseolicola* ve *P. s. pv. syringae* için spesifik DNA primerlerini bildirmiş.

Lydon ve Pattreson (2001), *P. syringae* nin tabtoxin üreten strainlerini tanılamak ve diğer bitki patojeni *P. syringae* türlerinden ayırmak için PCR yapmışlardır. Bu amaçla 32 *P. syringae* strainini incelemişler, tabtoxin üretiminden sorumlu olan *tblA* ve *tabA* genlerini amplifiye etme için 2 primer seti geliştirmişlerdir. *P. syringae* pathovarlarından tabtoxin üreten hücrelerden yaptıkları PCR sonucunda 829 bp veya 1020 bp lik amplikon elde etmişlerdir. Tabtoksin üretmediği bilinen bakteri türlerinde ise aynı primerlerle DNA amplifikasyonunun başarısız olduğunu ispatlamışlardır. PCR metodu ile *P. syringae* strainlerinden tabtoxin üretenleri, bunlarda da *P. s. pv. tabaci* strainlerini güvenilir bir şekilde ayırabilmişlerdir.

Hastalıklı fasulye tohumlarında *P. s. phaseolicola*'nın tespitinde phaseolotoksin gen bölgesinden elde edilen 2.6 kb lık DNA parçasının bulunduğu bölgenin PCR amplifikasyonunun yapılmasının yüksek hassaslıkta bir metod olduğunu bildirmişlerdir (Prosen ve ark., 1990a, Prosen ve ark., 1990b).

Louws ve ark., (1994) araştırmalarında *P. s. pv. phaseolicola*'nın RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA), RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) ve nested PCR analizleri ile farklı bölgelerde ve farklı materyaller üzerinde ırk düzeyindeki farklılıklarını ortaya koymuşlardır.

Schaad ve ark. (1995), fasulye tohumlarında *P. s. pv. phaseolicola*'nın belirlenmesi amacıyla yaptıkları çalışmalarda klasik PCR metodu yerine uygulamış oldukları BIO-PCR metodunun, tohum üzerindeki ölü hücrelerin varlığından

kaynaklanan pozitif sonuçları önlemesi, tohum ekstraktlarında bulunan potansiyel PCR engelleyici maddelerin varlığının elimine edilmesi, hastalık etmeninin belirlenmesinde hassasiyetin artışı ve amplifikasyon için DNA'nın ön ekstraksiyonuna ihtiyaç olmayışı inhibitörlerin etkilerinin azaltılması gibi bazı önemli ve üstün özelliklerinden bahsetmişlerdir.

Tohumlarda bakteriyel patojenlerin saptanması çoğu zaman zor olmaktadır çünkü hedef organizma popülasyonu diğer bakterilerin miktarına göre genellikle daha azdır. Klasik izolasyon yöntemleri, örneklerin sadece birkaç tane hedef organizma ve yüksek miktarda diğer bakteriler içerdiği durumlar haricinde çok hassastır (Schaad, 1989). Serolojik teknikler ise hızlı ve ucuz olmasına rağmen genellikle duyarlılık ve özgüllükten yoksundur (Hampton ve ark., 1990). PCR teknolojisindeki yeniliklerle diğer birçok organizmaların bulunduğu durumlarda bile az sayıdaki hedef mikroorganizmanın saptanmasında ciddi ilerleme kaydedilmiştir. Klasik PCR yönteminin duyarlılığı, nested PCR ile arttırılabilir (Schaad ve ark., 1995). Ancak, PCR yönteminde doğadan alınan bitki örneklerinde sıklıkla karşılaşılan PCR inhibitörleri ve az miktarlarda örnek gerekliliğinden ortaya çıkan oldukça düşük duyarlılık gibi birkaç tane sınırlayıcı etken bulunmaktadır (Rossen ve ark., 1992; Prosen ve ark., 1993; Schaad ve ark., 1999; Weller ve ark., 2000). Teşhisin duyarlılığı İmmunomanyetik Ayırıştırma (Immunomagnetic separation, IMS-PCR) (Skjerve ve Olsvik, 1991; Fratamico ve ark., 1992; Van de Wolf ve ark., 2000) ya da PCR'ın zenginleştirilmesi (BIO-PCR) (Schaad ve ark., 1995; Ito ve ark., 1998; Weller ve ark., 2000) gibi metodlarla daha da arttırılabilir. Her iki teknik de PCR inhibitörlerinin etkisini azaltmakla beraber, BIO-PCR hedef organizmanın yaşayabilen kültürünün iyileşmesi avantajını da sağlar. Bu teknik, genel ya da yarı-seçici besiyerinde (agar ya da sıvı besiyeri) gerçekleştirilen biyolojik amplifikasyon ile doğrudan PCR yöntemini birleştirir. DNA izolasyonuna gerek olmadığı gibi, hedefin yoğunlaştırılması için gerekli olan santrifüj etme aşamasına da ihtiyaç yoktur.

BIO-PCR'ın, klasik agar besiyeri yöntemlerine göre temel bir avantajı vardır. Çoğu zaman yüksek miktarlarda bulunan diğer organizmalar, hedef organizma tanımlanmadan hızlıca büyürken, bu durum BIO-PCR'da görülmez; çünkü hedef organizmanın kolonileri gözle görülür büyüklüklere ulaştıklarında ve saprofit

kolonileri de çok büyümemişken hedef organizmalar hemen toplanır. BIO-PCR'ın duyarlılığı (genellikle her numune için koloniyi oluşturan birimlerde ortalama 5–10 hücre/mL) klasik PCR yönteminden 10–100 kat arası fazlalık gösterebilir. (Schaad ve ark., 1995; Ito ve ark., 1998; Schaad ve Frederick, 2002). Ancak bu duyarlılık seviyesi bile, dokular üzerinde genelde çok az sayıda bulunan, bitki patojeni bakterilerinin saptanması için yeterli değildir (Webster ve ark., 1983; Özakman ve Schaad, 2003).

3. MATERYAL VE METOD

Materyal

Bitki materyali

Çalışmamızın ana materyalini İç Anadolu Bölgesindeki fasulye ekiliş alanlarındaki Karaman ve Çankırı illeri hariç 12 ilden toplanan fasulye tohumları oluşturmuştur. İç Anadolu Bölgesinde örnek toplanılan iller Şekil 3.1’de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. İç Anadolu Bölgesinde fasulye örnekleri elde edilen iller

3.1.2. Referans kültürler

Denemelerde kullanılan orijinal *P. s. pv. phaseolicola* kültürlerinden PSP6 Warwick University İngiltereden, NCPPB52 (National Collection of Plant Pathogenic Bacteria) Prof. Dr. Kıymet Güven (Anadolu Üniversitesi)’den elde edilmiştir.

3.1.3. Çalışmada kullanılan laboratuvar alet ve ekipmanları

Hastalıklı tohumlarından patojen mikroorganizmaların izolasyonu ve tanımlanmaları için laboratuvar malzemeleri (petri kabı, beher, erlen, cam baget, lam,

lamel, cam tüp, pipet, piset, ze), kimyasallar (alkol, sodyum hipoklorid, besiyerleri) kullanılmıştır.

Çalışma esnasında santrifüj, otoklav, inkübatör, termalcycler, elektroforez sistemi, jel görüntüleme sistemi, ısıtıcılı çalkalayıcı, otomatik pipetler, magnetik karıştırıcı, pH metre, derin dondurucu, hassas terazi, buzdolabı, saf su cihazı, mikrodalga fırın, buz makinesi, kullanılmıştır.

Ayrıca enfekteli fasulye tohumlarından bakteriyel mikroorganizmaların izolasyonu ve koloni gelişimlerinin sağlanması için çeşitli kimyasallar ve besiyerleri kullanılmıştır.

3.2. Metod

3.2.1. Örnekleme metodu

İç Anadolu Bölgesinde ekonomik anlamda fasulye ekimi yapılan ve bölgeyi temsil edecek şekilde belirlenen illerden fasulye tohumu örnekleri alınmıştır. Örnekleme;

100 ha ekiliş alanı için en az 3 örnek

100–1000 ha arası için her 100 hektar başına 1 örnek

1000 ha üzeri için her 200 hektar için 1 örnek

esasına göre planlanmıştır. Uluslar arası tohum testleme birliğinin International Seed Testing Association (ISTA) standartlarına göre her örnek partisi 500'er gram (1000 adet tohum) alınmıştır. Ancak bazı illerden planlandığı şekilde örnek sayısı elde edilemememiştir. Bu kriterlere göre; İç Anadolu Bölgesinde rnek alınan iller, ekiliş alanları ve verim (Anonim 2009b) elde edilen örnek sayısı izelge 1'de verilmiştir.

Çizelge 1. İç Anadolu Bölgesinde fasulye ekiliş alanları elde edilen verim ve örnekleme sayıları (Anonim, 2009b)

İl	Ekilen Alan (da)	Hasat Edilen (da)	Üretim (Ton)	Verim (kg/da)	Alınması planlanan örnek sayısı	Alınan örnek sayısı
Aksaray	27.670	27.670	4.346	156	14	20
Ankara	18.755	18.755	2.210	118	9	20
Çankırı	8.690	8.690	968	111	9	0
Çorum	15.355	15.355	1.747	114	8	11
Eskişehir	5.066	5.066	511	101	5	12
Karaman	48.840	48.840	13.836	283	24	0
Kayseri	14.060	14.060	2.442	174	7	23
Kırıkkale	1.334	1.334	195	146	1	16
Kırşehir	24.600	24.600	2.754	112	12	7
Konya	130.585	130.585	21.072	161	65	29
Nevşehir	7.050	7.050	918	130	7	9
Niğde	35.140	35.140	6.847	195	18	9
Sivas	6.010	6.010	755	126	6	9
Yozgat	11.323	11.323	1.308	116	6	10
Toplam	354.478	354.478	59.909	2.043	191	175

3.2.2. *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*'nın izolasyonu

Tohum örnekleri akan musluk suyuyla yıkandıktan sonra, fungal patojenler ve bazı saprofitik mikroorganizmalarla bulaşık olabileceği düşünülen örnekler %2'lik NaOCl'de 2 dk yüzey sterilizasyonu yapılmıştır. Tohumlar fosfat buffer saline(8 g NaCl, 0,2 g KH₂PO₄, 1.15g Na₂HPO₄, 0,2 g KCl /L, pH=7,4) içersinde 2–3 saat +5 °C'de ve ardından 3 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir (Saettler, 1989). İlk izolasyonlarda patojenin elde edilemediği tohum partilerine alternatif bir metod uygulanmıştır. Buna göre; tohum örneği 1,5 l steril suda yada %0,01 Tween 20'de +4 °C'de gece boyunca inkübe edilmiştir.

Elde edilen ekstraktların,

Nütrient Agar (NA)

	<u>gr/L</u>
• Beef ekstrakt	1
• Yeast ekstrakt	2
• Bakteriyolojik pepton	5
• NaCl	5
• Agar	15

pH=7,2

King B

	<u>gr/L</u>
• Proteose peptone	20,0
• K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	1,5
• MgSO ₄ .7H ₂ O	1,5
• Agar	15,0
• Glyserol	10
• Destile su	1

pH=7.2 (King ve ark., 1954)

MSP besiyerlerine 0,1 ml 10⁻⁴-10⁻⁶ dilüsyonlarda ekimi yapılarak, 23–25 °C’de inkübe edilmiştir (Schaad ve ark., 1995). Patojenin izolasyonunda kullanılan yarı seçici besiyerinin içeriği aşağıda verilmiştir.

MSP

	<u>g/L</u>
• Sakaroz	20.00
• Peptone	5.0
• K ₂ HPO ₄	0.5
• MgSO ₄ .7H ₂ O	25.0 mg
• Agar	20.0

pH= 7.2-7.4 ayarlanır bu besiyerleri otoklavda 121 °C’de 15 dakika boyunca otoklavda sterilize edilip, sterilize edilen besiyerleri 55 °C’ye kadar soğumaya

bırakılmıştır ve aşağıdaki antibiyotiler soğuk sterilizasyon yapılarak stok solusyonlardan eklenir.

	<u>L</u>
• Cycloheximide (100 mg/ml, %75 lik methanol)	2.0 ml
• Cephalexin (10 mg/ml, saf su)	8.0 ml
• Vancomycin (10 mg/ml, saf su)	1.0 ml
• Bromthymol blue (15 mg/ml, %95 ethanol)	1.0 ml

P. s. pv. phaseolicola kolonileri sarı ve kubbe şeklinde (levan pozitif) ve bir mavi floresan pigment üretir.

3.2.3. Patojenin tanısı

3.2.3.1. Koloni morfolojisi

İzolasyonu yapılan fasulye tohumlarından elde edilen bakteriyel süspansiyonlar 0.1 ml NA, King B ve MSP besiyeri üzerine yayılmış 23-25 ° C'de 48-72 saat inkübe edildikten sonra tek koloni gelişimi incelenmek üzere King B ve MSP besiyerine çizgi ekim yapılmış, koloni gelişimleri değerlendirilmiştir (Saygılı 1995).

3.2.3.2. Biyokimyasal testler

Pseudomonas syringae pv. *phaseolicola* için levan oluşumu, oksidaz reaksiyonu (Kovacs, 1956), pektolitik aktivite testi (Kovacs, 1956), arginine dihidrolaze testi (Thornley, 1960), karbon kaynaklarının kullanımı, King B besi yerinde gelişim, arbutin hidrolizi, jelatin hidrolizi, nitrat indirgenmesi, L(+) Arginine dehidrolaz aktivitesi, H₂S üretimi, tütün yaprağında aşırı duyarlılık reaksiyonu (Klement, 1963; Klement ve ark., 1990; Lelliott ve Stead, 1987; Mohan ve ark., 1987) yapılarak elde edilen fitopatojen bakterilerin biyokimyasal özellikleri belirlenmiştir. Her bir test aynı şartlarda 3 kez tekrarlanmıştır.

Bu testlere karşı *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* ve diğer yakın *Pseudomonas* ların göstermiş oldukları reaksiyonlar Çizelge 2 ve Çizelge 3'de verilmiştir (Schaad, 2001).

Çizelge 2. *Pseudomonas* Türlerinin Tanılanmasında Kullanılan Biyokimyasal Testler (Schaad, 2001)

Karakterler	<i>P. marginalis</i>	<i>P. tolaasii</i>	<i>P. agarici</i>	<i>P. cichorii</i>	<i>P. viridflava</i>	<i>P. savastanoi</i>	<i>P. syringae</i>	<i>P. fuscovaginae</i>	<i>P. corrugata</i>
Çözünbilir floresan pigment	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Çözünmeyen floresan pigment	-	-	-	-	V (mavi-yeşil)	-	-	-	-
Levan	+	-	-	-	-	-	+ ^b	-	-
Oksidaz	+	+	+	+	-	-	-	+	+
Arginin dehidrolaz	+	-	-	-	-	-	-	+	+
Pektolitik aktivite	+	-	-	-	+	V	-	ND	-
Tütünde HR	V	-	+	+	+	+	+	-	ND
37°C'de gelişim	-	-	-	-	-	+	-	-	+
Nitrattan oluşumu	N ₂ -	-	-	-	-	+	-	ND	+
PHB ^c	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Jelatin Hidrolizi	ND	ND	ND	-	+	-	V	ND	+
2-ketogluconate	+	+	+	+	+	+	+	-	ND
Mannitol	+	+	+	+	+	-	V	ND	+
Geraniol	-	-	-	-	-	-	-	ND	ND
Benzoate	-	-	+	-	-	-	-	ND	-
Cellobiose	-	-	-	-	-	+	-	ND	-
Sorbitol	+	+	-	-	+	-	+	ND	-
Trehalose	+	V	-	-	-	+	-	ND	+
Sakkaroz	+	-	-	-	-	-	+	+	+

Çizelge 2. (Devam)

Meso-tartarate	V	+	-	+	+	-	+	ND	ND
D(-)-tartarate	V	-	-	-	+	-	-	ND	V
D-arabinose	-	-	-	-	-	-	-	ND	+
I-rhamnose	V	ND	-	-	-	-	-	ND	-
D-aspartate	-	ND	ND	+	-	-	-	ND	ND
Buz çekirdeği oluşturma	-	+	+	-	-	-	+	-	-
IAA üretimi	-	-	-	-	-	+	-	-	-

+ : %80 veya daha fazla izolat pozitif; - : %80 veya fazla izolat negatif; V : %21-79 izolat pozitif; ND : belirlenmemiş,

^a : Sands ve ark, 1970; Hildebrand ve ark, 1988; Holt ve ark, 1994; ve Yound ve Triggs, 1994'den sonra modifiye edilmiştir.

^b : Delphinii, populans ve passiflorae patovarları negatif

^c : Poly β hydroxybutyrate

Çizelge 3. *Pseudomonas syringae*'nin Patovarlarının Genel Tanılanmasında Kullanılan Testler (Schaad, 2001)

Karakterler	<i>tabaci</i>	<i>lachrymans</i>	<i>syringae</i>	<i>aptata</i>	<i>atrofaciens</i>	<i>dysoxyl</i>	<i>pisi</i>	<i>antirrhini</i>	<i>morpuranorum</i>	<i>delphinii</i>	<i>tomato</i>	<i>maculicola</i>	<i>eribotryae</i>	<i>sesami</i>	<i>papulans</i>	<i>coronofaciens</i>	<i>strifaciens</i>	<i>garcae</i>	<i>oryzae</i>	<i>helianthi</i>	<i>mori</i>	<i>passifloriae</i>	<i>persicae</i>	<i>cannabina</i>	<i>pahseolicola</i>	<i>glycinae</i>
Buz çekirdeği	-	+	+	+	+	ND	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	ND	ND	ND	-	-	+	^D	^D	^D
Levan	+	+	+	+	+	^D	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Pectolysis ¹	4;8	4;8	-	-	-	ND	-	4	4	4	4	4	4	4;8	+	-	ND	ND	ND	ND	4	ND	4	4	4	4
βglucosidase	+	+	+	+	+	ND	^D	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	ND	ND	ND	-	+	-	-	-	-
D-mannitol	+	+	+	+	+	+	+	^D	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
Adonitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	^D	-	-	-	-	-
Insitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
D-Sorbitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	^D	+	+	-	-	^D
Trigonelline	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+
D-quinat	+	+	+	+	+	+	+	^D	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+
Erythritol	+	+	+	+	+	+	^D	-	^D	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-
L(+)tartarate	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	ND	^D	-	-	-	-	-	-
D(-)tartarate	-	-	^D	+	ND	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	ND	-	ND	-	-	-	-	-	-
L-lactate	-	-	+	+	+	+	^D	-	-	-	^D	^D	-	-	^D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Anthranilate	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DL-homoserine	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-

Çizelge 3. (Devam)

Glutarate	+	+	+	+	+	+	ND	+	+	+	+	ND	ND	ND	-	ND	ND	+	+	+	-	ND	ND	+ ^D	-	+ ^D
DL-glycerate	+	+	+	+	+	+	ND	+	+	+	+	ND	ND	ND	+	ND	ND-	+	+	+	-	ND	ND	-	-	-
Gelatinin sivilaşması	+	+	+	+	+	+	ND	+	-	+	+	ND	ND	ND	+ ^D	-	ND	+	+	-	-	ND	ND	-	-	-
Arbutin hidrolizi	+	+	+	+	+	+	ND	+	-	+	+	ND	ND	ND	+	ND	ND	+	+	-	+ ^D	ND	ND	-	-	-
Aesculin hidrolizi	+ ^D	+ ^D	+	+	+	+	ND	+ ^D	+ ^D	+	+	ND	ND	ND	+	ND	ND	+	-	-	+ ^D	ND	ND	-	-	-
Polygalacturonase	+ ^D	+	-	-	-	-	ND	-	-	-	-	ND	ND	ND	-	ND	ND	-	-	-	-	ND	ND	-	-	-
Pektat lyase	+ ^D	+ ^D	-	-	-	-	ND	-	-	+	-	ND	ND	ND	+	ND	ND	-	-	+	-	ND	ND	-	-	-
Toxin	+	-	+	+	+	-	ND	-	+	-	+	+	ND	ND	-	+	ND	+	-	-	-	ND	ND	+ ^D	+	+

I : pektat jelde oluşan çukurun pH'sı; 4=pH4.6/8=pH8.5

+ : %80 veya daha fazla izolat pozitif; +^D : %80 veya daha fazla izolat geç pozitif; V : %21-79 izolat pozitif; - : %80 veya daha fazla izolat negatif; ND : belirlenmemiş, Hildebrand ve ark, 1998; ve Yound ve Triggs, 1994'den sonra modifiye edilmiştir

3.2.3.4.1. Gram reaksiyon testi

Bakteri izolatların hücre duvarlarındaki farklılığı belirleyebilmek için bir lam üzerine, %3'lük KOH çözeltisinden bir damla damlatılmıştır. Ardından King B üzerinde geliştirilen 24–48 saatlik bakteri kültüründen öze ile alınarak KOH çözeltisi ile 5–10 s karıştırıldıktan sonra öze yukarıya doğru kaldırılmıştır. Gram negatif özellikte olan mikroorganizmalarda hücre duvarındaki peptidoglukan tabakası tek katlı olup, teikoik asit içermediğinden KOH ile kolayca parçalanmış, sitoplâzma sıvısı serbest hale geçişyle bunun sonucunda da vizköz bir uzama görülmesi beklenilmiştir. *P. s. pv. phaseolicola* pozitif olarak kabul edilmiştir. (Saygılı, 1995).

3.2.3.4.2. Arjinin dihidrolaz testi (Arginine Dehidrolase Testi)

Mikroorganizmaların bu özelliğini belirtmek için yapılan bu testte Thornley 2A besi yeri kullanılmıştır.

	<u>g/L</u>
• Pepton	1
• NaCl	5
• K ₂ HPO ₄	0,3
• Agar	3
• L+HCl arginine	10
• Destile su	1

pH: 7,2

Tüplere 3 ml konulan besiyeri 121 °C'de 1.5 atm basıçta sterilize edilmiştir. Sonra tüplere öze ile bakteri kültürü aşılanmıştır ve tüplerin üzerine 2 ml steril parafin konulmuştur. Kültürler 27 ° C'de 7–15 gün süre ile inkübe edilmiştir. Bakterinin arginine'i kullanması sonucu meydana gelen pembemsi kırmızı renk pozitif, açık pembe renk ise negatif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Thornley, 1960).

3.2.3.4.3. Levan (Fruktan) testi

Bakteriyel izolatlar,

- Sakkaroz 5g
- Nutrient agar 2 g
- Destile su 100 ml

%5 sukroz içeren nutrient agar ortamına çizgi ekim yapılan bakteriyel izolatlar, 27 °C'de 5 gün inkübe edilmiştir. Levan sucrase enziminin sakkarozu kullanması sonucu oluşan konveks, mukoid koloniler pozitif, konveks ve mukoid yapıda olmayan koloniler ise negatif olarak belirlenmiştir (Klement ve ark., 1990; Lelliot ve Stead, 1987).

3.2.3.4.4. Oksidaz testi

Kullanılan besiyeri;

- Nutrient agar 2g
- Glukoz 1g
- Destile su 100ml

Kullanılan solüsyon;

- Tetra methyl-p-phenylendiamine dihydrochloride 1g
- Destile su 100 ml

% 1 oranında glikoz içeren nutrient agar besiyerinde gelişen 24-48 saatlik kolonilerden, öze yardımı ile bir miktar alınarak ve filtre kağıdı üzerine damlatılan % 1'lik Tetra methyl-p-phenylendiamine dihydrochloride iyice sürülmüştür. Bu işlemin sonucunda bakteri solüsyon karışımı;

- | | |
|--|----------------|
| 10-60 saniye içinde maviye dönüşmüşlerse | pozitif olarak |
| 60 saniye sonra maviye dönüşürse | geç pozitif |
| 60 saniye sonra maviye dönüşmezse | negatif |

olarak kabul edilmiştir (Kovacs, 1956).

3.2.3.4.5. Arbutin hidrolizi

Bu test için aşağıda verilen besiyeri hazırlanmıştır.

	<u>g/L</u>
• Arbutin	5.0
• Peptone	10.0
• Yeast extract	3.0
• D-glukose	1.0
• Ferric citrate	0.5
• Noble agar	12.0

Kimyasallar 1000 ml saf su içerisine konularak pH 7.0'a ayarlanmıştır ve 20 dakika otoklavda sterilize edilmiştir, 25-28 °C'de 10 günden fazla ünkübasyona bırakılmıştır. Pozitif sonuç veren izolatlar besiyerinde gelişmiş ve ortam kahverengileşmiştir (Crosse ve Garrett, 1963).

3.2.3.4.6. Karbon kaynaklarının kullanımı

Elde edilen bakteriyel izolatların karbon kaynaklarını kullanım durumlarını belirlemek amacıyla aşağıda verilen teste tabi tutulmuşlardır (Ayers ve ark., 1919).

	<u>g/L</u>
• NH ₄ H ₂ PO ₄	1,0
• KCl	0,2
• MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2
• Bromthymolbleu	0,08
• Agar	12,0
• Damıtık su	900 ml

pH: 7,0

Agar dışındaki kimyasallar 900 ml saf su içerisine konularak pH 7.0'a ayarlanmış ve üzerine agar üzerine dökülerek tüplere 5'er ml konulmuştur. Daha sonra otoklavda 120 °C'de 1.5 atm'de 15 dakika sterilize edilmiştir.

Testte kullanılacak karbonhidratlardan (D-Sorbitol, D- mannitol, erythritol, inositol, β -glukosidase, inositol) 10 g tartılarak ve 100 ml su içerisinde eritilmiş, verilen pH değerine ayarlanmıştır ve filtrasyon yöntemi ile sterilize edilmiştir.

Otoklavda sterilize edilen ve içlerine 4.5 ml besiyeri bulunan tüpler, 45–50 $^{\circ}\text{C}$ 'e soğutulan tüplerin üzerine sterilize edilen karbonhidratlardan 0.5 ml eklenilerek ve eğik agar olarak hazırlanmıştır. Bu tüplere bakteriyel izolat aşılansmış ve 24–27 $^{\circ}\text{C}$ 'de inkübe edilmiştir. Tüplerdeki renk değişimi (sarı) pozitif olarak değerlendirilmiştir.

3.2.3.4.7. Jelatinin hidrolizi

Aşağıda verilen karışım hazırlandıktan sonra, jelatinin erimesi için 50 $^{\circ}\text{C}$ 'de su banyosunda tutulmuş ve çözelti 5 ml olarak tüplere konulmuş, otoklavda sterilize edilmiştir. Tüplere bakteri ekildikten sonra 20 $^{\circ}\text{C}$ 'de 7-14 gün inkübe edilmiştir. Tüplerdeki jelatin akıcı ise pozitif olarak değerlendirilmiştir (Schaad, 2001).

	<u>g/L</u>
• Peptone	5.0
• Beef extract	3.0
• Gelatin	120

3.2.3.4.8. Esculin hidrolizi

Bakteriyel izolatların esculin hidrolizini belirlemek için aşağıda verilen besiyeri hazırlanmıştır.

	<u>g/L</u>
• Yeast extract	5.0
• NaCl	5.0
• $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2
• K_2HPO_4	0.5
• $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	0.5
• Ferric ammonium citrate	50 mg
• Esculin	1.0

pH: 6.8

Yukarıda verilen besiyerinin pH'ı 6.8'e ayarlanmış ve otoklavda sterilize edilmiştir. Tüplere 5 er ml dağıtılan besiyeri üzerine bakteri ekimi yapıldıktan sonra 28 °C'de çalkalayıcıda 28 gün bekletilmiştir. Besi yeri kahverengi-siyah arası renk alanlar pozitif olarak değerlendirilmiştir (Sneath, 1956; Schaad, 1988).

3.2.3.4.9. Hidrojen sülfid (H₂S) oluşumu

Aşağıda verilen besi yeri tüplere 5 ml konularak otoklavda sterilize edilmiştir. Bu tüplere bakteri aşılanmıştır. 5 mm genişlikte kesilen kurutma kağıtları %5'lik kurşun asetat içine batırılmış, kurutulmuş ve otoklavda sterilize edilmiştir. Bu kağıtlar bakteri aşılanan tüplere yukarıdan aşağıya doğru sarkıtılmıştır. Bu tüpler 14 gün boyunca incelenmiştir. İnokule edilen bakteriler, sülfür içeren aminoasitlerden H₂S oluştururlar. H₂S meydana gelmesi tüplerdeki kurşun kurşun asetatlı kağıtların siyahlaşmasına neden olur. Tüplerdeki kurutma kağıdının siyah renk alması pozitif olarak değerlendirilmiştir (Dye, 1968).

	<u>g/L</u>
• NH ₄ H ₂ PO ₄	0.5
• K ₂ HPO ₄	0.5
• MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2
• Yeast extract	0.2
• Cystein hydrochloride	0.1

3.2.3.4.10. Floresan pigment üretimi

Floresan pigment üreten izolatların belirlenmesi amacıyla, King B besiyeri hazırlanmıştır. Her bir izolat katılan besiyeri üzerine çizildikten sonra, 25 °C'ye ayarlı inkübatörde 2 gün süreyle inkübe edilmiştir. Gelişen kültürler, ultraviyole lamba altında, karanlık odada gözlemlenmiştir, yeşil floresan pigment üretenler pozitif, diğerleri negatif olarak değerlendirilmiştir (King ve ark., 1954; Fahy ve Persley, 1983; Lelliot ve Stead, 1987).

3.2.3.4.11. Katalaz testi

Katalaz enziminin varlığını ve yokluğunu belirlemek için 24-48 saatlik bakteri kültüründen bir öze alınmıştır ve lam üzerine 1 damla % 7 H₂O₂ (7 ml H₂O₂ hacmi steril saf su ile 100 ml ye tamamlanır) ilave edilerek karıştırılmıştır. Kabarcık oluşumu pozitif, oluşmaması ise negatif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Klement ve ark., 1990).

3.2.3.4.12. Nitrat redüksiyon testi

Obligat aerobik bakterilerin oksijenin varlığında nitrat kullanımını belirlemek için hazırlanan besi ortamı;

	<u>g/L</u>
• Yeast extract	5 g
• KNO ₃	3g
• Noble agar	1 g
• NH ₄ H ₂ PO ₄	1 g
• KCl	0.2 g
• MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2 g

5'er ml tüp içerisine konulup otoklav edilmiştir. Bakteriyel kültürler inokule edildikten 5 gün sonra 27 °C de geliştiğinde nitrat indirgemesi pozitif olarak değerlendirilmiştir (Fahy ve Persley 1983; Klement ve ark., 1990).

3.2.3.4.13. Pektinaz testi

Testin yapılması için CVP besiyeri hazırlanmıştır. Buna göre;

Karıştırıcı içerisine 500 ml sıcak su konulmuştur, karıştırıcı düşük devirde çalıştırılarak ve aşağıdaki maddeler eklenmiştir.

• Kristal viyoleto (% 0.075' lik)	1 ml
• 1N NaOH (8 g NaOH/200 ml)	4.5 ml
• Difco Agar	2 g
• NaNO ₃	1 g

Karıştırıcı 15 dk yüksek devirde çalıştırılarak;

- 9 g Na-polypectate, karıştırıcı yüksek devirdeyken yavaş yavaş eklenmiş ve 15 dk karıştırılmıştır. Böylece Na-polypectate kümelenmemiş olmaktadır.
- Ortam 2 L lik erlen içerisine konulmuştur. Buna 0.5 ml % 10 luk Na-lauryl sulfate eklenmiştir.
- Erlen pamukla kapatılıp, alimünyum folyo ile kaplanmış ve 121 °C de 1.5 atm'de 15 dk sterilize edilmiştir.
- Mümkün olduğunca kısa sürede petrilere dökülmelidir. Petirler oda sıcaklığında 48 saat bekletilmiştir.

Hazırlanan besi yerinin agar oranı çok düşük olduğu için izolatlar dikkatlice çizgi ekim yapılmıştır. Petirler bakteri gelişimi için oda sıcaklığında 4 gün süreyle inkübe edilmiştir. Besi yeri üzerinde, çizgilerin olduğu yerde meydana gelen çukurcuklar ve sulu görünüm pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Beaulieu ve ark., 1991; Bouzar ve ark., 1994).

3.2.3.4.14. Nişastanın hidrolizi

Bu testte; YNA besiyeri kullanılmıştır.

- Yeast extract 5 g
- Pepton 5 g
- Beef extract 5 g
- Agar 15 g
- Eriyebilen nişasta 2 g

pH: 6.5 ayarlanmıştır.

Nişasta ayrı bir kaptaki 10 ml su içinde eritilmiş ve eriyen içine karıştırılmıştır. Petrilere çizgi ekimle aşılama yapıldıktan sonra 2-7 gün inkübe edilmiştir.

Kontrol için; lugol solusyonu

- Lyod 1 g
- KI 2 g
- Damıtık su 300 ml

15'er ml petrilere dökülmüştür. Mavi renk verenler negatif, mavi renk vermeyen ancak ekim çizgileri etrafında açık renk hale verenler pozitif olarak değerlendirilmiştir (Dye, 1962).

3.2.3.3. Patojenisite testi

Stok kültürlerden NA'ya transfer edilmiş 48–72 saatlik *P. s. pv. phaseolicola* olarak tanımlanan izolatlar steril destile su ile 10^8 hücre yoğunluğunda seyreltilerek hazırlanan bakteri süspansiyonu, 2 haftalık fasulye bitkilerine hipodermik şırınga ile gövde ve petiol içine 0,1 ml olarak inoküle edilmiştir. Negatif kontrol olarak ise H₂O kullanılmıştır. İnokulasyon sonrası 24 saat süreyle bitkiler üzerine polietilen torbalar geçirilmiş, aşılama sonrası bitkiler 7–10 gün arasında 24–28 °C'de yüksek nemli koşullar altında tutularak, belirtiler izlenmiştir. Belirtiler gelişimi gözlenen yapraklardan tekrar bakteri izolasyonu ve tanısı yapılmıştır. Yapılan test 3 tekrarlolu olarak aynı şartlarda 3 kez tekrarlanmıştır (Taylor, 1970; Lelliot ve Stead, 1987).

3.2.3.4. Tütünde aşırı duyarlılık (Hipersensitive Reaction =HR) testi

Elde edilen bütün bakteriyel izolatlar King B besiyerinde 24-48 saat 27 °C'ye ayarlı inkübatörde geliştirilmiştir. 10^8 hücre/ml yoğunlukta bakteriyel süspansiyon hazırlanmıştır. Süspansiyonlar 3cc'lik plastik enjektörlerle tütün (*Nicotiana tabacum* L. White Burley) yapraklarının alt kısmından damar aralarına enjekte edilmiştir. İnoküle edilen bitkiler en az 8 saat, ışıklı bir ortamda muhafaza edilerek inokulasyonun yapıldığı kısımda nekroz oluşup oluşmadığı tespit edilmiştir. Ölü doku oluşumu pozitif, oluşmaması ise negatif olarak değerlendirilmiştir (Klement ve ark.1966, Lelliot ve Stead, 1987).

3.2.3.5. Moleküler tanılama

3.2.3.5.1. BIO-PCR

BIO-PCR, basitleştirilmiş prosedürleri ve PCR hedeflerinin biyolojik ve enzimatik amplifikasyonlarını birleştiren bir polimeraz zincir reaksiyonu metodudur. Bu metod, fasulye tohumu ekstraktlarındaki *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*'nın belirlenmesinde, DNA izolasyonu olmaksızın, besiyerinde geliştirilen bakterinin yıkanarak direkt amplifikasyonudur. Tohumlar gece boyunca PBS tampon solusyonunda bekletilmiş ve ekstraktlar 24 saatlik örneklerden alınarak King B agar üzerine ekilmiştir. 24-48 saat inkubasyondan sonra, petrilerden bakteri hücrelerini uzaklaştırmak için su ile yıkanmış, Schaad ve ark., (1995)'in phaseolotoxin geninin saptanması metodu değiştirilerek 1 mL'lik hücre süspansiyonu 15 dakika kaynatılmış, 10 dakika 14.000 devirde mikrosantrifüjle ayrıştırılmış, çökelti ayrılmış ve süpernatanttan 2 µL'lik kısım PCR amplifikasyonu için kullanılmıştır.

3.2.3.5.1.1. *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*'nın DNA amplifikasyonu için spesifik primerlerin kullanımı

3.2.3.5.1.1.1. *phaseolotoxin* geni için spesifik primer kullanımı

PCR çalışmalarında *P. s.* pv. *phaseolicola*'nın spesifik *phaseolotoxin* geninin amplifikasyonu için;

P5.1: 5'-AGCTTCTCCTCAAAACACCTGC-3' ve

P3.1: 5'-TGTTCCGCCAGAGGCAGTCATG-3' olarak sentezletirilen primerler kullanılmıştır (Schaad ve ark., 1995).

3.2.3.5.1.1.2. *tox* gen bölgesi için spesifik primer

P. s. pv. *phaseolicola*'nın *tox* gen bölgesi için sentezletirilen spesifik primerler

HM6: 5'-CGTGTCCGTGGATAAAAGC-3' ve

HM 13: 5'-GTTGAATTTCACTACCCG-3' dir (Prosen ve ark., 1993).

3.2.3.5.2. Moleküler tanıda kullanılan kimyasallar

6,5X Loading Dye

- Bromofenol mavisi 30,0 mg
- 5XTBE 4,25 ml
- Gliserin 5,75 ml

5xTBE Tamponu (pH= 8)

- Tris 54 g
- Borik asit 27.5 g
- EDTA 20 ml 0.5 M
- Steril destile su 500 ml

steril su içerisinde çözüldükten sonra karışımın pH sı 8 e ayarlandı. Toplam hacim steril destile su ile 1 L ye tamamlanmıştır.

1xTBE Tamponu

100 ml 5XTBE nin hacmi steril destile su ile 500 ml ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

Ethidium Bromür Çözeltisi

- ethidium bromür 300 µl

500 ml 0,5XTBE tamponu içerisine ilave edilerek hazırlandı. Karanlık ortamda oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

3.2.3.5.3. *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*'nın DNA amplifikasyonu için Polymerase Chain Reaction (PCR) karışımının hazırlanması

PCR karışımı 0.2 ml ependorf tüplerde hazırlanmıştır. Karışımın içeriği aşağıda verilmiştir;

- Bakteri DNA 2 µl
- *PCR Master Mix 12.5 µl
- Forward primer 2 µl
- Revers primer 2 µl
- Steril saf su 6.5 µl
- Toplam hacim 25 µl**

*PCR Master Mix 0.05 ünite/ µl *Taq* DNA, 4 mM MgCl₂, 0.4 mM dATP, 0.4 mM dCTP, 0.4 mM dGTP ve 0.4 mM dTTP ayarlanıp hazırlanmıştır.

3.2.3.5.4. *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*'nın DNA amplifikasyonu için spesifik primerlerle uygulanan PCR protokolleri

3.2.3.5.4.1. *phaseolotoxin* geni PCR protokolü

P. s. pv. phaseolicola 'nın tanısında kullanılan *phaseolotoxin* geninin PCR protokolü aşağıda verildiği şekilde Schaad ve ark. (1995)'ın da önerdiği gibi P 5.1 ve P 3.1 primerleri kullanılarak Termal cycler (Eppendorph mastercycler personal)' da programlanarak uygulanmıştır:

94 °C 2 dk
 94 °C de 1 dk
 58 °C de 1 dk
 72 °C de 2 dk
 72 °C de 8 dk uygulanmıştır.

} 25 döngü

Amplifiye edilen bölge için 500 bp bant oluşturması beklenilmiştir (Schaad ve ark., 1995).

3.2.3.5.4.2. *tox* geni PCR protokolü

P. s. pv. phaseolicola 'nın tanısında kullanılan *tox* geninin PCR protokolü aşağıda verildiği şekilde HM6, HM 13 primerleri ile Prosen ve ark. (1993), tarafından geliştirilmiş ve Schaad ve ark. (1995) tarafından modifiye edilmiş ve düzeltilerek Termal cyclers (Eppendorph mastercyclers personal)' da programlanarak uygulanmıştır:

94 °C'de 5 dakika	}	35 döngü
94 °C de 1 dakika		
60 °C'de 1 dakika		
72 °C'de 1 dakika		
72 °C de 10 dakika.		

Amplifiye edilen bölge için 1900 bp bant oluşturması beklenilmiştir (Prosen ve ark., 1993).

3.2.3.5.5. PCR ürünlerinin elektroforez sisteminde belirlenmesi

3.2.3.5.5.1. Agaroz jelin ve elektroforez tampon solüsyonunun hazırlanması

% 1' lik Agaroz jel hazırlanması; 100 ml 1XTBE buffer solüsyonu, 1 gr agaroz (SeaKem) tartılır ve solüsyonda agaroz ısıtılarak eritilir.

Elektroforez tampon solüsyonunun hazırlanması 1X TBE buffer kullanılmıştır.

3.2.3.5.5.2. Amplifiye edilen bakteriyel DNA örneklerinin elektroforez sisteminde yürütülmesi

Elde edilen PCR ürünleri agaroz jel elektroforezde Schaad ve ark., (1995)'a göre yapılmıştır.

Bunun için hazırlanan %1' lik agaroz jel yaklaşık 50°C'ye kadar soğutulduktan sonra taraklar yerleştirilmiş jel tepsinine dökülmüştür. Agaroz jel donduktan sonra içinde 1X TBE buffer bulunan elektroforez tankı içerisine yerleştirilmiştir. Daha sonra tarak jelden dikkatlice çıkarılmış ve oluşan çukurlara 2 µl loading dye ve 8 µl PCR ürünü karışımı bir mikropipet yardımıyla karıştırılarak çukurlara yüklenilmiştir. PCR ürünleri 75 volt elektrik verilerek yaklaşık 2 saat yürütülmüştür. Oluşan bantların moleküler ağırlıklarını belirlemek amacıyla 100

bp'lik moleküler işaretleyici (marker, Fermantas100 bp Plus DNALadder SM 1153) kullanılmıştır.

3.2.3.5.3. Agaroz jelin görüntülenmesi ve sonuçların incelenmesi

- 1. jelin boyanması:** Bantların UV ışık altında görülebilmesi için etidyum bromit ile 0.5 mg etidyum bromür/L 10 dakika bekletilerek boyanmış ve daha sonra 10 dakika steril saf su ile çalkalanmıştır.
- 2. jelin görüntülenmesi:** Etidyum bromit ile boyanan jeller üzerindeki bantlar transiliminatörde oluşan bantlar incelenmiş ve fotoğraflanmıştır.

3.2.4. Kültürlerin saklanması

İzolatlar %25'lik gliserol stok içerisinde ve -30 °C'de depolanmış ve her üç ayda bir Nutrient agar üzerine ekim yapılarak yenilenmiştir.

4.ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Örnekleme Sonuçları

İç Anadolu Bölgesinde ekonomik anlamda fasulye ekimi yapılan ve bölgeyi temsil edecek şekilde belirlenen illerden fasulye tohumu örnekleri alınmıştır. Örnek elde edilen iller, toplanan örnek sayısı ve bunlardan izole edilen toplam izolat ve *P. s. pv. phaseolicola* sayıları ile bunların isimlendirilmeleri Çizelge 4 'de verilmiştir. Elde edilen bulgulara göre, İç Anadolu Bölgesindeki 12 ilden toplam 112 adet bakteriyel izolat elde edilmiş ve bunlardan 38 adedi *P. s. pv. phaseolicola* olarak tanımlanmıştır. Buna göre İç Anadolu Bölgesi'ndeki 12 ilde *P. s. pv. phaseolicola*' nin fasulye tohumlarıyla taşınma oranı %21 olarak belirlenmiştir. İllere göre fasulye tohumlarında etmenin taşınma oranları Çizelge 5'de verilmiştir.

Çizelge 4. İç Anadolu Bölgesinde örnekleme yapılan 12 ilden elde edilen toplam bakteriyel izolat sayısı ve *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* izolatları

İl	İlçe- Mevki	İzolat adı	Toplanan örnek sayısı	Elde edilen izolat sayısı	Elde edilen *Psp izolatı
Ankara	Bölge Müdürlüğü	PspAnB3	14	11	4
		PspAnB6			
		PspAnB7			
		PspAnB9			
	Kazan		6	4	0
Aksaray	Kızılkaya	PspAk1	3	2	1
	Doğantarla	PspAk4	5	5	4
		PspAk6			
		PspAk7			
		PspAk8			
	Helvadere	PspAk11	4	3	2
		PspAk12			
Gülağaç	PspAk14	4	4	1	
Demirci	PspAk17	4	3	1	
Çankırı			0	0	0
Çorum	Merkez		11	5	0
Eskişehir	Merkez		6	3	0
	Sivrihisar		6	3	0
Karaman			0	0	0
Kayseri	Tomarza		12	7	0
	Yeşilhisar	PspKaY1	11	8	3
		PspKaY7			
PspKaY8					
Kırşehir	Merkez		7	5	0
Kırıkkale	Kanalaltı		6	3	0
	Köyönü	PspKrK17	3	1	1
	Bahşılı	PspKrK112	3	1	1
	Sarımsalı	PspKrK113	2	1	1
	İrmak		2	1	0
Konya	Çumra	PspKoÇ1	15	12	5
		PspKoÇ4			
		PspKoÇ6			
		PspKoÇ7			
		PspKoÇ11			
	Ereğli	PspKoE2	14	11	7
		PspKoE3			
		PspKoE4			
		PspKoE6			
		PspKoE8			
		PspKoE10			
		PspKoE12			
	Nevşehir	Merkez	PspNev1	4	2
PspNev2					
Ürgüp			5	3	0

*Psp ; *P. s.* pv. *phaseolicola*

Çizelge 4. (Devam)

İl	İlçe- Mevki	İzolat adı	Toplanan örnek sayısı	Elde edilen izolat sayısı	Elde edilen *Psp izolatı
Niğde	Ulukışla	PspNi1	9	5	3
		PspNi2			
		PspNi4			
Sivas	Divriği	PspSi3	9	5	2
		PspSi4			
Yozgat	Çekerek		10	4	0
TOPLAM			175	112	38

*Psp ; *P. s. pv. phaseolicola*

Çizelge 5. İç Anadolu Bölgesi'ndeki örnekleme yapılan 12 ilde *Pseudomonas syringae pv. phaseolicola*'nin illere göre taşınma oranları

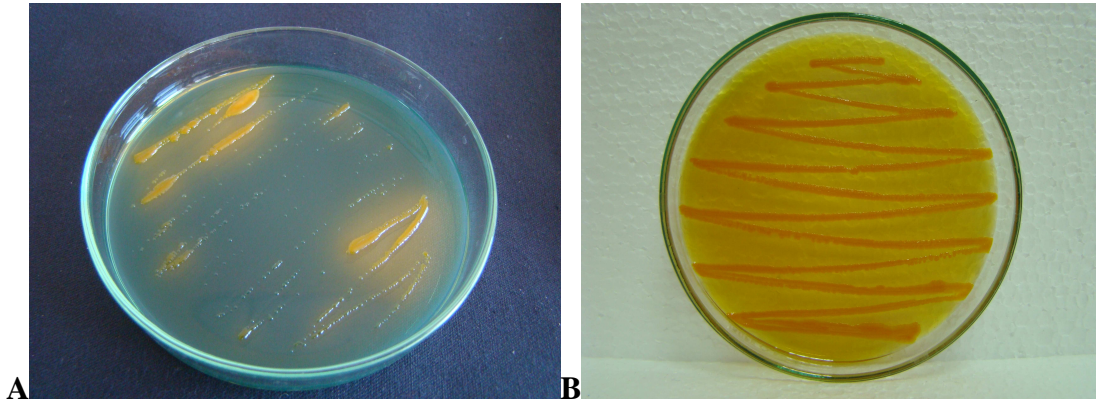
İller	An	Ak	Çr	Esk	Kay	Krş	Krk	Kn	Nev	Ni	Si	Yz
Taşınma oranı(%)	2.28	5.14	0	0	1.71	0	1.71	6.85	1.14	1.71	1.14	0

An; Ankara, **Ak;** Aksaray, **Çr;** Çorum, **Esk;** Eskişehir, **Kay;** Kayseri, **Krş;** Kırşehir **Krk;** Kırkklake, **Kn;** Konya, **Nev;** Nevşehir, **Ni;** Niğde, **Si;** Sivas, **Yz;** Yozgat

4.2. Patojenin Tanısı

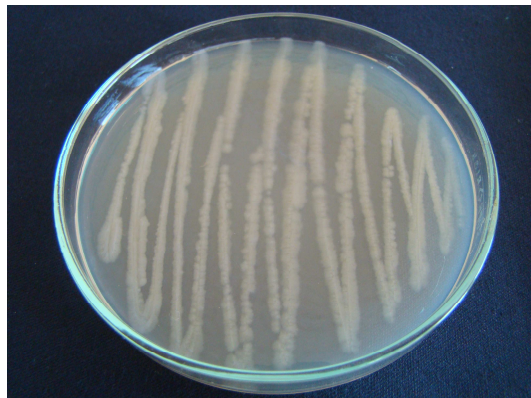
4.2.1. Koloni morfolojisi

MSP besi yerinde, *P. s. pv. phaseolicola* kolonileri oda sıcaklığında 2 gün sonra 1.5-2.0 mm, 3 gün sonra 3 mm yarıçapa ulaşmıştır. Koloniler yuvarlak, kabarık, küresel, parlak ve daha az yoğun bir merkez etrafında açık sarı olarak görülmüş, kolonilerin etrafındaki besi yeri 3. günde açık sarıya dönmüştür. Fasulye tohumuyla ilişkili saprofit bakterilerin büyümesi King B besi yerine göre %80'den daha fazla azaldığı belirlenmiştir.



Şekil 4.1. A. MSP Besiyerindeki 24 Saatlik İnkubasyon Sonucunda Koloni Rengi ve Yapısı B. MSP Besiyerindeki 48 Saatlik İnkubasyon Sonucunda Besiyeri Rengindeki Değişiklik, Koloni Rengi ve Yapısı

P. s. pv. phaseolicola olarak tanılanan 38 izolatın tamamı King B besi yerinde ultraviyole lamba altında yeşil fluoresan pigment oluşturmuştur.

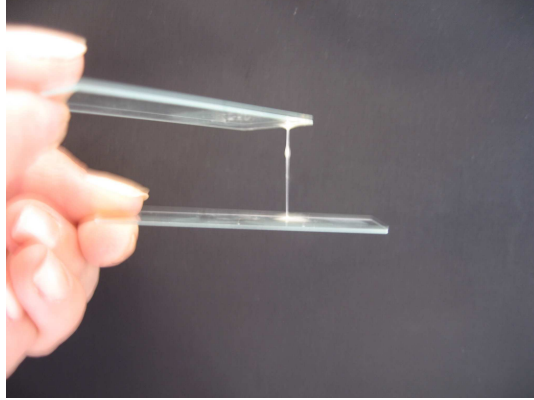


Şekil 4.2. King B Besiyerindeki 24 Saatlik İnkubasyon Sonucundaki Koloni Rengi ve Yapısı

4.2.2. Biyokimyasal test sonuçları

4.2.2.1. Gram reaksiyon testi

King B besi yerinde geliştirilen 38 *P. s. pv. phaseolicola* kültürlerinden öze ile alınarak bir lam üzerinde %3 lük KOH çözeltisi ile karıştırılmış 38 izolatın gram negatif özellikte olduğu saptanmıştır.



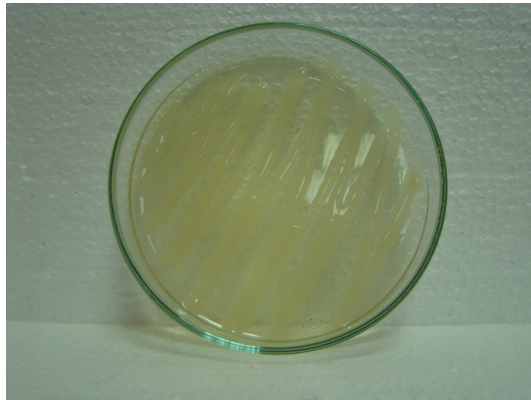
Şekil 4.3. Gram Reaksiyon Testi Sonucu (Negatif)

4.2.2.2. Arjinin dihidrolaz testi (Arginine Dihydrolase Testi)

Bakterilerin arginine'i kullanması sonucu meydana gelen açık pembe renk gösteren 38 *P. s. pv. phaseolicola* izolatları negatif sonuç vermiştir.

4.2.2.3. Levan (Fructan) testi

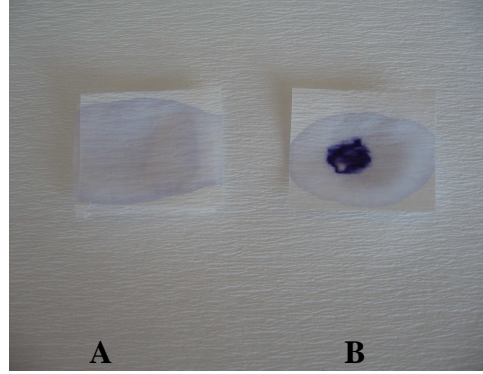
Elde edilen 38 *P. s. pv. phaseolicola* izolatı %5 SNA besiyerinde konveks, mukoid koloni oluşturmuştur.



Şekil 4.4. %5 SNA besiyerinde konveks, mukoid koloni oluşumu (Levan Oluşumu (Pozitif))

4.2.2.4. Oksidaz testi

%1 glikoz içeren NA besiyerinde geliştirilen izolatlar, %1 tetramethyl-p-phenylendiamine dihydrochloride damlatılmış filtre kağıdında reaksiyona sokulmuş ve 38 *P. s. pv. phaseolicola* izolatı negatif sonuç vermişlerdir.



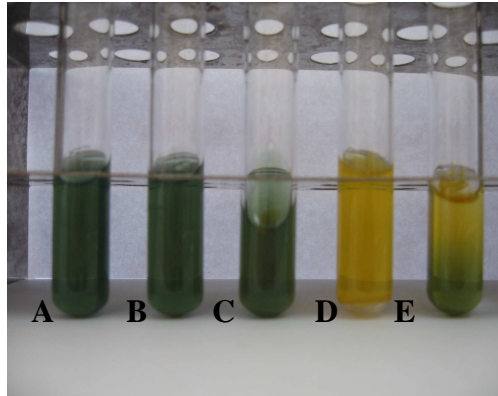
Şekil 4.5. Oksidaz Testi Sonucu **A.** Negatif kontrol **B.** *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*

4.2.2.5. Arbutin hidrolizi testi

Arbutin hidrolizi sonucunda 38 *P. s. pv. phaseolicola* izolatı negatif sonuç vermiştir.

4.2.2.6. Karbon kaynaklarının kullanımı

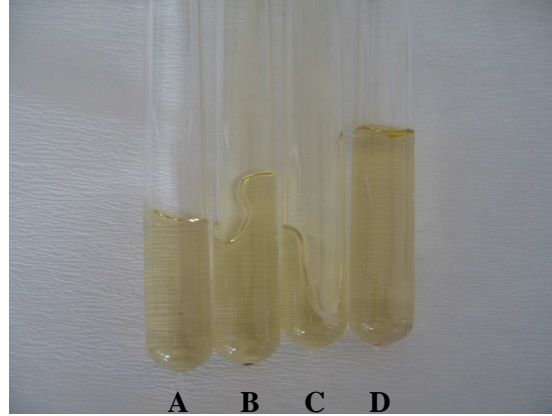
Testte kullanılan karbonhidratlardan D-Sorbitol, D- mannitol, erythritol, inositol içeren tüplerde renk değişimi göstermeyen 38 izolat *P. s. pv. phaseolicola* olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.6. Karbonhidratlardan Asit Üretimi Testi Sonucu **A.** Negatif kontrol **B.** Pozitif kontrol (NCPPB52) **C.** *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* **D.** *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* **E.** *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*

4.2.2.7. Jelatinin hidrolizi

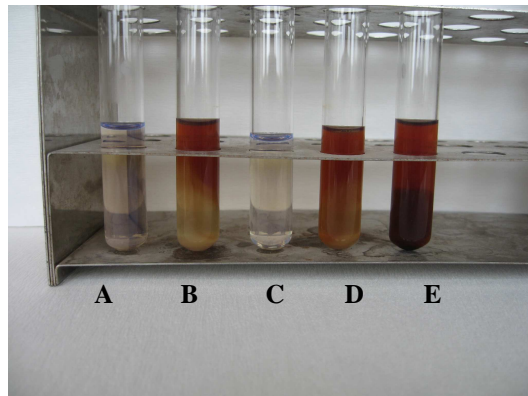
Jelatin içeren tüplere *P. s. pv. phaseolicola* aşılanmış; 14 gün sonra 38 *P. s. pv. phaseolicola* izolatının jelatini sıvılaştırmadığı bu testte negatif sonuç verdikleri belirlenmiştir.



Şekil 4.7. Jelatinin Hidrolizi Testi Sonucu **A.** Negatif kontrol **B.** *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* **C.** *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* **D.** *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*

4.2.2.8. Esculin hidrolizi

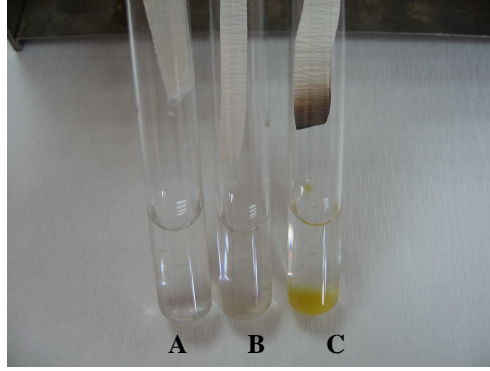
Tüplerde hazırlanan besiyeri üzerine ekimi yapılan bakteriyel izolatlar 28 gün sonra değerlendirilmiş buna göre; 38 *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* izolatında renk değişimi gözlenmemiş, teste negatif sonuç vermişlerdir.



Şekil 4.8. Esculin Hidrolizi Testi Sonucu **A.** Negatif kontrol **B.** *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* **C.** *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* **D.** *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* **E.** *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*

4.2.2.9. Hidrojen sülfid (H₂S) oluşumu

Tüplerdeki besiyerine aşıl原因 bakterilerden, tüplerdeki kurşun asetatlı kâğıtları siyahlaştırmayan 38 *P. s. pv. phaseolicola* izolat negatif sonuç vermiştir.



Şekil 4.9. Hidrojen Sülfid Oluşumu Testi Sonucu **A.** Negatif kontrol **B.** *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* **C.** *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*

4.2.2.10. Floresan pigment üretim testi

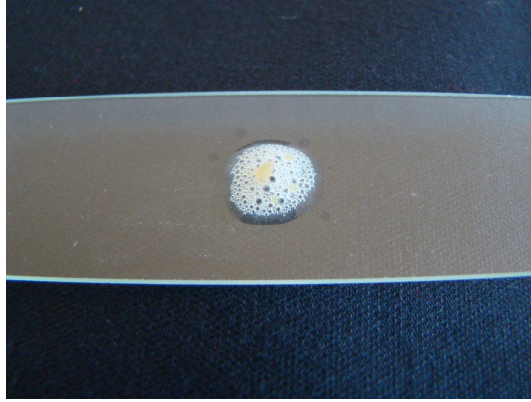
King B besiyerinde gelişen kültürler UV (Ultraviyole lamba) altında incelendiğinde yeşil floresan pigment üreten 38 *P. s. pv. phaseolicola* izolatı pozitif sonuç vermiştir.



Şekil 4.10. Floresan Pigment Üretimi Testi Sonucu (Pozitif)

4.2.2.11. Katalaz testi

Katalaz, elektron transfer zincirinin sonunda açığa çıkan H_2O_2 in parçalanarak O_2 ve H_2O ya dönüşümünü sağlayan bir enzimdir. Katalaz enziminin varlığını belirlemek için yapılan test sonucunda kabarcık oluşturan 38 aerobik bakteriyel izolat pozitif sonuç vermiştir.



Şekil 4.11. Katalaz Testi Sonucu oluşan kabarcık çıkışı (Pozitif)

4.2.2.12. Nitrat indirgenmesi testi

Obligat aerobik bakteriler oksijenin varlığında nitratı kullanarak nitrit ve N_2 ye indirgerler. Nitratın, nitrite indirgenme testinde 38 *P. s. pv. phaseolicola* izolatları negatif sonuç vermiştir.

4.2.2.13. Pektinaz testi

Pektinaz enzimine sahip olan bakteriyel strainleri tespit etmek amacıyla hazırlanan CVP besiyerinde çukurluk ve sulu görünüm elde edilmeyen 38 *P. s. pv. phaseolicola* izolat negatif sonuç vermiştir.

4.2.2.14. Nişastanın hidrolizi

Nişastanın hidrolizi testinde nişasta molekülünü parçalayarak biyolojik enerjiye dönüştürmede görev yapan amilaz enziminin var olup olmadığı bu testle belirlenmiş mavi renk gösteren *P. s. pv. phaseolicola* izolatları negatif sonuç vermiştir.

4.2.3. Patojenisite testi

Elde edilen 38 *P. s. pv. phaseolicola* izolatu dermason fasulye çeşitinde tipik yaprak lekeleri oluşturduğu tespit edilmiştir. Patojenisite testlerinde, yapraklarda sulanmış lekeler şeklinde ortaya çıkan lezyonlar, toksin üretimine bağlı olarak meydana gelen sarı haleler, solup pörsüyerek kuruma belirtileri gözlenmiştir.



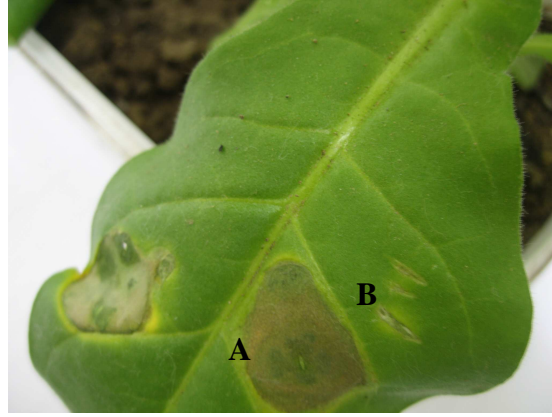
Şekil 4.12. Dermason çeşidi fasulyelerde *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* izolatları için yapılan patojenisite testi sonucu yapraklarda görülen nekrotik alanlar



Şekil 4.13. *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* tarafından yapraklarda oluşturulan hale leke belirtileri

4.2.4. Tütünde aşırı duyarlılık (Hipersensitive Reaction =HR)testi

Gelişmiş tütün yapraklarının intersellüler alanlarına 10^8 hücre/ml bakteriyel süspansiyonların şırınga edilmesi sonucu nekrotik doku oluşumuna neden olanlar HR pozitif, diğerleri ise HR negatif olarak değerlendirilmiştir. HR testi sonucunda nekrotik doku oluşumu gözlenen 38 *P. s. pv. phaseolicola* izolatu pozitif sonuç vermiştir.



Şekil 4.14. A. *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* izolatının (PspAk6)
B. Kontrol (su) tütünde göstermiş olduğu hipersensitif reaksiyon

Çizelge 6. (Devam)

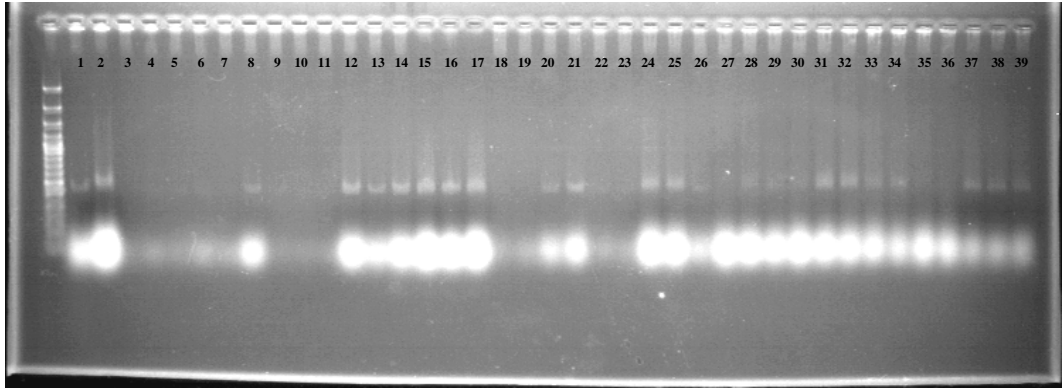
Biyokimyasal testler	PspNev1	PspNev2	PspNi1	PspNi2	PspNi4	PspSi3	PspSi4
G	-	-	-	-	-	-	-
AD	-	-	-	-	-	-	-
L	+	+	+	+	+	+	+
O	-	-	-	-	-	-	-
AH	-	-	-	-	-	-	-
KA	Sorbitol	-	-	-	-	-	-
	Mannitol	-	-	-	-	-	-
	Eritritol	-	-	-	-	-	-
	İnositol	-	-	-	-	-	-
J	-	-	-	-	-	-	-
E	-	-	-	-	-	-	-
H₂S	-	-	-	-	-	-	-
FP	+	+	+	+	+	+	+
K	+	+	+	+	+	+	+
NR	-	-	-	-	-	-	-
P	-	-	-	-	-	-	-
NH	-	-	-	-	-	-	-

G: Gram reaksiyon **AD:** Arjinin Dehidrolaz **L:** Levan oluşumu **O:** Oksidaz Testi **AH:** Arbutin Hidrolizi **KA:** Karbonhidratlardan Asit Oluşumu **J:** Jelatini Sıvılaştırma **E:** Eskulin Hidrolizi **H₂S:** Hidrojen Sülfid Oluşumu **FP:** Floresans Pigment Oluşumu **K:** Katalaz Testi **NR:** Nitrat Redüksiyon Testi **P:** Pektinaz Testi **NH:** Nişastanın Hidrolizi

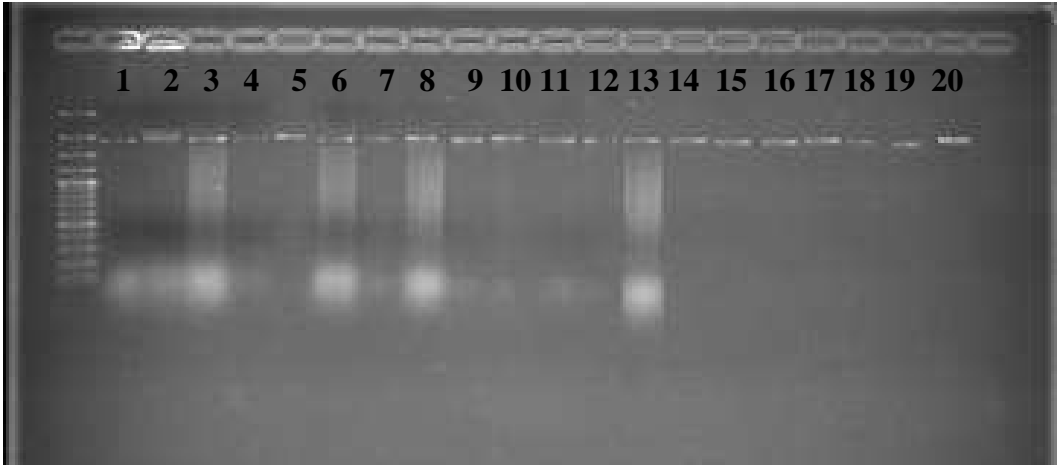
4.2.5. Moleküler tanılama

4.2.5.1. BIO-PCR amplikasyon sonuçları

Gram negatif hücre yapısına sahip fasulye patojenlerinden elde edilen bakteriyel süspansiyonlar P5.1, P3.1 ve HM6 ve HM 13 primerleri ile PCR termocycler cihazında amplifiye edilmiştir. PCR sonucunda oluşan ampikonlar elektroforez sisteminde yürütülerek bakteriyel strainlere ait DNA bantları elde edilmiştir. Jel dökümantasyon sisteminde görüntülenen 38 bakteriyel izolata ait bantların P5.1-P3.1 primer çifti ile 500 bp da, HM6-HM13 primer çifti ile 1900 bp da tek bant oluşturdukları görülmüştür.



Şekil 4.15. P5.1-P3.1 primer çifti ile 500 bp da bant oluşumu 1. P5PS6 2. NCPPB52 3. *P. s. pv. syringae* 4. *P. s. pv. savastanoi* 5. *X. c. pv. phaseoli* 6. *Erwinia amylovora* 7. *Agrobacterium vitis* 8. PspAk8 12. PspAnB3 13. PspAnB6 14. PspAnB7 15. PspAnB9 16. PspKaY1 17. PspKaY7 20. PspKoÇ1 21. PspKoÇ4 24. PspKoE2 25. PspKoE4 26. PspKoE6 28. PspNev1 29. PspNev2 30. PspNi1 32. PspNi2 33. PspSi3 34. PspSi4 37. PspKrK112 38. PspKrK113 39. PspKrK17



Şekil 4.16. HM6-HM13 primer çifti ile 1900 bp da bant oluşumu 1. PSPS6 2. NCPPB52 3. PspAk1 4. PspAk7 5. PspAk6 6. PspAk8 7. PspKoÇ11 8. PspKoE2 9. PspKoE3 10. PspKoÇ6 11. Psp AnB6 12. PspAnB9 13. PspKaY7 14. PspKrKl7 15. Psp KrKl12 16. PspNi 1 17. PspNi2 18. PspNi4 19. PspSi3 20. PspSi4

5.TARTIŞMA

İç Anadolu Bölgesindeki 12 ilden (Ankara, Aksaray, Çorum, Eskişehir, Kayseri, Kırşehir, Kırıkkale, Konya, Nevşehir, Niğde, Sivas, Yozgat) 175 adet kuru fasulye tohumu örneği toplanılmıştır. İki adet orjinal *P. s. pv. phaseolicola* straini (NCPPB 52) ve (PSP6) ile karşılaştırmalı olarak yapılan biyokimyasal, moleküler ve patojenisite testleri sonucunda bölgede *P. s. pv. phaseolicola* etmeninin varlığı belirlenmiştir.

Literatür taramalarına göre *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*, *P. s. pv. phaseolicola*, *P. s. pv. syringae* ve *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* türlerine ait strainlerin birçok ülkede ekonomik kayıplara neden olan önemli fasulye patojeni oldukları rapor edilmiştir (Coyne ve Schuster, 1976; Schwartz ve Galvez, 1980; Schuster ve Coyne, 1981; Webster ve ark., 1983; Saettler, 1984; Park ve Dhanvantari, 1987; Goto, 1992; Rosas ve Young, 1992; Sigeo, 1993; Vidaver, 1993; Coyne ve ark., 1994; Hall, 1994; Howard ve ark., 1994; Agrios, 1997; Ranalli ve Parisi, 1998; Calzolari, 1999).

Türkiyenin farklı bölgelerindeki (İç Anadolu, Karadeniz, Ege ve Marmara bölgeleri) fasulye hastalıklarını belirlemek için çeşitli çalışmalar yürütülmüş ve fasulye bitkisinde *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*, *P. s. pv. phaseolicola*, *P. s. pv. syringae* ve *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*'in patojen oldukları saptanmıştır (Sönmezalp, 1966; Benlioğlu ve Özakman, 1993; Demir ve Gündoğdu, 1994; Kahveci ve Maden, 1994; Ertuğrul ve Güven, 1998; Bozkurt ve Soylu, 2001).

Faurie, (1998) Güney Afrikada fasulye üretim alanlarından 1128 bakteriyel izolatu izole etmiş ve bunların 967'sinin *P. s. pv. phaseolicola* olduğunu tespit etmiş, Ertuğrul ve Güven, (1998) Eskişehirdeki fasulye üretim alanlarından toplanan 36 fasulye tohumundan 120 floresan izolat elde etmiş bunların 92'sini *P. s. pv. phaseolicola* olarak tanılamışlardır.

Goto, (1992) *P. s. pv. phaseolicola*'nın % 50 oranında simptom sergilemeyen fasulye tohumlarıyla taşındığını saptamıştır. Bizimde çalışmamızda kullanılan İç Anadolu bölgesinden toplanan fasulye tohumlarının simptom sergilemediği

saptanmış ve toplanan 175 fasulye tohumundan 38 tanesinin *P. s. pv. phaseolicola* olduğu tespit edilmiştir.

Demir ve Gündoğdu, (1994) Ege Bölgesinde yemeklik baklagillerde görülen bakteriyel hastalıkların tespiti ve mücadelesi için yaptıkları çalışmalarda *P. s. pv. phaseolicola*'nın oranını %0,5-21,2 arasında olduğunu bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda da *P. s. pv. phaseolicola*'nın İç Anadolu Bölgesinde fasulye tohumlarıyla taşınma oranı %21 olarak belirlenmiştir.

Fasulye tohumlarından bakteriyel patojenlerin izolasyonu için, Taylor, (1970) kuru tohumların bir el değirmeninde öğütülerek toz haline getirilmesi ya da Van Vuurde ve ark., (1983) tohumların uzun süre düşük sıcaklıkta suda bekletilmesi yöntemlerini kullanmışlardır. *P. s. pv. phaseolicola* için hiçbir seçici ekstraksiyon solüsyonu olmadığı için suda bekletme işleminin düşük sıcaklıkta yapılması önerilmektedir. Ancak her örneğin öğütülmesi sonrasındaki sterilizasyonun yeterli olmamasından, uzun süreli suda bekletme test sonuçlarında yüksek saprofitik bulaşmadan dolayı yanlış sonuç verme riski taşımaktadır. Bu sebepten dolayı Saetler (1989) tohum sağlığı testlerinde tohumları akan musluk suyunda yıkadıktan sonra %2'lik NaOCl'de 6 dk tutmuş ve saf su ile durulamışlardır. Bizde çalışmamızda bu yöntem güvenilirliğinden dolayı tercih edilmiştir. Sands ve ark., (1980), Mohan ve Schaad, (1987) ekstraksiyon için tohumlar fosfat buffer saline konmuşlardır. Bizim çalışmamızda da fosfat buffer saline kullanılmış ve başarılı sonuçlar alınmıştır.

Günümüzde mikroorganizmaların tanısında her ne kadar moleküler tekniklerin kullanılması hızla yaygınlaşsa da klasik tanı teknikleri birçok araştırmacı için hala güncelliğini korumaktadır. Bunun en önemli nedeni ise tanılanmak istenen mikroorganizma gruplarının belirlenmesi ve takip eden moleküler çalışmalara hız kazandırmasıdır. Bu nedenle bizim çalışmamızda da izole edilen bakteriyel izolatların moleküler tanımlarının yanısıra morfolojik ve biyokimyasal karakterleri de belirlenmiştir.

Elde edilen *P. s. pv. phaseolicola* izolatlarına, biyokimyasal karakterlerden gram reaksiyon, amilaz, katalaz, oksidaz, pektinaz, levan üretimi, nitrat üretimi, fluoresan pigment üretimi, jelatini sıvılaştırma, karbon kaynaklarının kullanımı, eskulin hidrolizi, hidrojen sülfid oluşumu, nişastanın hidrolizi ve arginin üretimi testleri uygulanmıştır. Ayers ve ark. (1919), King ve ark. (1954), Kovacs (1956),

Sneath (1956), Thornley (1960), Dye (1962), Crosse ve Garrett (1963), Dye (1968), Fahy ve Persley (1983), Lelliot ve Stead (1987), Klement ve ark. (1990), Beaulieu ve ark. (1991), Bouzar ve ark. (1994), Demir ve Gündoğdu (1994), Saygılı (1995), Schaad (2001), Dönmez (2004), Rico ve ark. (2006) gram reaksiyon, arginin dihidrolaz, oksidaz, H₂S oluşumu, nitrat redüksiyon, jelatinin hidrolizi, karbon kaynaklarının kullanımı (D-mannitol, inositol, D-sorbitol, erithritol), arbutin, eskulin, nişastanın hidrolizi, pektinaz testlerini negatif, levan, katalaz, King B besiyerinde floresan pigment oluşumu testlerini ve tütünde HR testinin pozitif sonuç verdiğini bulmuşlardır. Amilaz testinin *Xanthomonas* ve *P. syringae* patovarylarının ayırımında, arginin üretiminin *P. syringae* patovaryları ile *P. fluorescens* in ayırımında floresan pigment üretiminin ise *Pseudomonas* ve *Erwinia* cinslerinin ayırımında önemli olduğu çeşitli çalışmalarla ortaya konulmuştur (Schwartz ve Galvez, 1980; Saettler, 1989; Goto, 1992; Hall, 1994; Howard ve ark., 1994; Narayanasamy, 1997; Ertuğrul ve Güven, 1998; Cerkauskas ve Brown, 2001; Basım, 2002). Çalışmamızda elde edilen 38 adet izolatin tamamının morfolojik ve biyokimyasal test sonuçları daha önce saptanan bulguları destekler bulunmuştur.

Saf olarak elde edilen izolatların patojenisiteleri, hassas dermason fasulye genotipine ait bitkiler üzerinde tamamlanan Koch postülatları ve tütün üzerinde yapılan HR testleri ile belirlenmiştir. Biyokimyasal ve moleküler yöntemlerle tanımlanan bütün *P. s. pv. phaseolicola* izolatlarımızın hem tütün bitkisinde HR testine hemde dermason fasulye genotipindeki patojenisite testine pozitif sonuç verdikleri belirlenmiştir.

Taylor, (1970); Lelliot ve Stead, (1987); Demir ve Gündoğdu, (1994); Güven ve ark., (2004); Dönmez, (2004) patojenisite testlerinde, fasulye bitkisi tohumları plastik saksılara dikmişler ve 10 gün boyunca serada muhafaza etmişlerdir. Yapılan çalışmalarda iki farklı inokulasyon tekniği uygulanmıştır. Birinci yöntem, bakteriyel süspansiyonu yaprak yüzeylerine püskürtülmesiyle ve ikinci yöntem ise bitki yapraklarını yavaşça az miktarda karborandum (silikon karbür) tozuyla aşındırarak ve bakteriyel süspansiyonla ovalayarak yaralamaktan ibarettir. Bitkiler büyüme odasında hastalık belirtileri görünene kadar 10 gün bekletilmiş ve yapraklarda sulanmış lekeler şeklinde ortaya çıkan lezyonlar, toksin üretimine bağlı olarak meydana gelen sarı haleler ve solup pörsüyerek kuruma belirtileri

gözlemlemişlerdir. Bizim çalışmamızda daha önceki yapılan çalışmaların sonuçlarını destekler bulunmuştur.

Moleküler tekniklerden DNA amplifikasyonu (PCR) son yıllarda bitki patojenlerinin kesin tanımlarının yapılmasında tercih edilen bir yöntemdir (Tenover, 1989; Visidi ve Yolken, 1987; Innis ve ark., 1990; Ehlich ve ark., 1991, Leite ve ark., 1995; Schaad ve ark., 1995; Jeng ve ark., 2001; Basım, 2002; Bej ve ark., 1991a; Bej ve ark., 1991b; Steffan ve Atlas, 1991). Mikrobiyal tanıda değişik PCR teknikleri kullanılabilir (Louws ve ark., 1994; Schaad ve ark., 1995; Arnold ve ark., 1996; Lee ve ark., 1997; Scortichini ve ark., 2001).

Tohumlarda ve bitkinin diğer kısımlarında, örneğin; hastalık bulgusu olmayan yapraklar, yaşayan bakteriyel patojenlerin saptanması çoğu zaman zor olmaktadır çünkü hedef organizma popülasyonu diğer bakterilerin miktarına göre genellikle azdır. Klasik izolasyon yöntemleri çok duyarlı olabilir ancak örneklerde çok az miktarda patojen ve yüksek sayıda diğer bakterilerden buluyorsa başarısızdır (Schaad, 1989). Serolojik teknikler hızlı ve ucuz olmasına rağmen genellikle duyarlılık ve bazı durumlarda özgüllükten yoksundur (Hampton ve ark., 1990). PCR teknolojisindeki yeniliklerle yüksek oranda başka mikroorganizmaların varlığında az miktardaki hedef mikroorganizmanın saptanmasında ciddi ilerleme kaydedilmiştir. Doğadan alınan bitki örneklerinde sıklıkla karşılaşılan, PCR inhibitörleri ve aşırı az miktarlarda örnek gerekliliğinden ortaya çıkan görece düşük duyarlılık, PCR yöntemini sınırlayıcı etkenden birkaçıdır (Rossen ve ark., 1992; Prosen ve ark., 1993; Schaad ve ark., 1999; Weller ve ark., 2000). BIO-PCR inhibitörlerinin sonuca etkisini azalttığı gibi hedef organizmanın canlı kültürünün tekrar elde edilebilmesi avantajına da sahiptir. Bu teknik genel ya da yarı-seçici besiyerinde gerçekleştirilen biyolojik büyütme ile doğrudan PCR yönteminin birleşimidir; DNA izolasyonuna gerek olmadığı gibi, hedef DNA'nın santrifüj etme aşamasına ihtiyaç yoktur. Genellikle, 0.1mL'lik örnekler sayıları 6-8 arasında değişen agar besiyeri kaplarının her birine ekilirler ve hedef organizmanın büyüme hızına bağlı olarak 24-72 saat arası değişen inkübasyon döneminden sonra büyümüş olan hücreler kapların yarısından suyla yıkanarak toplanır. Hedef organizmanın hücrelerini içeren toplanmış örnekler ya hemen PCR için kullanılırlar ya da daha sonra kullanılmak üzere -20°C'ye kaldırılır. BIO-PCR ın duyarlılığı klasik PCR yönteminden 10-100 kat arası

fazlalık gösterir (Schaad ve ark., 1995; Ito ve ark., 1998; Schaad ve Frederick, 2002). Ancak bu duyarlılık seviyesi bile, kontrol edilmiş ve/veya karantinaya alınmış çoğu zaman çok az sayılarda hastalık görülmeyen bölgelerde bulunan bitki patojenik bakterilerinin saptanması için yeterli değildir (Webster ve ark., 1983; Özakman ve Schaad, 2003).

Schaad ve ark. (1995), fasulye tohumlarında *P. s. pv. phaseolicola*'nın belirlenmesi amacıyla yaptıkları çalışmalarda klasik PCR metodu yerine uygulamış oldukları BIO-PCR metodunun, tohum üzerindeki ölü hücrelerin varlığından kaynaklanan pozitif sonuçları önlemesi, tohum ekstraktlarında bulunan potansiyel PCR engelleyici maddelerin varlığının elemine edilmesi, hastalık etmeninin belirlenmesinde hassasiyetin artışı ve amplifikasyon için DNA'nın ön ekstraksiyonuna ihtiyaç olmayışı gibi bazı önemli ve üstün özelliklerinden bahsetmişlerdir.

Yapılan başka bir çalışmada Güven ve ark. 2004, Schaad ve ark. (1995)'in phaseolotoxin geninin saptanması metodu değiştirerek uygulamışlar, 0.5 mL'lik hücre süspansiyonu 15 dakika kaynatılmış, 10 dakika 16110 g'de mikrosantrifüjle ayrıştırılmış, çökelti ayrılmış ve süpernatanttan 2 μ L'lik kısım çoğaltım için kullanılmıştır. Bizim çalışmamızda da bu modifiye yöntem kullanılmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir.

Schaad ve ark., (1995)'in da önerdiği gibi P 5.1 ve P 3.1 primerlerini kullanarak 500 bp da tek bant gözlemlemişlerdir. Yine Rico ve ark., (2006) İspanyada *P. s. pv. phaseolicola* strainlerinin multiplex PCR ile tanılanmasında P5.1-P3.1 primerlerini kullanmış ve 500 bp da bant oluşumu gözlemlemişlerdir. Bizim çalışmamızda da Schaad ve ark., (1995)' e göre King B besi yerine bakterilerin ekimi yapılmış besi yerleri steril destile su ile yıkanmış, DNA amplifikasyonu için P5.1-P3.1 primerleri kullanılarak 500 bp uzunluğunda birer adet bant elde edilmiştir. Bizim çalışmamızın sonuçlarında daha önce yapılan çalışmaların sonuçlarını destekler bulunmuştur. King B ortamını kullanmamızdaki amaç Pseudomonaslar için standart bir geliştirme ortamı olmasıdır.

İkinci olarak çalışmamızda kullandığımız HM6 ve HM13 primerleri Prosen ve ark., (1993), fasulye tohumundaki hale yanıklığı patojeni *P. s. pv. phaseolicola*'nın *tox* gen demetinin bir bölümünün amplifikasyonunu içermektedir

(Peet ve ark., 1986). Bu gen demetine göre tasarlanmış iki oligonükleotid primer, 1.9-kb'lik total DNA parçasının amplifikasyonunu sağlamıştır. Amplifikasyon sonucunda fasulye tohumunda bulunma olasılığı olan saprofitler ile fasulye patojenleri *P. s. pv. syringae* ve *Xanthomonas campestris pv. phaseoli*'nin DNA'ları belirtilen, 1.9-kblik bölümlerle aynı uzunlukta herhangi bir bant oluşturmamıştır. Çalışmamızda elde edilen *P. s. pv. phaseolicola* izolatu aynı doğrultuda sonuç vermişlerdir.

Yapılan çalışmalar moleküler metotların her birinin tanı için kendi başına yeterli olduğunu göstermiştir. Ancak tanı ve karakterizasyonda birden fazla metodun bir arada kullanılmasının sonuçların güvenilirliğini artırdığı ve bir metotla tespit edilemeyen özelliğin diğeriyle belirlenmesini sağladığı görülmüştür.

BIO-PCR ile fenol gibi zararlı kimyasalların kullanımından kaçınılır. DNA ekstraksiyonu prosedürlerinde hücreler kaybedilmez ve metod southern hibridizasyon ve DNA ekstraksiyonu basamaklarının eleminasyonundan dolayı daha az teknik gerektirir. Fasulye tohumu sertifikasyonunda patojenin ömrü hakkında yeterli bilgiye sahip olunmadığı durumda, canlı bakteri hücrelerinin varlığını belirlemek ayrıca önemli olmaktadır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

İç Anadolu Bölgesindeki 12 ilden (Ankara, Aksaray, Çorum, Eskişehir, Kayseri, Kırşehir, Kırıkkale, Konya, Nevşehir, Niğde, Sivas, Yozgat) toplanan 175 adet fasulye tohumu örneğinden toplam 112 adet fasulye bakteriyel patojeni izolat elde edilmiştir. İki adet orjinal *P. s. pv. phaseolicola* straini (NCPPB 52) ve (PSP6) ile karşılaştırmalı olarak yapılan biyokimyasal, moleküler ve patojenisite testleri sonucunda İç Anadolu Bölgesinden izole edilen fasulye bakteriyel etmenlerinden 38 adedi *P. s. pv. phaseolicola* olarak tanılanmıştır. Elde edilen bulgulara göre fasulyelerde haleli yanklık hastalığına neden olan *P. s. pv. phaseolicola* isimli etmenin İç Anadolu Bölegesinde ekimi yapılan fasulye tohumlarında taşınma oranının %21 olduğu belirlenmiştir.

Hastalıklar bitkisel ürünlerin verim ve kaliteleri üzerinde büyük kayıplara neden olmakta ve bu kayıplar depolama süresince devam etmektedir. (Çıtır ve Özer 1997; Döken ve ark., 2000). Zamanın öngördüğü tarımsal metodlarla daha fazla ürün elde etme çabası gösterilirken, bunların hastalık ve zararlılarından oluşan kayıplarının da daha düşük seviyede tutulması amaçlanmaktadır. (Toros ve Maden 1991). Bitki hastalıklarının oluşturduğu kayıplar bitki, ürün, patojen, bölge, çevre ve kontrol yöntemlerine bağlı olarak değişiklik göstermekte ve uygulanan kontrol yöntemleri kültürel, kimyasal ve biyolojik mücadele ve dayanıklı bitki kullanımı olmak üzere 4 kısımda toplanmaktadır (Bora ve Özaktan 1998; Döken ve ark., 2000).

Tohumla taşınan patojen *P. s. pv. phaseolicola* tüm dünyada yaygın olan tohum kaynaklı bir patojen olup, canlılığını toprak yüzeyinde kalan bitki dokularında uzun süre sürdürebilmektedir. Star ve Kercher, (1969) yaptıkları çalışmada bakterin hastalıklı bitki parçalarını yiyen kuzuların dışkılarında 9 ay canlılığını sürdürebildiğini ifade etmişlerdir. Tohum orjinli hastalıklara karşı en iyi mücadele temiz tohumluk kullanmaktır. Bu konuda tohum dezenfeksiyonu için çeşitli kimyasallar ve sıcak su uygulamaları önerilmektedir. Ancak tohum kabuğu altında bulunan bakterilere yeterince etkin olmamaktadır, sadece inokulum potansiyelini azaltmaktadır. Fasulye çeşitlerinin çoğunun sıcak suya karşı duyarlı olduğu

bilinmektedir ve hastalıkla mücadelede bu durumun göz önüne alınarak uygulamanın yapılması önerilmektedir.

Kültürel uygulamalar olarak;

- Hastalıkla bulaşık tarlalardan elde edilen tohumlar asla kullanılmamalıdır.
- Tohumluk üretimi hastalık için uygun olmayan bölgelerde, yani sıcak ve kurak bölgelerde yapılmalıdır.
- Ekim nöbeti uygulanmalı, ekimden önce tarla derin bir şekilde sürülmeli, bir önceki yıldan tarlada bırakılan hastalıklı bitki parçaları tarladan uzaklaştırılıp, yakılmalıdır.
- Hastalığa tolerant çeşitlerin üretimine yönelmelidir.
- Sekonder enfeksiyonları arttıran yağmurlama sistemi sulamadan mümkün olduğunca kaçınılmalıdır.
- Hastalığın bulaşık ekipmanla tarladan tarlaya geçişinde dikkatli olunmalıdır. Hastalığın kontrolü amacı ile karışık ekim önerilmektedir.

Kimyasal mücadele koruyucu, eradikant ve sistemik etkili pestisitlerin tohum, yaprak gibi bitki kısımlarına ya da toprak ve depoya uygulanmasıyla patojenlerin çoğalmasını inhibe eden veya onları öldüren, inokulum kaynaklarının yok edilmesini hedefleyen tekniklerden oluşmaktadır. Bakteriyel hastalıkların kontrolünde antibiyotik ve bakırlı kimyasal formülasyonların kullanılması yoluna gidilmiş, ancak kimyasal mücadelenin fitopatojen bakterilere karşı çok başarılı olmadığı tespit edilmiştir (Atthowe ve ark., 1992). Kimyasal mücadele kullanımının kolay ve etkisinin kısa sürede görülmesi nedeniyle üretici tarafından kolaylıkla kabul edilmiş ve yaygın olarak kullanılmıştır (Sigeo, 1993; Şahin ve Miller, 1996). Tarımsal savaşta kimyasalların kullanımı oldukça artmış ve bu durum mikroorganizmalarda dayanıklı ırkların gelişimi, bilinçsiz kullanım sonucunda ortaya çıkan ekonomik kayıplar, insanlarda akut ve kronik zehirlenmeler, çevre kirliliği, mikrobiyal flora içerisindeki interaksiyonların negatif etkilenmesi ve doğal dengenin bozulması gibi birçok olumsuz etkiyi de beraberinde getirmiştir (Bora ve Özaktan, 1998; Singh ve ark., 1998).

Hastalıkla mücadelede, bordo bulamacı, bakır oksiklorid, bakır sülfat gibi kimyasallarla hastalık kontrol edilmeye çalışılmış ancak bu yöntemler etkili ve pratik olamamıştır. Çeşitli antibiyotikler (Streptomisin, Penicilin, Aureomycin,

Chloromycetin, Neomisin ve Subtilin) denenmiş ve kısmen sonuç alınmıştır (Karaca, 1977) ve kimyasal mücadelede önerilmektedir.

P. s. pv. phaseolicola'nın kimyasal mücadelesinde bakır sülfat, bakır hidroksit ve potasyum Nhydroxymethyl-N-methyldithiocarbomate'in etkili fakat yeterli olmadığı tespit edilmiştir. Patojenlerde dayanıklı mutant oluşumuna yol açabilen antibiyotiklerin yapraklara uygulanmaması önerilmiştir (Saettler, 1989).

Yüzeysel dezenfeksiyonda tohumların %0,2 lik streptomisin solüsyonunda 2 saat bekletilmesi ile zarar oranının %20 lere kadar düştüğü belirlenmiştir (Taylor ve Dudley, 1977).

Bu yöntemlerin hepsi hastalığın yayılmasını ve zararını en aza indirmektedir, fakat kesin sonuç vermemektedir. Bu yöntemlerin yanında tohum sertifikasyon programları da uygulanmaktadır ve hastalığın yayılmasında ve zararın en aza indirgenmesinde etkili bir yol olarak görülmektedir.

Hastalıklara dayanıklı bitki kullanımı uzun vadede en etkili, en ekonomik ve sağlıklı mücadele stratejisidir (Schuster ve ark., 1983; Silva ve ark., 1989; Zaiter ve ark., 1989; Arnauld-Santana ve ark., 1993; Arnauld-Santana ve ark., 1994; Opio ve ark., 1996; Park ve ark., 1998). Son yıllarda moleküler biyoloji alanındaki yeni gelişmeler ile bitkilerde hastalık, zararlı ve kötü çevre koşullarına karşı saptanan dayanıklılık genlerinin kolayca ve kısa zamanda çok sayıda kültür bitkisine aktarılma imkanı veren bir teknoloji geliştirilmiştir (Transgenik bitki üretimi). Bu nedenle, zirai mücadele çalışmalarında da bakteriyel patojenlere karşı dayanıklılık geni bulunduran kültür veya yabancı bitki türlerinin belirlenmesi üzerine yapılan araştırmalar artmıştır (Schuster ve ark., 1983; Silvia ve ark., 1989; Zaiter ve ark., 1989; Arnauld-Santana ve ark., 1993; Arnauld-Santana ve ark., 1994; Steadman, 1994; Mabagala, 1997; Mohan ve ark., 1998; Park ve ark., 1998). Dayanıklılık çalışmaları bitki genotiplerinde var olan ve bir veya birden fazla gen tarafından kontrol edilen dayanıklılığın tespit edilmesi, bu dayanıklılığı veren genlerin klonlanması ve agronomik özellikleri çok iyi olan bitkilere klonlanan genlerin transferini içermektedir (Agrios, 1997).

Hastalığın meydana gelmesinde sıcaklık nem, ışık besin elementleri gibi çevresel faktörler, bitkinin çeşidi, yaşı, stomaların genişliği ve açık kalma süresi gibi bitkisel faktörler ve patojenlerin strain farklılıkları, inokulum miktarı,

konsantrasyonu gibi parazitik faktörler etkili olmaktadır. Patojen doğal açıklıklar ya da çeşitli şekillerde açılmış yaralardan bitkiye girmekte, simptom oluşumu patojenin bitki hücrelerinin interselüler boşluklarında ya da vasküler kısmında çoğalmasıyla ilişkili olarak meydana gelmektedir. Bakterinin kolonizasyonu uygun olmayan konukçularda (dayanıklı bitkilerde) sınırlı kalırken, hassas konukçularda populasyon devamlı artmakta ve doku ölümüne yol açmaktadır. Yapılan çalışmalar *P. s. pv. phaseolicola* ve *X. c. pv. phaseoli* nın hassas bitkilerde dayanıklı olanlardan çok daha fazla çoğaldığını ve bitkisinin vejetatif dönemde hastalıklara hassas olduğunu göstermiştir (Schuster ve Coyne, 1981).

Bakteriyel hale yanıklığı fasulye yetiştiriciliğinde önemli ekonomik kayıplara neden olan hastalıktır. Bu konuda yapılan çalışmalar patojenden ari tohum kullanıldığında bile ürün kaybının %50 veya daha fazla olduğunu göstermektedir (Laurence ve Reynold, 1982). Hastalığın başlamasında farklı inokulum kaynaklarının rol oynadığı belirlenmiştir (Schwartz ve Galvez 1980; Goto, 1992). Ancak tohum kontaminasyonunun patojenlerin yaşamlarını sürdürmelerinde (10–15 yıl), lokal ve geniş alanlara yayılmalarında oldukça etkili olduğu saptanmıştır (Cafati ve Saettler, 1980; Hall 1994). Bu nedenle hastalığın mücadelesi temiz tohum ve temiz alanlarda yetiştiriciliğe dayanmaktadır. Erken dönemde özellikle tohumdan olan bulaşmaları engellemek için koruyucu tedbirlerin (kültürel tedbirler ve karantina) alınması önem taşımaktadır. Tohumdan bulaşmayı önlemek için sağlam, sertifikalı ve hastalığa dayanıklı tohumların kullanılması gerekmektedir (Yu ve ark., 1998). Bazı bakırlı preparatların (bakır hidroksit, potasyum metilditiyokarbamat) uygulanması hastalık gelişimini azaltmada etkili olsa da bazı dayanıklı patojen streynlerinin ortaya çıkması gibi sorunları beraberinde getirmektedir (Singh ve Munoz, 1999). Bütün bakteriyel hastalıklarda olduğu gibi fasulye hale yanıklığı ile etkili mücadelede de kimyasal uygulamaların yetersiz olduğu bilinmekte ve mümkünse dayanıklı çeşit ve temiz tohumluk kullanımı tavsiye edilmektedir (Taylor ve ark., 1996; Varela ve ark., 1996; Ariyaratne ve ark., 1998; Rodriguez, 1999). Bu nedenle zirai mücadele çalışmalarında da bakteriyel patojenlere karşı dayanıklı geni bulunduran kültür veya yabani bitki türlerinin belirlenmesi üzerine yapılan araştırmalar artmıştır (Schuster ve ark., 1983; Silvia ve ark., 1989; Zaiter ve ark., 1989; Scott ve Michaels, 1992; Arnauld-Santana ve ark., 1993; Arnauld-Santana ve ark., 1994; Park ve ark., 1998;

Qadous ve Khlaif, 1998; Yu ve ark., 1998; Park ve ark., 1999; Singh ve Munoz, 1999; Urrea ve ark., 1999). Bugün birçok patojenin kültür koleksiyonu yapılmakta ve bu kültürlere karşı dayanıklı geni taşıyan konukçu gen kaynaklarının koleksiyonu oluşturulmaktadır (Mabagala, 1997; Urrea ve ark., 1999; Ariyaratne ve ark., 1999; Jung ve ark., 1999, Park ve ark., 1999). Daha önce yapılan çalışmalardan elde edilen bulgulara göre fasulye hale yanıklığı hastalığı dayanıklılık mekanizması, konukçu-patojen patosistemlerindeki görülen genetik farklılıklar ve uyumsuzluk ile ilişkilidir (Coyne ve ark., 1973; Coyne ve Schuster, 1983; Adams ve ark., 1988; Zaiter ve ark., 1989; Aggour ve ark., 1989; Zapata ve ark., 1992; Taylor ve ark., 1996; Varela ve ark., 1996).

7. KAYNAKLAR

- Adams, M. W., Kelly J. D. And Saettler W. A., 1988. Agene for Resistance to Common Blight. Annual Report of the Bean Improvement Cooperative. Vol. 31, p73.
- Agarwal, V.K.; Sinclair, J.B., 1997. Principles of seed pathology, 2.ed. Boca Raton: CRC, 538p.
- Aggour, A. R., Coyne D. P., Vidaver A. K., 1989. Comparison of Leaf and pod Disease Reaction Of Beans Inoculated by Different Methods with Strains of *X. c. pv. phaseoli* dye. *Euphytica*, 43(7), 143-152.
- Agrios, M. G., 1997. Plant Pathology. Academic Pres, Inc., P635.
- Anonim, 1986. CIAT Annual Report Of Bean Production Program. Centro International De Agricultural Tropical. Cali, Colombia.
- Anonim, 1993. Eskişehir Yemeklik Dane Baklagil Grubu, Kuru Fasulye Islahı Ve Yetiştirme Teknikleri Semineri, Eskişehir.
- Anonim, 1997. Akdeniz İhracatçılar Birliği Genel Sekreterliği Baklagil Raporu (Türkiye Ve Dünya). 38.
- Anonim, 2008. www.ktae.gov.tr
- Anonim, 2008a. www.alata.gov.tr
- Anonim, 2009a. www.konyatarim.gov.tr
- Anonim, 2009b. www.tuik.gov.tr
- Arda M, 1994. *Biyoteknoloji (Bazı Temel İlkeler)*. İkinci baskı. Ankara: Kükem Derneği Bilimsel Yayınları. No:2
- Arı, Ş., 1999. DNA nın Polimeraz Zincir Reaksiyonu İle Çoğaltılması. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. İstanbul Üniv. Biyoteknoloji Ve Genetik Mühendisliği Araştırma Ve Uygulama Merkezi (BİYOGEM). Yayın No: 1, P 57-68.
- Ariyaratne, H. M. Coyne D. P., Vidaver A. K. and Eskridge K. M., 1998. Selection for Common Bacterial Blight Resistance in Common Bean: Effects of Multiple Leaf Inoculation and Detached Pod Inoculation test. *J. Ame. Soc. Sci.*, 123 (5), 864-867.

- Ariyaratne, H. M., Coyne, D. P., Jung G., Skroch P. V., Vidaver A. K., Steadman J. R., Miklas P. N. And Bassett M. J., 1999. Molecular Mapping of Disease Resistance Genes for Halo Blight, Common Bacterial Blight and Bean Common Mosaic Virus in a Segregating Population of Common Bean. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 124 (6), 654-662.
- Arnauld-Snatana, E., Mmbaga M. T., Coyne D. P. and Steadman J. R., 1993. Source of Resistance to Common Bacterial Blight and Rust in Elite *Phaseolus vulgaris* L. *Germplasm. HortScience*, 28 (6), 644-646.
- Arnauld-Santana, E., Coyne D. P., Eskridge K. M. and Vidaver A. K., 1994. Inheritance Low Correlations of Leaf, Pod and Seed reaction to Common Blight Disease in Common Beans; and Implication for Selection. *J. Amer. Sor. Hort. Sci.*, 119 (1), 116-121.
- Arnold, D. L., Athey-Pollard A., Gibbon M. J., Taylor J. D. And Vivian A., 1996. Specific Oligonucleotide Primers for the Identification of *P. s. pv. pisi* Yield One of Two Possible DNA Fragments by PCR Amplification: Evidence for Phylogenetic Divergence. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 49, 233-245.
- Atthowe, H., Gilkeson A. L., Kite L. P., Michalak P. S., Pleasant B., Reich I. And Scheider A. F., 1992. *The Organic gardener's Handbook of Natural Insect and Disease Control*. St. Martin's Pres, p187.
- Audy, P., Braat, C. E., Laroche, A., Saindon G., Huang, H. C. And Gilbertson R. L., 1996. A Rapid And Sensitive PCR-Based Assay For Concurrent Detection Of Bacteria Causing Common And Halo Blights In Bean Seed. *Phytopathology*, 86, 361-366.
- Audy, P., Laroche A., Saindon G., Huang H. C. And Gilbertson R. L., 1994. Detection Of The Bean Common Blight Bacteria, *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* And *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* var. *fuscans*, Using The Polymerase Chain Reaction. *Phytopathology*, 84, 1185-1192.
- Ayers, S. H., Rupp, P. and Johnson, W. T., 1919. A Study of The Alkali-Forming Bacteria in Milk. *U. S. Dept. of Agric. Bull.* 782: 1-39.

- Basım, E., 2002. Isparta ve çevresindeki Sera Domateslerinde görülen bakteriyel paojenlerin belirlenmesi. Süleyman Demirel Üniv. Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 6; 2, 1-8.
- Beaulieu, C., Minsavage, G. V., Canteros B. I. and Stall, R. E., 1991. Biochemical and Genetic Analysis of a Pectate Lyase Gene from *X. c. pv. vesicatoria*. Molec. Plant-microbe Interact. 4, 446-451.
- Bej, A. K., Dicesare, J. L., Half, L. and Atlas R. M., 1991a. Detection Of *Escherichia Coli* And *Shigella* Spp. In Water Using The Polymerase Chain Reaction And Gene Probes For Uid. Appl. Environ. Microbiol. 57: 1013-1017
- Bej, A. K., Mahbubani, M. H., and Atlas, R. M. 1991b. Amplification Of Nucleic Acids By Polymerase Chain Reaction (PCR) And Other Methods And Their Applications. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 26:301-334.
- Benlioğlu, K., Özakman, M., 1991. Fasulyelerde Hale Lekesi Etmeni *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* nın Serolojik Teşhisi Üzerine Çalışmalar, VI. Türkiye Fitopatoloji Kongresi, İzmir.
- Benlioğlu, K., and Özakman M., 1993. Evaluation Of Two Serological Methods For The Identification Of Halo Blight Pathogen (*Pseudomonas Syringae* Pv. *phaseolicola*) Of Beans. J. Turk Phytopath., 23, 75-84.
- Benlioğlu, K., Özakman M., and Önceler Z., 1994. Bacterial Blight Of Beans In Türkiye And Resistance To Halo Blight And Common Blight. 9th Congress Of The Mediterranean Phytopathological Union, September 18-24 1994, Kuşadası, Aydın, 547-550.
- Bora, T. Ve Özakman H., 1998. Bitki Hastalıklarıyla Biyolojik Savaş. Prizma Matbaası, s205.
- Bouzar, H., Jones J. B., Stall R. E., Hodge N. C., Minsavage G. V., Benedict A. A. and Alvarez A. M., 1994. Physiological, Chemical, Serological and Pathogenic Analyses of a Worldwide Collection of *X. c. pv. vesicatoria*. Phytopathology, 84, 663-671.
- Bozkurt, İ. A. Ve Soylu, S., 2001. Farklı Fasulye Çeşitlerinin Fasulye Hale Yanıklığı Etmeni *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* Irklarına Karşı Gösterdiği

- Reaksiyonların Belirlenmesi. Türkiye IX. Fitopatoloji Kongresi, 3-8 Eylül 2001, Tekirdağ, S506-515.
- Cafati, C. R. And Saettler A. W., 1980. Transmission *X. phaseoli* in Seed of Resistant and Susceptible Phaseolus Genotypes. *Phytopathology*, 70, 638-640.
- Calzolari, A., 1999. Halo And Common Spot Of Beans. *Review Of Plant Pathology*, 77, Ref. 416.
- Cerkauskas, R. F. And Brown J., 2001. Bacterial Stem and Peduncle Canker of Greenhouse Pepper. *Can. J. Plant Pathology*, 23, 300-306.
- Coyne, D. P., Schuster M. L. And Hill K., 1973. Genetic Control of Reaction to Common Blight Bacterium in Bean as Influenced by Plant Age and Bacterial Multiplication. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 98(1), 94-99.
- Coyne, D. P And Schuster M. L., 1976. Great Northern Star Dry Bean Tolerant To Bacterial Disease. *Hortscience* 11 (6), 621.
- Coyne, D. P. and Schuster M. L., 1983. Genetics Of And Breeding For Resistance To Bacterial Pathogens In Vegetable Crops. *Hortscience*, 18(1), 30-36.
- Coyne, D. P., Nuland D. S. and Lindgren D. T., 1994. The Effect Of Populations *Xanthomonas Campestris* Pv. *Phaseoli* In Bean Reproductive Tissues On Seed Infection Of Resistant And Susceptible Bean Genotypes. *European Journal Of Plant Pathology*, 103 (2), 175-181.
- Crosse, J. E. and Garrett, C. M., 1963. Studies on the Bacteriophagy of *P. morsprunorum*, *P. syringae* and Related Organism. *J. Appl. Bacteriol.* 26: 159-177.
- Çıtır, A. Ve Özer Z., 1997. Fitopatoloji. Gazi Osman Paşa Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Ders Notları Serisi, S186.
- Demir, G. And Gündoğdu M., 1994. Bacterial Diseases Of Food Legumes In Aegean Region Of Türkiye And Effectivity Of Some Seed Treatments Against Bean Halo Blight. *J. Turk. Phytopath.*, 23, 57-66.
- Döken, M. T., Demirci E. Ve Zengin H., 2000. Fitopatoloji. Atatürk Üniversitesi Yayınları No: 729, Ziraat Fakültesi Yayınları No: 314, Ders Kitapları Seri No: 66, S256.

- Dönmez, M. F., 2004. Erzurum Ve Erzincan İllerinde Fasulye Bitkisinde (*Phaseolus vulgaris* L.) Görülen Bakteriyel Hastalık Etmenlerinin Tanılanması Ve *Pseudomonas syringae* Pv. *phaseolicola* Ve *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* ye Karşı Çeşitli Fasulye Genotip/Varyetelerinin Duyarlılıklarının Belirlenmesi. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, S297.
- Dye, D. W., 1962. The Inadequacy Of The Usual Determinative Tests For The Identification Of *Xanthomonas* spp. N. Z. J. Sci. 5: 393-416.
- Dye, D. W., 1968. A Taxonomic Study Of The Genus *Erwinia*. I. The 'amylovora' group. New Zealand J. Sci. 11: 590-607.
- Ehlich, H. A., Gelfand, Da., And Sninsky, J.J. 1991. Recent Advances In The Polymerase Chain Reaction. Science 252: 1643-1651.
- Epton, H. A. S. Ve Deverall, B. J., 1965. Physiological Races Of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* Causing Halo Blight Of Beans. *Plant Pathol.*, 14:53-54.
- Erkan, S., 1998. Tohum Patolojisi. Gözdem Ofis, İzmir, 275 S
- Ertuğrul, D. and Güven K., 1998. Serological Properties Of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* Isolates Collected From Eskişehir. Tr. Journal Of Biology. 22, 189-195.
- Fahy, P. C. and Persley, A. C., 1983. Media and Methods for Isolation and Diagnostic Tests. A Diagnostic Guide (EDS: P. C. Fahy and G. J. Persley), Academic Pres, Australia, 337-378.
- Faurie, D., 1998. Characterization Of Halo Blight Races On Dry Beans In South Africa. *Plant Disease*, 82 (3), 307-310.
- Ferguson, W., Lyall L. H., and Jasmin J. J.. 1955. Breeding work with beans. Rev. Appl. Micol. **35**:421.
- Fratamico P. M, Schultz F. J, Buchanan R. L, 1992. Rapid Isolation Of *Escherichia coli* 0157:H7 From Enrichment Cultures Of Foods Using An Immunomagnetic Separation Method. *Food Microbiology* **9**, 105–13.
- Goss, R. W. 1940. The Relation Of Temperature To Common And Halo Blight Of Beans. *Phytopathology* 30:258-264

- Goto, M., 1992. Fundamentals Of Bacterial Plant Pathology. Academic Pres, California, Inc., P635.
- Guthrie, J. W., and Fenwick, H. S. 1967. Pathogenicity Of Idaho Isolates Of *Pseudomonas Phaseolicola*. Plant Dis. Rep. 51:591-593.
- Guthrie, J. W., Huber, D. M., and Fenwick, H. S. 1965. Serological Detection Of Halo Blight. Plant Dis. Rep. 49: 297-299.
- Güven, K., 2000. Bacteriocin Typing of Some Turkish Isolates of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* Turk J. Biol. 24. 795 S.
- Güven K, Jones J. B., Momol M. T. And Dickstein E. R., 2004. Phenotypic And Genetic Diversity Among *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. J. Phytopathology 152, 658–666.
- Hagedorn, D. J. And Inglis D. A., 1986. Handbook Of Bean Disease, Wisconsin, P28.
- Halitligil, M. B., S. Antep, A. Akın, H. Öner toy, H. Kışlal, H., Şirin Ve C. Şirin, 2002. Toprak Verimliliği Ve Bitki Besleme Araştırmalarında Kullanılan İzotop Ve Radyasyon Teknikleri.TAEK-ANTHAM Nükleer Tarım Radyoizotop Uygulama Bölümü, Seminer Notları, S, 31.
- Hall, R., 1994. Compendium Of Bean Diseases. APS Pres, St, Paul, Minnessota, P73.
- Hampton R, Ball E, De Boer S, Eds, 1990. *Serological Methods For Identification And Detection Of Viral And Bacterial Plant Pathogens. A Laboratory Manual*. St. Paul, MN, USA: APS Press.
- Hartung, F., Werner R., Muhl bach, H. P. and Buttner C., 1998. Highly Specific PCR Diagnosis To Determine *Pseudomonas solanacearum* Of Differnt Geographical Origins. Theoretical And Applied Genetics, 96 (6-7), 797-802.
- Howard, R. J., Garland J. A. and Seaman W. L., 1994. Diseases And Pests Of Vegatable Crops İn Canada. The Canadian Phytopathological Society, Canada, P554.
- Hyman, L. J., Birch P. R. J., Dellagi A., Avrova A. O. and Toth I. K., 2000. A Competitive PCR-Based Methods For The Detection And Quantification Of *Erwinia Caratovora* subsp. *atroseptica* On Potato Tubers. The Society For Applied Microbiology, 30, 330-335.

- Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J.J. And White, T. J. 1990. *PCR Protocols*. Academic Pres, New York.
- Ito S, Ushijima Y, Fujii Y, Tanaka S, Kameya-Iwaki M, Yashiwaru S, Kishi F, 1998. Detection Of Viable Cells Of *Ralstonia solanacearum* In Soil Using A Semi-Selective Medium And A PCR Technique. *Journal Of Phytopathology* 146,369–84.
- Jansing, H., and Rudolph, K., 1990. A Sensitive And Quick Test For Determination Of Bean Seed Infestation By *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *J. Plant Dis. Prot.* 97:42-55.
- Jeng, R. S., Svircev A. M., Myers A. L., Beliaeva L., Hunter D. M. And Hubbes M., 2001. the use of 16S-23S rDNA to easily detect and Differentiate Common Gram Negative Orchard Epiphytes. *Journal of Microbiological Methods*, 44, 69-77.
- Jung, G., Schroeder P. W., Nienhuis J., Coyne D. P. Arnault-santana E., Ariyaratne H. M., and Marita J. M., 1999. Confirmation of QTL Associated with Common bacterial Blight Resistance Four Different Genetic Back-Grounds in Common Bean. *Crop Science*, 39, 1448-1455.
- Kahveci, E. And Maden S., 1994. Detection Of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* And *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* By Bacteriophages. *J. Turk Phytopath.*, 23, 79-85.
- Karaca, I. *Fitobakteriyoloji Ve Bakteriyal Hastalıklar*, Ege Üniversitesi Matbaası, Bornova-Izmir, 270 1977.
- King, E. O., Ward, M. K. and Raney, D. E., 1954. Two Simple Media for the Demonstration of pyocyanin and Fluorescence. *Journal of Laboratory and Clinical medicine*, 44, 301-307.
- Klement, Z., 1963. Rapid Detection of the Pathogenicity of Phytopathogenic *pseudomonads*. *Nature* 199: 299-300.
- Klement, Z., Farkas G. L. And Lourekovich L., 1966. Hypersensitive Reaction Induced by Phytopathogenic Bacteria in tobacco leaf. *Phytopathology*, 54, 474-477.
- Klement, Z., Rudolph, K., Sands, D. C., 1990. *Methods In Phyto bacteriology*, Akademia Kiado, Budapest, XIV+568s.

- Kovacs, N., 1956. Identification Of *Pseudomonas pyocyanea* By Oxidase Reaction. Nature, London, 170,173.
- Laurence, J. A. and Reynolds K. L., 1982. Effects to COncentration of Sulfur Dioxide and Other Characteristic of Exposure on the development of Lesions Caused by *X. phaseoli* in Red Kidney Bean. Phytopathology, 72, 1243-1246.
- Lee, I. M., Bartoszyk I. M., Gundersen D. E., Mogen B. And Davis R. E., 1997. nested PCR for Ultrasensitive Detection of the Potato Ring Rot Bactrium, *C. m. subsp. Sepedonicus*. Applied and Enviromental Microbiology, 63 (67), 2625-2630.
- Leite, R. P., Jones J. B., Somodi, G. C., Minsavage G. V. and Stall R. E., 1995. Detection Of *Xanthomonas campestris* Pv. *vesicatoria* Associated With Pepper And Tomato Seed By DNA Amplification. Plant Disease, 79 (9), 917-922.
- Lelliot, R. A. and Stead, D. E., 1987. Methods For The Diagnosis Of Bacterial Diseases Plants. Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK.
- Louws, F. J., Fulbright D. W., Stephens C. T. and De Bruijn F. J., 1994. specific Genomic Fingerprinting of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* Pathovars and Strains Generated with Repetitive sequences and PCR. Applied and Enviromental Microbiology, 60 (7), 2286-2295.
- Lydon, J. and Pattreson C. D., 2001. Detection Of Tabtoxin Producing Strains Of *Pseudomonas syringae* By PCR. Letters In Applied Microbiology, 32 (3), 166-170.
- Mabagala, R. B., 1997. The Effects of Population *X. c. pv. phaseoli* in Bean Reproductive Tissues on Seed Infection of Resistance and Susceptible Bean Genotypes. European Journal of Plant Pathology, 103, 175-181.
- Maddox D. A., 1998. Implication Of New Technologies For Seed Health Testing And The Worldwide Movement Of Seed. Seed Science Research, 8, 227-284.
- Maes, M., 1993. Fast Classification Of Plant-Associated Bacteria In The *Xanthomonas* Genus. Federation Of European Microbiology Societies, 113, 161-165.
- Maude, R.B., 1996. Seedborne Diseases And Their Control, Principles And Practise. CAB International, Wallingford, England, XVII+280 P.

- Miller, S. A. And Joaquim T. R., 1993. Diagnostic Techniques For Plant Pathogens. Biotechnology In Plant Disease Control, P321-339.
- Mohan, N., Aghora T. S. and Somkuwar R. G., 1998. Identification of French Bean lines Resistant to bacterial Blight. Review of Plant Pathology, 77, ref. 4847.
- Mohan, S. K., Schaad, N. W., 1987. An Improved Agar Plating Assay For Detection *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* And *Pseudomonas syringae* Pv. *phaseolicola* In Contaminated Bean Seed. Phytopathology 77: 1390-1395.
- Narayanasamy, P., 1997. Plant Pathogen detection and disease Diagnosis. P331.
- Opio, A. F., Allen D. J. And Teri J. M., 1996. pathogenic Variation in *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*, the Causal Agent of Common Bacterial Blight in Phaseolus Beans. Plant Pathology, 45, 1126-1133.
- Özakman M, Schaad N. W, 2003. A Real-Time BIO-PCR Assay For Detection Of *Ralstonia solanacearum* Race 3, Biovar 2, In Asymptomatic Potato Tubers. *Canadian Journal Of Plant Pathology* 25, 232-9.
- Park, S. J. And dhanvantari, B. N., 1987. Transfer of Common Blight (*X. c.* pv. *phaseoli*) Resistance from *Phaseolus coccineus* to *P. vulgaris* L. Through Interspecific Hybridization. Can. J. Plant Sci., 67, 685-695.
- Park, S. O., Coyne D. P., Dursun A. and Jung G., 1998. Identifying Randomly amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers Linked to Major genes for Common Bacterial Blight Resistance in Tepary Bean. J. Amer. Soc. Hort. Sci., 123 (2), 278-282.
- Park, S. O., Coyne D. P., Mutlu N., Jung G. And Steadman J. R., 1999. confirmation of Molecular Markers and Flower Color Associated with QTL for Resistance to Common Bacterial Blight In Common Bean. J. Amer. Soc. Hort. Sci., 124 (5), 519-526.
- Pascula, C., Lawson, P. A., Farrow J. A. E., Gimenez M. N. and Collins M. D., 1995. Phylogenetic Analysis Of The Genus *Corynebacterium* Based 16S Rrna Gene Sequences. International Journal Of Systematic Bacteriology, 45 (4), 724-728.
- Pastrik, K. H. and Rainey F. A., 1999. Identification And Differation Of *Clavibacter michiganensis* pv. *michiganensis* By Polimerase Chain Reaction Based Techniques. Journal Phytophology, 147, 687-693.

- Patel, P. N., and Walker, J. C. 1965. Resistance In *Phaseolus* To Halo Blight. *Phytopathology* 55:889-894.
- Peet, R. C., Lindgren, P. B., Willis, D. K., and Panopoulos, N. J., 1986. Identification And Cloning Of Genes Involved In Phaseolotoxin Production By *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *J. Bacteriol.* 166: 1096-1105.
- Ponsonnet, C. and Nemse X., 1994. Identification Of Agrobacterion Strains By PCR-RFLP Analysis Of PTI And Chromosomal Region. *Archives Of Microbiology*, 161 (4), 300-309.
- Prosen, D., Hatziloukas, E., Panopoulos, N. J., and Schaad N. W. 1990a. Direct Detection Of The Halo Blight Pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* In Bean Seeds By DNA Amplification. *Phytopathology* 81:1159.
- Prosen, D., Hatziloukas, E., Panopoulos, N. J., and Schaad N. W. 1990. A Tox Gene DNA Amplification Technique For Detection Of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. Page 80 In: Proc. Int. Symp. Mol. Genet. Plant-Microbe Interact., 5th. (Abstr.) M. Göttfert, H. Hennecke, And H. Paul, Eds. Mikrobiologisches Institute Eid-Genossische Technische Hochschule, Zurich, Switzerland.
- Prosen, D., Hatziloukas, E., Panopoulos, N.J., and Schaad, N.W., 1991. Direct detection of the halo blight pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in bean seed by DNA amplification. *Phytopathology*, 81: 1159 .
- Prosen D, Hatziloukas E., Schaad N. W., Panopoulos N. J., 1993. Specific Detection Of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* DNA In Bean Seed By Polymerase Chain Reaction-Based Amplification Of A Phaseolotoxin Gene Region. *Phytopathology* 83, 965-70.
- Qadous, N. And khlaif K., 1998. Common Blight of Bean in the Jordan Valley: Disease Development and Response of Different Host Cultivars to the Disease. *Review of Plant Pathology*, 77, Ref. 424.
- Ranalli, P. And Parisi, B., 1998. Viral And Bacterial Disease Of French Beans. *Review Of Plant Pathology*, 77, Ref. 416.
- Rico, A., Erdozain1, M., Ortiz-Barredo, A., Ruiz de Galarreta J. I. and Murillo J., 2006. Short communication. Detection by multiplex PCR and

- characterization of nontoxigenic strains of *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola from different places in Spain. Spanish Journal of Agricultural Research (2006) 4(3), 261-267
- Rodriguez, O., Faure B., Benitez R., Carballo R. M. and Capote J., 1999. Advances in Study Common Bean Resistance to Bacterial Disease in Cuba. Review of Plant Pathology, 78, Ref. 6231.
- Rosas, J. C. And Young R. A., 1992. Response To Selection For Resistance To Common Bacterial Blight In Beans. Annual Report Of The Bean Improvement Cooperative, Vol:35, 86-87.
- Rossen L, Norskov P, Holmstron K, Rasmussen OF, 1992. Inhibition Of PCR By Components Of Food Samples, Microbial Diagnostic Assays And DNA-Extraction Solutions. *International Journal Of Food Microbiology* 17, 37-45.
- Saettler, A. W., 1984. The Michigan Bean Seed Testing Program For The Detection Of Internally- Borne Blight Bacteria. Report Of The Bean Improvement Cooperative, Vol. 27, March, 49-50.
- Saettler, A. W., 1989. Common Bacterial Blight In: Bean Production Problems In The Tropics (H. F. Schwart, M. A. Pastor-Corrales Eds.) Centro International De Agriculture Tropical, Chapter 11, 261-319.
- Saettler, A.W., 1994. Bacterial Brown Spot, Halo Blight and Common Bacterial Blight In Compendium Of Bean Diseases (Hall, R., Edt). APS Pres, The American Phytopathological Society, 73 P.
- Sands, D. C., Schroth, M. N., and Hildebrand, D. C., 1980. Pseudomonas. Pages 36-44 In: Laboratory Guide For Identification Of Plant Pathogenic Bacteria. N. W. Schaad, Ed. American Phytopathological Society, St. Paul, Mn. 72 Pp.
- Santos, M. S., Cruz L., Norskov P. and Rasmussen O. F., 1997. A Rapid Sensitive Detection Of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in Tomato Seeds By Polimerase Chain Reaction. Seed Science And Technology, 25 (3), 581-584.
- Saygılı, H., 1995. Fitobakteriyoloji. Ege Üniv. Ziraat Fak., Bitki Koruma Böl., Bornova-İzmir, s208.
- Saygılı, H., Şahin, F., Aysan Y., 2008. Bitki Bakteri Hastalıkları. Meta Basım, İzmir, 317s.

- Schaad, N. W., 1988. Laboratory Guide to Identification of Plant Pathogenic Bacteria. APS (2nd. Ed. 1988). St. Paul, Minnesota.
- Schaad NW, Berthier-Schaad Y, Sechler A, Knorr D, 1999. Detection Of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* In Potato Tubers By BIO-PCR And Automated Real-Time Fluorescence Detection System. *Plant Disease* **83**, 1095–100.
- Schaad N. W., Frederick RD, 2002. Real-Time PCR And Its Application For Plant Disease Diagnosis. *Canadian Journal Of Plant Pathology* **24**, 250–8.
- Schaad, N. W., Azad, H., Peet, R. C., and Panopoulos, N. J., 1989. Identification Of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* By A DNA Hybridization Probe. *Phytopathology* 79: 903-907.
- Schaad, N. W., Jones, J. B. and Chun, W., 2001. Laboratory Guide For Identification Of Plant Pathogenic Bacteria.
- Schaad, N. W., Cheong, S., Tamaki, S., Hatziloukas, E. and Panopoulos N. J., 1995. A Combined Biological And Enzymatic Amplification (BIO-PCR) Technique To Detect *Pseudomonas Syringae* Bp *Phaseolicola* In Bean Seed Extracts. *Phytopathology*, 85, 243-248.
- Schneider, B. J., Zhao J. and Orser C. S., 2002. Detection Of *Clavibacter Michiganensis* Subsp. *Sepedonicus* By DNA Amplification. Idaho Agricultural Expt. Station Journal Article No: 9055.
- Schuster, M. L. and Coyne, D. P., 1981. Biology, Epidemiology, Genetics And Breeding For Resistance To Bacterial Pathogens Of *Phaseolus Vulgaris* L. *Horticultural Reviews*, Vol:3 (28-59).
- Schuster, M. L. and Smith C. C., 1983. Variability Of *Xanthomonas phaseoli* From Dominican Republic. Report Of The Bean Improvement Cooperative. No. 26, March, 37-38.
- Schwartz, H. F. and Galvez G. E., 1980. Bean Production Problems. Colombia, P424.
- Schwartz, H. F., 1989. Bean Production Problems In The Tropics, C.I.A.T, Colombia, P.285-301.
- Scortichini M., Marchesi U. and Di Prospero P., 2001. Genetic Diversity of *X. Arboricola* pv. *Juglandis* strains from Different Geographical Areas Shown

- by RepEtitive Polymerase Chain Reaction Geenomic Fingerprinting. *J. Phytopathology*, 149, 325-332.
- Scott, M. E. and Michaels T. E., 1992. Xanthomonas Resistance of Phaseolus Interspecific Cross Selection Confirmed by Field Performance. *HortScience*, 27 (4), 348-350.
- Sigee, D. C., 1993. Bacterial Plant pathology Cell and Molecular aspect. Cambridge Univ. Pres, p325.
- Silva, D. C., Singh S. P. and Pastor-Corales M. A., 1989. Inheritance of Resistance to Bacterial Blight in Common Bean. *Theoretical and Applied Genetics (TAG)*, 78, 619-624.
- Singh, S. P., Cardona C., Morales F. J., Pastor-Corrales M. A. and Voysest O., 1998. Gamete Selection for Upright Carioca Bean with Resistance to five Disease and a Leafhopper. *Crop Science*, 38 (3), 666-672.
- Singh, S. P. and Munoz C. G., 1999. Resistance to Common Bacterial Blight Among Phaseolus Species and Common Bean Improvement. *Crop Science*, 39, 80-89.
- Skjerve E, Olsvik O, 1991. Immunomagnetic Separation Of *Salmonella* From Foods. *International Journal Of Food Microbiolology* 14, 11–18.
- Slack, S. A., Drennan, J. L., Westra A. A. G., Gudmestad, N. C. And Oleson A. E., 1996. Comparison Of PCR, ELISA And DNA Hybridization For The Detection Of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* İn Field Grown Potatoes. *Plant Disease*, 80 (5), 519-524.
- Smith, I. M., Dunez, J., Lelliott, R. A., Philips, D. H. And Archer, S. A., 1986. *European Handbook Of Plant Diseases*, 583s.
- Sneath, P. H. A., 1956. Cultural and Bipchemical Characteristics of the genus Chromobacterium *J. Gen. Microbiol.* 15: 70-98.
- Sönmezalp, Ş., 1966. Fasulyelerde Önemli İki Bakteri Hastalığı (*Corynebacterium flaccumfaciens* ve *Xanthomonas phaseoli*). *Bitki Koruma Bülteni*, Cilt: 6, No:3, 103-110.
- Star, G. H., Kercher, C. J., 1969. Passage of *Pseudomonas phaseolicola* in bean Plants Through Sheep, *Phytopath.*, 59.

- Staskawicz, B. J., and N. J. Panopoulos. 1979. A Rapid And Sensitive Microbiological Assay For Phaseolotoxin. *Phytopathology* 69:663-666.
- Steadman, J. R., 1994. A Gene for Resistance to Common Blight. *HortScience*, 29 (1), 44-45.
- Steffan, R. L., Atlas, R. M. 1991. Polymerase Chain Reaction: Applications In Environmental Microbiology. *Annu. Rev. Microbiol.* 45: 137-161.
- Şahin, F. And Miller S. A., 1996. Characterization of Ohio Strains of *X. C. pv. vesicatoria*, Causal Agent of Bacterial Spot of Pepper. *Plant disease*, 80 (7), 773-778.
- Taylor, J. D. 1970. The Quantitative Estimation Of The İnfection Of Bean Seed With *Pseudomonas phaseolicola* (Burkh.) Dowson. *Ann. Appl. Biol.* 66:29-36.
- Taylor, J. D., Dudley, C. L., 1977. Seed Treatment fort he Control of Halo Blight of Beans, *Ann. App. Biol.*, 85, 223-232.
- Taylor, J. D., Teverson D. M. and Davis J. H. C., 1996. Sources of Resistance to *P. s. pv. phaseolicola* Races in *P. vulgaris*. *Plant Pathology*, 45, 479-485.
- Tenover, F. C. Ed. 1989. DNA Probes For Infectious Diseases. CRC Pres, Boca Raton, FL.
- Thornley, M. J., 1960. The Differentiation Of *Pseudomonas* From Other Gram Negative Bacteria On The Basis Of Ariginine Metabolism. *J. Appl. Bacteriol.* 1: 37-52.
- Toros, S. ve Maden S., 1991. Tarımsal Savaşım Yöntem Ve İlaçları. Ankara Üniv. Ziraat Fakültesi Yayınları: 1222, Ders Kitabı: 352. Ankara, S 332.
- Urrea, C. A., Miklas P. N. And Beaver J. S., 1999. Inheritance of Resistance to Common Bacterial Bliight in Four Tepary Bean Lines. *Journal of The American Society*, 124 (1), 24-27.
- Van De Wolf J. M., Vriend S.G. C., Kastelein P, Nijuis E. H., Van Bekkum P. J., Van Wuurde J. W. L., 2000. Immunofluorescence Colony-Staining (IFC) For Detection And Quantification Of *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum* Biovar 2 (Race 3) İn Soil And Verification Of Results By PCR And Dilution Plating. *European Journal Of Plant Patholology* 106, 123–33.
- Van Vuurde, J. W. L., Franken, A. A. J. M., Birnbaum, Y. and Jochems, G., 1983. characteristic of Immunofluorescence Microscopy and Enzyme-Linked

- Immunosorbent Assay as potential Routine Tests for the Detection of *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola* and *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* in Bean Seed, *Seed Sci& Technol.*, 11, 547-559.
- Varela, O., Beaver J., Zapata M., Miklas P. and Cianzio S., 1996. Evaluation of Beans in Early generations for Resistance to *X. c.* pv. *phaseoli* dye. *Journal of agriculture of the University of puerto Rico*, 80 (1-2), 55-63.
- Vidaer, A. K., 1993. *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*: Cause Of Common Bacterial Blight Of Bean. *Xanthomonas* (J.G.Swings, E.L.Civerolo). P399.
- Visidi, R. P., and Yolken, P. G. 1987. Molecular Diagnosis Of Infectious Diseases By Nucleic Acid Hybridization. *Mol. Cell. Probes* 1: 3-14.
- Webster, D. M., Atkin, J. D., and Cross, J. E., 1983. Bacterial Blight Of Snap Beans And Their Control. *Plant Dis.* 67:935-939.
- Weller S. A., Elphinstone J. G., Smith NC, Boonham N, Stead D. E., 2000. Detection Of *Ralstonia Solanacearum* Strains With A Quantitative, Multiplex, Real-Time, Fluorogenic PCR (Taqman) Assay. *Applied And Environmental Microbiology* 66, 2853-8.
- Yu, Z. H., stall R. E. and Vellojes C. E., 1998. detection of Genes for Resistance to Common Bacterial Blight of Beans. *Crop Science*, 38, 1290-1296.
- Zaiter, H. Z., Coyne D. P., Vidaver A. K. and Steadman J. R., 1989. Differential Reaction Of Tepary Bean Lines To *Xanthomonas campestris* pv *phaseoli*. *Hotrscience*, 24 (1), 134-137.
- Zapata, M., G.F. Freytag, and R.E. Wilkinson. 1985. Evaluation for bacterial blight resistance in beans. *Phytopathology* 75:1032-1039.
- Zapata, M., Vidaver A. K. and Dam R., 1992. Hormone Production in *X. c.* pv. *phaseoli*. *Annual Report of Bean Improvement Cooperative*, Vol: 35, 44-45.
- Zaumeyer, W. J., and Thomas, H. R., 1957. A Monographic Study Of Bean Diseases And Methods For Their Control. U. S. Dep. Agric. Tech. Bull. 868.255 p.

ÖZGEÇMİŞ

1982 yılında Ankarada doğdum. İlk, orta ve lise eğitimimi Konya'da tamamladıktan sonra 2000 yılında Selçuk Üniversitesi, Ziraat Fakültesini kazandım. 2004 yılında Bitki Koruma Bölümünden Ziraat Mühendisi ünvanı ile mezun oldum. 2006 yılında Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Ana Bilim Dalında yüksek lisans eğitimime başladım.