

T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



**KANTİTATİF REAL-TIME PCR İLE KARPUZ BAKTERİYEL MEYVE LEKE  
HASTALIK ETMENİ *Acidovorax citrulli* (Schaad vd. 2008)'nin TANISI, TESPİTİ  
VE KARPUZ ve KAVUN ÇEŞİTLERİNİN HASTALIK ETMENİNE KARŞI  
DUYARLILIK REAKSİYONLARININ ARAŞTIRILMASI**

**Nurhan ÖZTÜRK**

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI  
DOKTORA TEZİ**

**HAZİRAN 2018**

**ANTALYA**

T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



**KANTİTATİF REAL-TIME PCR İLE KARPUZ BAKTERİYEL MEYVE LEKE  
HASTALIK ETMENİ *Acidovorax citrulli* (Schaad vd. 2008)'nin TANISI, TESPİTİ  
VE KARPUZ ve KAVUN ÇEŞİTLERİNİN HASTALIK ETMENİNE KARŞI  
DUYARLILIK REAKSİYONLARININ ARAŞTIRILMASI**

**Nurhan ÖZTÜRK**

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI  
DOKTORA TEZİ**

**HAZİRAN 2018**

**ANTALYA**

T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



**KANTİTATİF REAL-TIME PCR İLE KARPUZ BAKTERİYEL MEYVE LEKE  
HASTALIK ETMENİ *Acidovorax citrulli* (Schaad vd. 2008)'nin TANISI, TESPİTİ  
VE KARPUZ ve KAVUN ÇEŞİTLERİNİN HASTALIK ETMENİNE KARŞI  
DUYARLILIK REAKSİYONLARININ ARAŞTIRILMASI**

**Nurhan ÖZTÜRK**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI**  
**DOKTORA TEZİ**

Bu tez **FDK-2015-814** no'lu proje olarak Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Proje Birimi tarafından desteklenmiştir.

**HAZİRAN 2018**

**T.C.**  
**AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KANTİTATİF REAL-TIME PCR İLE KARPUZ BAKTERİYEL MEYVE LEKE  
HASTALIK ETMENİ *Acidovorax citrulli* (Schaad vd. 2008)'nin TANISI, TESPİTİ  
VE KARPUZ ve KAVUN ÇEŞİTLERİNİN HASTALIK ETMENİNE KARŞI  
DUYARLILIK REAKSİYONLARININ ARAŞTIRILMASI**

**Nurhan ÖZTÜRK**  
**BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI**  
**DOKTORA TEZİ**

Bu tez 22.06.2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği/Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Hüseyin BASIM (Danışman)

Doç. Dr. Oktay ERDOĞAN

Doç. Dr. Ş. Evrim ARICI

Dr. Öğr. Üyesi Özer ÇALIŞ

Dr. Öğr. Üyesi Hakan FİDAN

## ÖZET

### KANTİTATİF REAL-TIME PCR İLE KARPUZ BAKTERİYEL MEYVE LEKE HASTALIK ETMENİ *Acidovorax citrulli* (Schaad vd. 2008)'nin TANISI, TESPİTİ VE KARPUZ ve KAVUN ÇEŞİTLERİNİN HASTALIK ETMENİNE KARŞI DUYARLILIK REAKSİYONLARININ ARAŞTIRILMASI

Nurhan ÖZTÜRK

Doktora Tezi, Bitki Koruma Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Hüseyin BASIM

Haziran 2018, 91 sayfa

Bu çalışmada, Karpuz Bakteriyel Meyve Leke hastalık etmeni *Acidovorax citrulli* (*Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*)'nin Real-Time PCR ile hassas tanısı ve bitki dokularından tespiti için primer ve prob setleri geliştirilmiştir. Karpuz ve kavun çeşitlerinin hastalığa karşı duyarlılık reaksiyonları araştırılmıştır. *Acidovorax citrulli*'nin Real-Time PCR ile tanısı ve tespiti için *hrpB2* gen dizisini ve ITS (Internally Transcribed Spacer) bölgesini kullanarak her iki bölgeye özel primer dizayn edilmiştir. 8 bazdan oluşan LNA (Locked Nucleic Acid) probe geliştirilmiştir. Geliştirilen primer ve prob setlerinin spesifikliğı; farklı *Acidovorax citrulli* strainleri, farklı bitki patojeni bakteriler ve karpuz genomik DNA'sı kullanılarak test edilmiştir. Test edilen tüm yerli ve yabancı *Acidovorax citrulli* izolatlarında her iki primer-prob seti 88 bp'lik amplifikasyon gerçekleşirken, farklı bitki patojeni bakterilerde ve karpuz genomik DNA'sında hiçbir amplifikasyon tespit edilmemiştir. Bu çalışmada bakteriyel hücre hassasiyet sınırı 2 bakteriyel hücre ve DNA düzeyindeki hassasiyet sınırı ise 12 fg'dır.

Hastalığa etki eden bakteri popülasyonlarının sayısını belirlemek için Kantitatif Real-Time PCR ve hastalıklı bitki materyali üzerinde yaşayan bakterilerin saptanması için Bio-PCR gerçekleştirilmiştir. Kantitatif Real-Time PCR sonucunda her iki primer-prob seti için standart eğri elde edilmiştir. Kantitatif Real-Time PCR yönteminde kullanılan *hrpB2* ve ITS primer-prob setlerinin etkinlikleri sırasıyla % 97.941 ve % 98.215 oranlarında yüksek güvenilirlikte bulunmuştur. Bu çalışmada geliştirilen Real-Time PCR metotları bakteriyel patojenin varlığı açısından karpuz ve kavun tohumlarının taranmasına yardımcı olabilecektir. Ayrıca bu metot bakteriyel patojenin direkt hastalıklı bitki materyalinden ve direkt bakteriyel hücreden tanı ve tespitine yardımcı olabilecektir. Bu güvenilir, hassas ve tekrarlanabilir gerçek zamanlı PCR yöntemi, potansiyel inokulum kaynaklarının kontrol edilmesine ve alandaki bakteriyel patojenlerin yayılmasının önlenmesine yardımcı olabilecektir.

Karpuz ve kavun çeşitlerinin *Acidovorax citrulli*'ye karşı duyarlılık reaksiyonları, dokuz farklı ölçeklendirmeye göre değerlendirilmiştir. Test edilen bitkilerin duyarlılık reaksiyonları istatistiki olarak anlamlı bulunmamıştır.

**ANAHTAR KELİMELER:** *Acidovorax citrulli*, Duyarlılık Reaksiyonu, Kantitatif Real-Time PCR, Karpuz, Karpuz Bakteriyel Meyve Lekesi, Kavun, PCR Etkinliği, Real-Time Bio-PCR, Tanı, Tespit.

**JÜRİ:** Prof. Dr. Hüseyin BASIM  
Doç. Dr. Oktay ERDOĞAN  
Doç. Dr. Ş. Evrim ARICI  
Dr. Öğr. Üyesi Özer ÇALIŞ  
Dr. Öğr. Üyesi Hakan FİDAN

## ABSTRACT

### **IDENTIFICATION AND DETECTION OF *Acidovorax citrulli* ( Shaad et al. 2008), A CAUSAL AGENT OF WATERMELON BACTERIAL FRUIT BLOTCH DISEASE BY QUANTITATIVE REAL-TIME PCR, AND INVESTIGATION OF SUSCEPTIBILITY REACTIONS OF WATERMELON AND MELON VARIETIES AGAINST THE DISEASE PATHOGEN**

**Nurhan ÖZTÜRK**

**Ph. D. Thesis in Plant Protection**

**Adviser: Prof. Dr. Hüseyin BASIM**

**June 2018, 91 pages**

In this study, primer and probe sets were developed for sensitive identification and detection from both the diseased plant tissue and cell of *Acidovorax citrulli* (*Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*), a causal agent of bacterial fruit blotch disease by Real-Time PCR. The susceptibility reactions of the watermelon and melon varieties to the bacterial pathogen have been investigated. The specific primer pairs for identification and detection of *Acidovorax citrulli* using Real-Time PCR were designed from both regions of the internal sequence of *hrpB2* and the Internal Transcribed Spacer (ITS) region. A LNA (Locked Nucleic Acid) probe with 8 bases was developed. The specificity of the primer and probe sets was determined by testing different plant pathogenic bacteria, different *Acidovorax citrulli* isolates and watermelon genomic DNA. No amplification was detected in the genomes of different plant pathogenic bacteria and watermelon genomic DNA while both primer-probe sets showed a 88 bp- PCR product in all the tested national and foreign *Acidovorax citrulli* isolates. In this study, bacterial cell sensitivity limit was 2 bacterial cell, and DNA sensitivity limit was 12 fg.

Quantitative Real-Time PCR was performed to determine the number of disease-affecting bacterial populations and for detection of living bacteria on the disease plant material using Bio-PCR. Quantitative Real-Time PCR resulted a standard curve for both the developed primer-probe sets in this study. The efficiency of the quantitative Real-Time PCR using primer-probe sets for *hrpB2* and ITS was found to be highly reliable with 97.941% and 98.215%, respectively. These Real-Time PCR methods developed in this study may help to screening of watermelon and melon seeds in terms of the presence of the bacterial pathogen. The method may also help to detection and identification of the bacterial pathogen from directly the diseased plant materials and bacterial cells. This developed dependable, sensitive and repeatable Real-Time PCR method can help to controlling potential sources of inoculum and prevent to spreading of bacterial pathogen in field.

The susceptibility reactions of watermelon and melon varieties to *Acidovorax citrulli*, were evaluated based on the nine different scales. The susceptibility reactions of tested plants were not statistically important.

**KEY WORDS:** *Acidovorax citrulli*, Detection, Identification, Melon, PCR Efficiency, Quantitative Real-Time PCR, Real-Time Bio-PCR, Susceptibility Reaction, Watermelon, Watermelon Bacterial Fruit Blotch.

**COMMITTEE:** Prof. Dr. Hüseyin BASIM  
Assoc. Prof. Dr. Oktay ERDOĞAN  
Assoc. Prof. Dr. Ş. Evrim ARICI  
Asst. Prof. Dr. Özer ÇALIŞ  
Asst. Prof. Dr. Hakan FİDAN



## ÖNSÖZ

Bu çalışma kapsamında Cucurbitaceae familyasına ait karpuz ve kavun bitkilerinde kalite ve verimde önemli kayıplara neden olan Karpuz Bakteriyel Meyve Lekesi hastalık etmeni *Acidovorax citrulli*'nin Kantitatif Real-Time PCR yöntemi ile tanı ve tespiti yapılmıştır. Farklı karpuz ve kavun çeşitlerinin hastalık etmenine karşı duyarlılık reaksiyonları araştırılmıştır.

Bu çalışmanın planlanmasında, araştırılmasında, yürütülmesinde ve gerçekleştirilmesinde, değerli bilgilerini ve birikimlerini hiç tereddüt etmeden benimle paylaşan, benim için kıymetli zamanını ayırıp sabırla ve büyük bir özveriyle bana faydalı olabilmek için elinden gelenden fazlasını sunan ve gelecekteki mesleki hayatımda da bana verdiği değerli bilgilerden faydalanacağımı düşündüğüm sayın danışman hocam Prof. Dr. Hüseyin BASIM'a göstermiş olduğu destek ve sabrından dolayı sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu araştırmanın yürütülmesinde ve gerçekleşmesinde maddi destek sağlayan Akdeniz Üniversitesi Araştırma Fonu'na teşekkür ederim.

Hayatımın her aşamasında olduğu gibi doktora çalışmalarım da maddi ve manevi desteklerini ve sevgilerini hiçbir zaman esirgemeyen ve her zaman bana güvenen canım babam Selahattin ÖZTÜRK, canım annem Fatma ÖZTÜRK'e ve canım AİLEME sonsuz teşekkür ederim. Tüm eğitim dönemi boyunca hertürlü desteği esirgemeyen ağabeylerim İnşaat Müh. Yücel ÖZTÜRK, Cemil ÖZTÜRK ve ablam Şüküfe GÜLENGİL'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ .....	v
AKADEMİK BEYAN .....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xiv
1. GİRİŞ .....	1
2. KAYNAK TARAMASI .....	13
3. MATERYAL ve METOT.....	34
3.1. Çalışmada Kullanılan Bakteriyel Strainler .....	34
3.2. Primerler ve Probenin Tasarlanması.....	35
3.3. Real-Time PCR Optimizasyonu.....	37
3.4. Primerler ve Probenin <i>Acidovorax citrulli</i> Strainlerine Spesifikliğinin Belirlenmesi .....	38
3.5. Primerler ve Probenin Saf DNA'dan Hassasiyetinin Belirlenmesi .....	38
3.6. Direkt Bakteriyel Hücreden Primerler ve Probenin Hassasiyetinin Belirlenmesi .....	39
3.7. Primerler ve Probenin Seçiciliğinin Belirlenmesi .....	39
3.8. <i>Acidovorax citrulli</i> 'nin Hastalıklı Bitki Dokularından Tespiti .....	39
3.9. Real-Time Bio-PCR.....	40
3.10. Kantitatif Real-Time PCR ve PCR Etkinliği .....	40
3.11. <i>Acidovorax citrulli</i> 'nin Tohum Hassasiyetinin Belirlenmesi ve Tohumdaki Popülasyon Yoğunluğunun Kantitatif Real-Time PCR ile Karşılaştırılması .....	41
3.12. Karpuz ve Kavun Çeşitlerinin <i>Acidovorax citrulli</i> 'ye Karşı Duyarlılık Reaksiyonları .....	42
4. BULGULAR.....	44
4.1. <i>Acidovorax citrulli</i> 'nin Klasik PCR ile Tanısı.....	44
4.2. <i>Acidovorax citrulli</i> 'nin Real-Time PCR ile Tanısı .....	44

4.3. <i>Acidovorax citrulli</i> Strainlerinin Real-Time PCR ile Tanısı.....	46
4.4. Primerler-Prob setlerinin saf DNA'dan Hassasiyeti .....	48
4.5. Direkt Bakteriyel Hücreden Primer ve Prob Setlerinin Hassasiyeti .....	50
4.6. Primerler ve Probun Seçiciliği .....	52
4.7. Real-Time PCR ile Hastalıklı Bitki Dokularından <i>Acidovorax citrulli</i> 'nin Tespiti .....	53
4.8. Real-Time Bio-PCR.....	54
4.9. Kantitatif Real-Time PCR ve PCR Etkinliği .....	55
4.10. <i>Acidovorax citrulli</i> 'nin Tohum Hassasiyetinin Belirlenmesi ve Tohumdaki Popülasyon Yoğunluğunun Kantitatif Real-Time PCR ile Karşılaştırılması .....	57
4.11. Karpuz ve Kavun Çeşitlerinin <i>Acidovorax citrulli</i> 'ye Karşı Duyarlılık Reaksiyonları .....	59
5. TARTIŞMA .....	71
6. SONUÇLAR .....	76
7. KAYNAKLAR .....	78
ÖZGEÇMİŞ	

## AKADEMİK BEYAN

Doktora Tezi olarak sunduğum “KANTİTATİF REAL-TİME PCR İLE KARPUZ BAKTERİYEL MEYVE LEKE HASTALIK ETMENİ *Acidovorax citrulli* (Schaad vd., 2008)’ nin TANISI, TESPİTİ VE KARPUZ ve KAVUN ÇEŞİTLERİNİN HASTALIK ETMENİNE KARŞI DUYARLILIK REAKSİYONLARININ ARAŞTIRILMASI” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

22.06.2018  
Nurhan ÖZTÜRK

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

### Simgeler

°C	: santigrad derece
bp	: baz çifti
cm	: santimetre
dk	: dakika
ha	: hektar
fg	: femtogram
gr	: gram
kb	: kilo baz (1000 baz çifti)
l	: litre
ml	: mililitre
µl	: mikrolitre
ng	:nanogram
pg	: pikogram
pH	: potenz hidrojen
sn	: saniye

### Kısaltmalar

A	: Adenin
<i>A.citrulli</i>	: <i>Acidovorax citrulli</i>
<i>A. avenae</i> subsp. <i>citrulli</i>	: <i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i>
Cfu	: Koloni Oluşturan Birim
cfu/ml	: Mililitredeki canlı hücre sayısı
C	: Sitozin
Ct	: Cycle threshold PCR
ddH <sub>2</sub> O	: İki Kere Distile Edilmiş Saf Su
dNTPs	: Deoksi Nükleotit Trifosfat
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
EBB	: Ethanol bromcresol purple/brilliant blue
ELISA	: Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
EPPO	: European and Mediterranean Plant Protection Organization

FAO	: Birleşmiş Milletler Beslenme ve Tarım Örgütü
G	: Guanin
ITS	: Internal Transcribed Spacer
LNA	: Locked Nucleic Acid
NA	: Nutrient Agar
NB	: Nutrient Broth
NSA	: Nutrient Sakkaroz Agar
PCR	: Polimerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
MQ	: Milli Q
NCBI	: The National Center for Biotechnology Information
NCPBP	: National Collection of Plant Protection Bacteria
PE	: Fosfat buffer
PFGE	: Pulsed Field Gel Electrophoresis
pv.	: Patovar
rpm	: Revolutions per minute
sp.	: Tür
<i>Taq</i>	: <i>Thermus aquaticus</i>
T	: Timin
UV	: Ultra Viyole
var.	: varyete
vd.	: ve diğerleri
WP	: Wettable powder
3'	: DNA molekülünün 3' terminal hidroksil ucu of DNA
5'	: DNA molekülünün 5' terminal fosfat ucu of DNA

Tezde ondalık yazım kullanımında nokta (.) ondalık ayırıcı kullanılmaktadır

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil 1.1.</b> Dünyada karpuz (a) ve kavun (b) üretiminin kıtalar düzeyindeki dağılımı (FAOSTAT 2016).....	2
<b>Şekil 1.2.</b> Dünya’da karpuz (a) ve kavun (b) üretimindeki önde gelen ülkeler (FAOSTAT 2016).....	2
<b>Şekil 1.3.</b> Dünya’da <i>Acidovorax citrulli</i> ’nin dağılımı .....	5
<b>Şekil 1.4.</b> Karpuz Bakteriyel Meyve Lekesinin hastalık döngüsü (Walcott 2005)....	7
<b>Şekil 1.5.</b> Taramalı elektron mikroskobu ile <i>Acidovorax citrulli</i> ’nin ksilem iletim demetinde (20 µm) (Bahar vd. 2009a) (a) ve kotiledon dokusunun apoplastındaki (hücreler arası boşluk) hücre kolonizasyonu (b) (Walcott 2005).....	8
<b>Şekil 1.6.</b> <i>Acidovorax citrulli</i> ’nin <i>in-vitro</i> koşullarda koloni gelişimi (a: NA, b: King’s B, c: EBB) .....	9
<b>Şekil 1.7.</b> Karpuz Bakteriyel Meyve Lekesi hastalığının kotiledon yaprakta (a) ve meyvedeki tipik semptomları (b-c-d) (Walcott 2005) .....	10
<b>Şekil 2.1.</b> <i>Acidovorax citrulli</i> ( <i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i> ) AA C00-1 genom haritası .....	14
<b>Şekil 3.1.</b> Real-Time PCR’da <i>Acidovorax citrulli</i> ’nin tanısı için kullanılan diziler ve primer-prob setlerinin dizi üzerindeki bağlanma yerleri.....	37
<b>Şekil 3.2.</b> <i>Acidovorax citrulli</i> ’nin hastalıklı bitki dokularından izolasyonu .....	40
<b>Şekil 4.1.</b> <i>Acidovorax citrulli</i> ’nin <i>hrpB2</i> geninin klasik PCR ile amplifikasyonu. M, marker (100 bp); 1, 2: 8408-Karpuz; 3: M1 Kavun; 4:NK (su) (Negatif kontrol) .....	44
<b>Şekil 4.2.</b> <i>Acidovorax citrulli</i> ’nin (a) <i>hrpB2</i> geni primer-prob setine ait ve (b) ITS bölgesi primer-prob setine ait Real-Time PCR sonuçları .....	45
<b>Şekil 4.3.</b> <i>Acidovorax citrulli</i> ’nin (a) <i>hrpB2</i> geni primer setine ait (b) ITS bölgesi primer setine ait erime grafiği ve Real-Time PCR primerleri ile klasik PCR sonuçlarının agaroz jelde görüntülenmesi (M: marker (100 bp), 1: <i>hrpB2</i> Real-Time primer seti, 2: ITS Real-Time PCR primer seti) (c) .....	46
<b>Şekil 4.4.</b> <i>Acidovorax citrulli</i> yabancı strainlerin (a) <i>hrpB2</i> geni primer-prob setine ait ve (b) ITS bölgesi primer-prob setine ait Real-Time PCR sonuçları.....	47
<b>Şekil 4.5.</b> <i>Acidovorax citrulli</i> yerli strainlerin (a) <i>hrpB2</i> geni primer-prob setine ait ve (b) ITS bölgesi primer-prob setine ait Real-Time PCR sonuçları.....	48

<b>Şekil 4.6.</b> <i>Acidovorax citrulli</i> 'nin saf DNA'dan (pikogram düzeyinde) (a) <i>hrpB2</i> geni primer-prob setine ait ve (b) ITS bölgesi primer-prob setine ait Real-Time PCR hassasiyet sonuçları .....	49
<b>Şekil 4.7.</b> Direkt bakteriyel hücredeki primer-prob setlerinin hassasiyetindeki bakteriyel seyreltmelerin (stok ila $10^{-10}$ 'a kadar) NA besi ortamındaki gelişimi.....	51
<b>Şekil 4.8.</b> Direkt <i>Acidovorax citrulli</i> hücrelerinden (a) <i>hrpB2</i> geni primer-prob setine ait ve (b) ITS bölgesi primer-prob setine ait Real-Time PCR hassasiyet sonuçları .....	52
<b>Şekil 4.9.</b> <i>Acidovorax citrulli</i> strainlerinin (a) <i>hrpB2</i> geni primer-prob setine ve (b) ITS bölgesi primer-prob setine göre Real-Time PCR seçicilik sonuçları .....	53
<b>Şekil 4.10.</b> (a) Karpuz ve (b) kavunda <i>Acidovorax citrulli</i> 'nin oluşturduğu nekrotik belirtiler (Bu çalışmadan).....	54
<b>Şekil 4.11.</b> <i>Acidovorax citrulli</i> 'nin direkt hastalıklı bitki dokusundan (a) <i>hrpB2</i> geni primer-prob setine ve (b) ITS bölgesi primer-prob setine göre Real-Time PCR sonuçları .....	54
<b>Şekil 4.12.</b> <i>Acidovorax citrulli</i> 'nin karpuz tohumlarından (a) <i>hrpB2</i> geni primer-prob setine ait ve (b) ITS bölgesi primer-prob setine ait Real-Time Bio-PCR sonuçları .....	55
<b>Şekil 4.13.</b> <i>Acidovorax citrulli</i> 'nin (a) <i>hrpB2</i> geni primer-prob setine ait ve (b) ITS bölgesi primer-prob setine ait Kantitatif Real-Time PCR için referans standart eğrinin oluşturulması.....	56
<b>Şekil 4.14.</b> <i>Acidovorax citrulli</i> 'nin tohumdan (a) <i>hrpB2</i> geni primer-prob setine ait ve (b) ITS bölgesi primer-prob setine ait Real-Time PCR hassasiyet sonuçları .....	57
<b>Şekil 4.15.</b> <i>Acidovorax citrulli</i> 'nin tohumda (a) <i>hrpB2</i> geni primer-prob setine ait ve (b) ITS bölgesi primer-prob setine ait Kantitatif Real-Time PCR sonuçları .....	58
<b>Şekil 4.16.</b> <i>Acidovorax citrulli</i> ile test edilen karpuz bitkisinde (Elize F1) hastalık oluşumu (Skala ölçeği: 9) (a: Kontrol, b: Sprey uygulama c: Enjeksiyon uygulama).....	60
<b>Şekil 4.17.</b> <i>Acidovorax citrulli</i> ile test edilen Nostalji F1 çeşidinde oluşan nekrotik yaprak belirtileri (Skala ölçeği: 8) (a: Kontrol, b: Sprey uygulama c: Enjeksiyon uygulama).....	60
<b>Şekil 4.18.</b> <i>Acidovorax citrulli</i> ile test edilen Crimsonsweet karpuz çeşidinde oluşan nekrotik yaprak belirtileri (Skala ölçeği: 8) (a: Kontrol, b: Sprey uygulama c: Enjeksiyon uygulama).....	61



**Şekil 4.19.** *Acidovorax citrulli* ile test edilen kavun bitkisinde (Sinem F1) hastalık oluşumu (Skala ölçeği: 9) (a: Kontrol, b: Sprey uygulama c: Enjeksiyon uygulama)..... 61

**Şekil 4.20.** *Acidovorax citrulli* ile test edilen Baldo F1 kavun çeşidinde oluşan nekrotik yaprak belirtileri (Skala ölçeği: 7) (a: Kontrol, b: Sprey uygulama c: Enjeksiyon uygulama)..... 62

**Şekil 4.21.** *Acidovorax citrulli* ile test edilen Çıtirex kavun çeşidinde oluşan nekrotik yaprak belirtileri (Skala ölçeği:7) (a: Kontrol, b: Sprey uygulama c: Enjeksiyon uygulama)..... 62

**Şekil 4.22.** *Acidovorax citrulli* ile test edilen Adahan F1 kavun çeşidinde oluşan nekrotik yaprak belirtileri (Skala ölçeği:7) (a: Kontrol, b: Sprey uygulama c: Enjeksiyon uygulama)..... 63

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 1.1.</b> Karpuz ve kavunun bilimsel sınıflandırılması.....	1
<b>Çizelge 1.2.</b> Dünya ve Türkiye’de karpuz ve kavun ekim alanı (ha) ve üretimi (ton).....	3
<b>Çizelge 1.3.</b> <i>Acidovorax citrulli</i> ’nin konukçu ve konukçu tipleri.....	6
<b>Çizelge 2.1.</b> <i>Acidovorax citrulli</i> AA C00-1 genomunun özellikleri .....	13
<b>Çizelge 3.1.</b> Real-Time PCR’da test edilen yerli-yabancı <i>Acidovorax citrulli</i> strainleri.....	34
<b>Çizelge 3.2.</b> Real-Time PCR’da kullanılan farklı bitki patojeni bakteriler .....	34
<b>Çizelge 3.3.</b> <i>Acidovorax citrulli hrpB2</i> genine spesifik klasik PCR primer seti.....	35
<b>Çizelge 3.4.</b> <i>Acidovorax citrulli</i> ’nin <i>hrpB2</i> gen bölgesine göre optimize edilen klasik PCR programı .....	36
<b>Çizelge 3.5.</b> <i>Acidovorax citrulli</i> ’nin Real-Time PCR yöntemi için geliştirilen primer-prob seti.....	37
<b>Çizelge 3.6.</b> <i>Acidovorax citrulli</i> için optimize edilmiş Real-Time PCR programı ..	38
<b>Çizelge 3.7.</b> Duyarlılık testlerinde kullanılan karpuz ve kavun çeşitleri .....	43
<b>Çizelge 4.1.</b> Direkt bakteriyel hücre hassasiyet çalışmasında hazırlanan bakteriyel seyreltmelerin NA besi ortamındaki koloni sayıları .....	50
<b>Çizelge 4.2.</b> Kantitatif Real-Time PCR: Standart eğri ve PCR etkinliği.....	57
<b>Çizelge 4.3.</b> Karpuz ve kavun çeşitlerinin <i>Acidovorax citrulli</i> ’ye karşı duyarlılık reaksiyonlarının simptomolojik olarak değerlendirilmesi (Sprey uygulama).....	64
<b>Çizelge 4.4.</b> Çalışmada yer alan karpuz çeşitlerinin <i>Acidovorax citrulli</i> ’ye karşı duyarlılıkları (Sprey uygulama) .....	69
<b>Çizelge 4.5.</b> Çalışmada yer alan kavun çeşitlerinin <i>Acidovorax citrulli</i> ’ye karşı duyarlılıkları (Sprey uygulama) .....	70

## 1. GİRİŞ

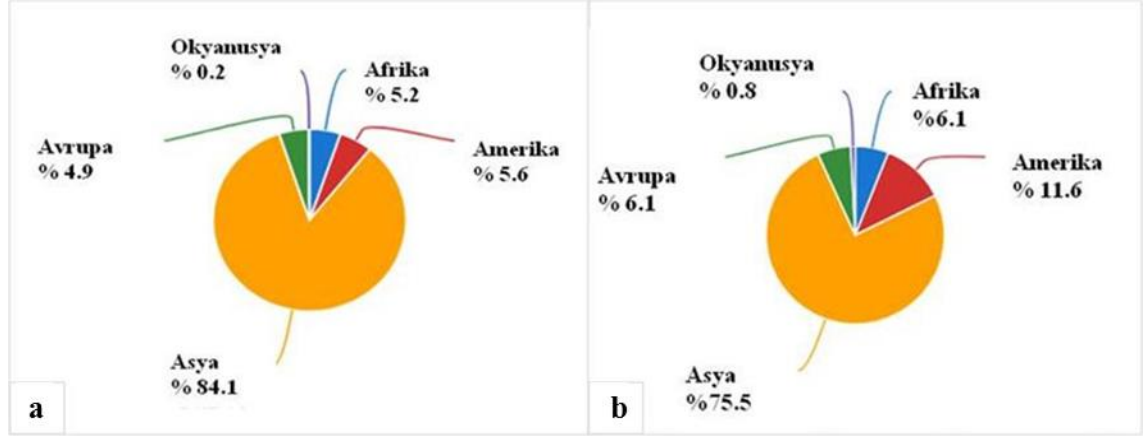
Cucurbitaceae familyası, 119 cins ve 825 türden oluşmaktadır (Jeffrey 2005; Sarıjlı 2011). Bu familya içerisinde yer alan büyük oranda ekonomik öneme sahip türlerden karpuz (*Citrullus lanatus* L.) ve kavun (*Cucumis melo* L.) sıcak bölgelerde gelişim göstermektedir. Karpuzun likopen içeriği bakımından diğer kırmızı renkli meyve çeşitlerine göre daha fazladır. Likopenin bazı hastalık türlerinin önlenmesi için yararlı olduğu öngörülmüştür (Güner ve Wehner 2004). Karpuzun şeker oranı % 8-14 arasındadır. Karpuz B, C, A vitaminlerince zengin olmasının yanısıra Ca, Fe, P, Mg içermektedir. Buna karşılık kimyasal bileşiminde protein, yağ ve kalori az olduğu için bu besin içerikleri bakımından fakirdir (Anonim 1990, 2005). Kavun ise içeriğindeki doğal vitamin, mineral ve pigment barındıran antioksidan ve antiinflamatuvar özelliklere sahip olup A, C vitamini, potasyum ve B6 vitamini kaynağıdır. Ayrıca kavunun bazı hastalıkların önlenmesini sağlayan, antioksidan özellikli fitokimyasallar ve bir grup karotenoidi içermektedir. Bu özelliklerinden dolayı tüketimi oldukça fazladır (Van Kappel vd. 2001; Vouldoukis vd. 2004; Solval vd. 2012; Kubilay 2014).

*Citrullus* türlerinin gen merkezi Afrika'dır (Robinson ve Deckers-Walters 1997). Hindistan'ın ise ikincil bir gen merkezi olduğu savunulmaktadır (Whitaker ve Davis 1962). Cucurbitaceae familyasına giren *Citrullus* cinsi (Çizelge 1.1) Afrika, Asya ve Akdeniz yetişen 4 diploid (n=11) tür içermektedir (Jeffrey 1975; Whitaker ve Davis 1962; Robinson ve Decker-Walters 1997; Sarı vd. 2007). Bunlar; *Citrullus lanatus*, *Citrullus colocynthis*, *Citrullus eccirrhous*, *Citrullus rehmi* (Sarı vd. 2007)'dir. Kavunun (*Cucumis melo* L.) kökenine dair bilgilerde De Candolle 1882 yılında kavunun gen merkezinin Batı Afrika ve Hindistan olduğunu ileri sürmüştür. Daha sonra yapılan araştırmalar ile Hooker 1897 yılında kavunun ilk gen merkezi Afrika, ikinci gen merkezi ise İran, Hindistan, Rusya ve Çin olarak saptamıştır (Candan ve Kesercioğlu 2012). Kavun, Cucurbitaceae familyasında Cucurbitales takımına ait olan bir kültür bitkisidir (Çizelge 1.1) Araştırmacılar, kavunun sınıflandırmasını yaparken farklı taksonomik yollar izlemişler ve kavunun altı farklı varyete grubuna ayrıldığını ortaya koymuşlardır (Özgür 1995).

**Çizelge 1.1.** Karpuz ve kavunun bilimsel sınıflandırılması

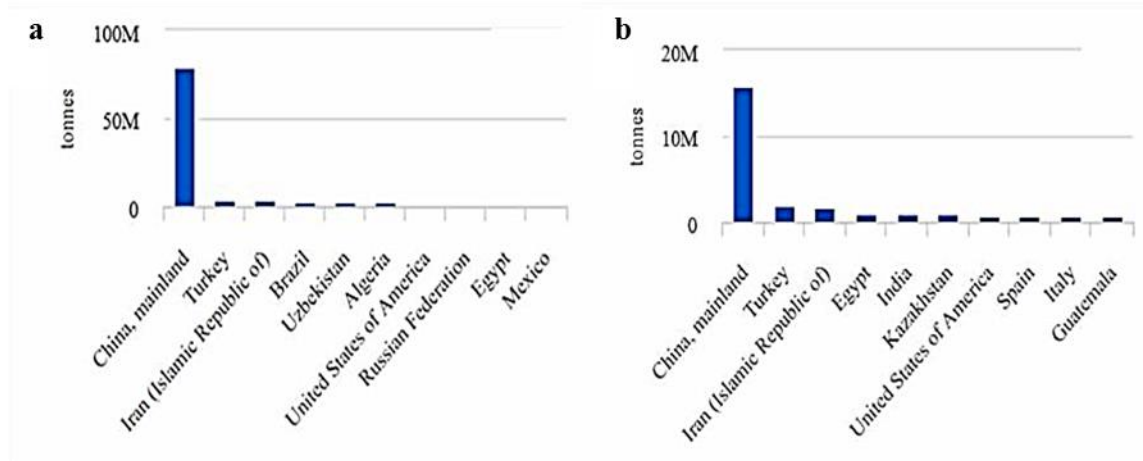
	<b>Karpuz</b>	<b>Kavun</b>
<b>Alem</b>	Plantae	Plantae
<b>Bölüm</b>	Magnoliophyta	Spermatophyta
<b>Sınıf</b>	Magnoliopsida	Dicotyledonae
<b>Takım</b>	Cucurbitales	Violales
<b>Familya</b>	Cucurbitaceae	Cucurbitaceae
<b>Cins</b>	<i>Citrullus</i>	<i>Cucumis</i>
<b>Tür</b>	<i>Citrullus lanatus</i> (Thunb.)	<i>Cucumis melon</i> L.

Kabakgil yetiştiriciliğinde en çok talep edilen ürünler arasında yer alan karpuz ve kavun üretiminde FAOSTAT 2016 yılı istatistikî verilerine göre Asya kıtası talebin büyük çoğunluğunu karşılamakta ve üretimde büyük paya sahip konumdadır (Şekil 1.1).



**Şekil 1.1.** Dünyada karpuz (a) ve kavun (b) üretiminin kıtalar düzeyindeki dağılımı (FAOSTAT 2016)

Dünyada ki karpuz ve kavun üretiminde Türkiye Çin'den sonra ikinci sırada yer almaktadır (Şekil 1.2). Çin, 79.244.271 ton ile dünya karpuz üretiminin yaklaşık %68'ini tek başına karşılamaktadır. Açık ara lider olan Çin'i yaklaşık 4 milyon tonla Türkiye takip etmektedir. Türkiye'nin dünya karpuz üretimindeki payı % 3.9 seviyesindedir. Türkiye'yi İran, Brezilya, Özbekistan, Cezayir, ABD, Rusya, Meksika ve Mısır takip etmektedir (FAOSTAT 2016) (Şekil 1.2).



**Şekil 1.2.** Dünya'da karpuz (a) ve kavun (b) üretimindeki önde gelen ülkeler (FAOSTAT 2016)

Türkiye'de, karpuzun üretim oranına, tüketim oranına ve ekonomideki önemine bakıldığında sebzeler içerisinde ikinci sırada yer almakta ve Türkiye'de toplam sebze üretiminin % 28'ini karşılamaktadır (TÜİK 2016). Kavun ise Türkiye'de karpuzdan sonra en fazla üretilen tür olmaktadır (Anonim 2016). Karpuz ve kavun üretiminde alınan

verimde yıllara göre artışlar FAOSTAT 2016 verilerine göre hazırlanan Çizelge 1.2 gözlenmektedir.

**Çizelge 1.2.** Dünya ve Türkiye’de karpuz ve kavun ekim alanı (ha) ve üretimi (ton)

Yıllar	DÜNYA				TÜRKİYE			
	Karpuz		Kavun		Karpuz		Kavun	
	Ekili Alan (ha)	Üretim (ton)	Ekili Alan (ha)	Üretim (ton)	Ekili Alan (ha)	Üretim (ton)	Ekili Alan (ha)	Üretim (ton)
2012	3.327.671	105.257.242	1.161.596	28.628.373	97.732	4.022.296	79.642	1.688.687
2013	3.358.842	108.078.173	1.170.064	29.723.606	97.946	3.887.324	78.769	1.699.550
2014	3.432.697	111.507.074	1.181.743	30.146.285	95.463	3.885.617	79.149	1.707.302
2015	3.432.449	113.708.019	1.175.831	29.974.647	95.495	3.918.558	79.274	1.719.620
2016	3.507.243	117.022.560	1.245.841	31.166.896	94.333	3.928.892	84.589	1.854.356

\*FAOSTAT 2016

Kavun ve karpuz Dünya’da ve Türkiye’de en çok üretim ve tüketim oranına sahip sebzeler içerisinde ilk sıralarda yer almaktadır. Karpuz ve kavun tek yıllık bitki ve iklim koşulu olarak da sıcak ve ılıman iklimde yetişmektedir. Kavun ve karpuz açık alanlarda yetiştirilmekle birlikte örtü altında da yetiştiriciliği yapılmaktadır (Taşkaya ve Keskin 2004). Türkiye’de örtü altı karpuz ve kavunun üretiminde Akdeniz bölgesi önemli bir paya sahiptir. Akdeniz Bölgesi üretimde 653.836 ton karpuz ve 147.768 ton kavun ve Antalya ili örtü altı yetiştiriciliğinde ise karpuz 52.336 ton ve 22.879 ton kavun üretim miktarına sahiptir (TÜİK 2016).

Karpuz çeşitleri meyve büyüklüğüne (<4 kg ila >14,5 kg) ve çekirdeklilik durumlarına göre çekirdekli ve çekirdeksiz olmak üzere gruplandırılırlar. Çekirdekli karpuzlardan en çok tercih edilen kırmızı et renginde büyük meyveye (8-11 kg) sahip olanlardır. Çekirdeksiz karpuzlarda ise kırmızı etli, oval şekilli ve orta büyüklükte (5-8 kg) olan çeşitler tercih edilmektedir (Wehner 2008).

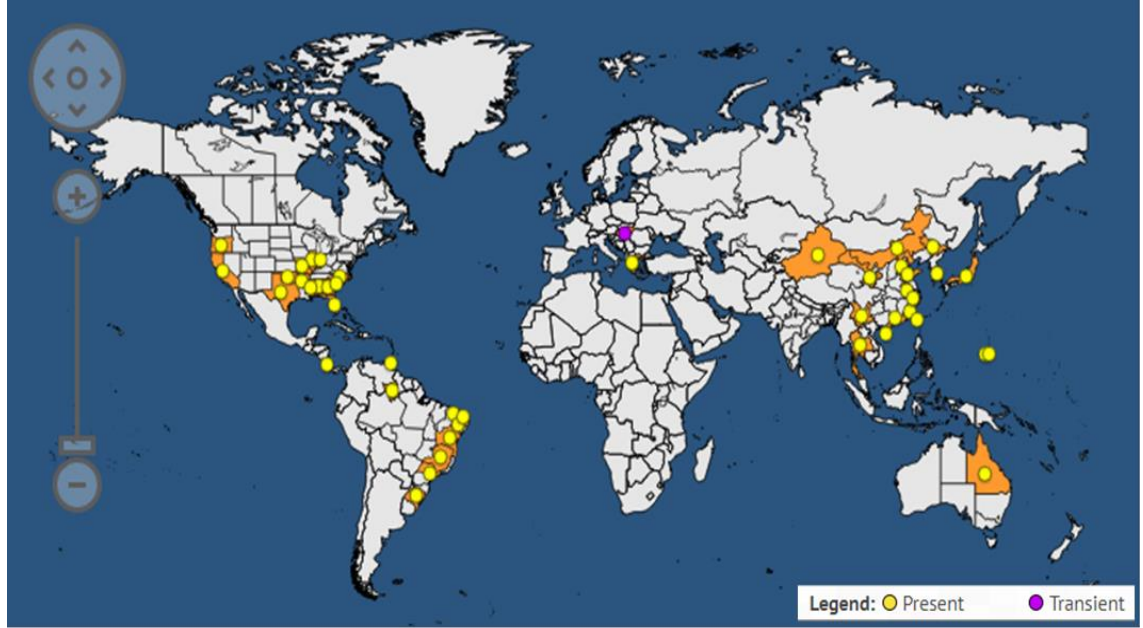
Karpuz, iyi havalanma kapasitesine sahip, su tutma kapasitesi yüksek olan, kumlu, kumlu-tınlı özellikteki topraklarda yetiştirilmektedir. Yetiştirdiği en elverişli olduğu yapı hafif asitli topraklar yani pH aralığı 5.0-6.5 olduğu topraktır. İliman iklim bitkisi olduğu için ilkbahar ve sonbahar ayları arasında yetiştiriciliğe daha uygun olmaktadır (MEB 2008). Kavun, uzun bir gelişme süresine sahip ılık ve sıcak iklim de yetişen bir bitkidir. Güneşli, sıcak hava ve yeterli toprak nemi uygun yetiştirme koşullarını oluşturmaktadır (Saygılı 2005). Toprak isteği bakımından pH 6.0-6.7 olan derin, geçirgen, humus ve besin maddelerince oldukça zengin, kumlu-tınlı veya tınlı-kumlu yapılar yetiştiricilik için uygun olmaktadır (Milli Eğitim Bakanlığı 2008).

Karpuzun %95'i sudur ve taze tüketim başta olmak üzere meyve suyu üretimi, şurup, turşu, reçel ve konserve üretiminde de kullanılmaktadır. Kabukları hayvan beslenmesinde kullanılabilir, çekirdekleri ise kozmetik ve ilaç sanayinde değerlendirilmektedir (Güneş ve Aşkın 2016). Karpuz tüketiminde kırmızı etli kısmının altındaki beyazımsı kısımda beraber tüketimi önerilmektedir. Bunun yanında tarım ürünlerini çekirdeğinden kabuğuna kadar değerlendirmek mümkün olduğu için karpuz ve kavun kabuğunda gıda, ilaç ve kozmetik sektöründe kullanılmaya başlanmıştır. Türkiye karpuz ve kavun kabuğu ihracatını en çok Almanya, Fransa, İtalya ve Yunanistan'a yapmaktadır. Kavun ve karpuz kabuğunun en büyük alıcısı olan ülkeler ise İtalya ve Almanya'dır. Kavun, karpuz kabuğu çevre koşullarının değişimlerinden olumsuz yönde etkilenmesinin yanında ihracatta riskli grup ürünler içerisinde yer almasına rağmen yüksek kazanç sağlaması ile bu sorunlar göz ardı edilebilmektedir (Taşkaya ve Keskin 2004).

Karpuz meyveler içerisinde, iştah açıcı, ferahlatıcı bir etkiye sahip besin maddelerinden biridir. Karpuz tüketiminin bazı hastalıkların giderilmesinde etkili olduğu gözlenmiştir. Örneğin; mide rahatsızlığına, göz ağrılarına, baş ağrılarına iyi geldiği bilinmektedir (Sarı 2006). Karpuz, içeriğindeki bol miktardaki likopen bakımından antioksidan olmasından tüketimi ile insanda pankreas, prostat ve mide kanseri riskini azalttığı ve deriyi UV zararından koruduğu yapılan çalışmalar ile ortaya konulmuştur (Garster 1997; Anonim 2003; Perkins 2005).

Türkiye'de ve dünyada hastalık ve zararlılardan kaynaklanan ürün kayıpları hiç de azımsanacak boyutlarda değildir. Karpuzda önemli kayıplara neden olan birçok hastalık mevcuttur. Bitkinin gelişme dönemine bağlı olarak çok ciddi ürün kayıpları meydana gelmektedir. Bazı hastalıklarda erken dönemde enfeksiyonlar % 100 ürün kayıplarına neden olmaktadır. Karpuzun pazar değerini düşüren, verimini azaltan bakteriyel bir hastalık *Acidovorax citrulli* (Schaad vd. 2008)' nin neden olduğu Karpuz Bakteriyel Meyve Leke hastalığıdır.

*A. citrulli*'nin dünyada birçok ülkede (Şekil 1.3) elde edilen verilerin ışığında kalıcı ve geçici olarak dağılmış bir epidemiyeye sahip olduğu rapor edilmiştir. *A. citrulli* bitki sağlığı sınıflandırmasında EPPO ülkelerinde A1 listesinde (List no. 379) ve Avrupa ülkeleri arasında Türkiye' de 2007 yılı itibari ile A2 karantina listesinde yer almıştır (EPPO 2018).



KITA	ÜLKE	KITA	ÜLKE	KITA	ÜLKE	KITA	ÜLKE
Amerika	Brezilya, Kosta Rika, Trinidad, Tobago, Amerika Birleşik Devletleri	Asya	Çin, Endonezya, İran, İsrail, Japonya, Kore, Malezya, Tayvan, Tayland	Avrupa	Yunanistan, Macaristan İtalya, Hollanda, Sırbistan, Türkiye	Okyanusya	Avustralya, Guam, Kuzey Mariana Adaları

**Şekil 1.3.** Dünya’da *Acidovorax citrulli*’nin dağılımı

*A. citrulli*’nin neden olduğu Karpuz Bakteriyel Meyve Leke hastalığından tüm cucurbit bitkileri etkilenmesine rağmen, hastalık en çok karpuz bitkisinde sorun oluşturmaktadır (Webb ve Goth 1965; Isakeit vd. 1997, 1998; Assis vd. 1999; Martin ve O’Brien 1999; Zhao vd. 2001; Walcott vd. 2003). Konukçusu olduğu bitki türleri ve konukçu tip özelliği Çizelge 1.3’te verilmiştir (EPPO 2016). İlk olarak bakteriyel hastalığın ilk belirtileri 1960’larda bildirilmiş olmasına rağmen patojen tespit edilememiştir. Daha sonra 1989 yılında Amerika’nın Florida, Güney Carolina ve Indiana eyaletlerinde karpuz yetiştirilen alanlarda Karpuz Bakteriyel Meyve Leke hastalığına neden olan ilk salgınlar ve bitki kayıpları rapor edilmiştir. Ayrıca; 1996 yılından beri kabakgil yetiştirilen Amerika, Avustralya, Tayvanda, Çin, Japonya ve Brezilya da; kavun (*Cucumis melo* var. *cantalupensis*) sulu kavun (*C. melo* var. *indorus* Jacq.), hıyar (*C. sativus* L.), kabak ve bal kabağı (*Cucurbita pepo*, *Cucur. maxima* ve *Cucur. moschata*), ağaç kavunu (*C. lanatus* [Thunb.] Matsum. & Nakai var. *citroides*), dikenli kavun (*C. myriocarpus* subsp. *myriocarpus*) ve çeşitli su kabaklarında ekonomik kayıplara neden olmuştur (Isakeit vd. 1997; O’Brien ve Martin 1999; Cheng vd. 2000; Shirakawa vd. 2000; Zhao vd. 2001). Türkiye’de ise ilk olarak 1995 yılında karpuz yetiştirilen Edirne’de (Demir 1996) ve 2005 yılında Adana’da rapor edilmiştir (Mirik vd. 2006). Hastalık karpuz (*Citrullus lanatus*) ve kavun (*Cucumis melo*) çeşitlerinde özellikle şiddetlidir. Diğer cucurbitlerde hastalıktan daha az oranda etkilenebilmekte ve bu türler belirti göstermeyen konukçu potansiyelindedir (Dutta vd. 2014).

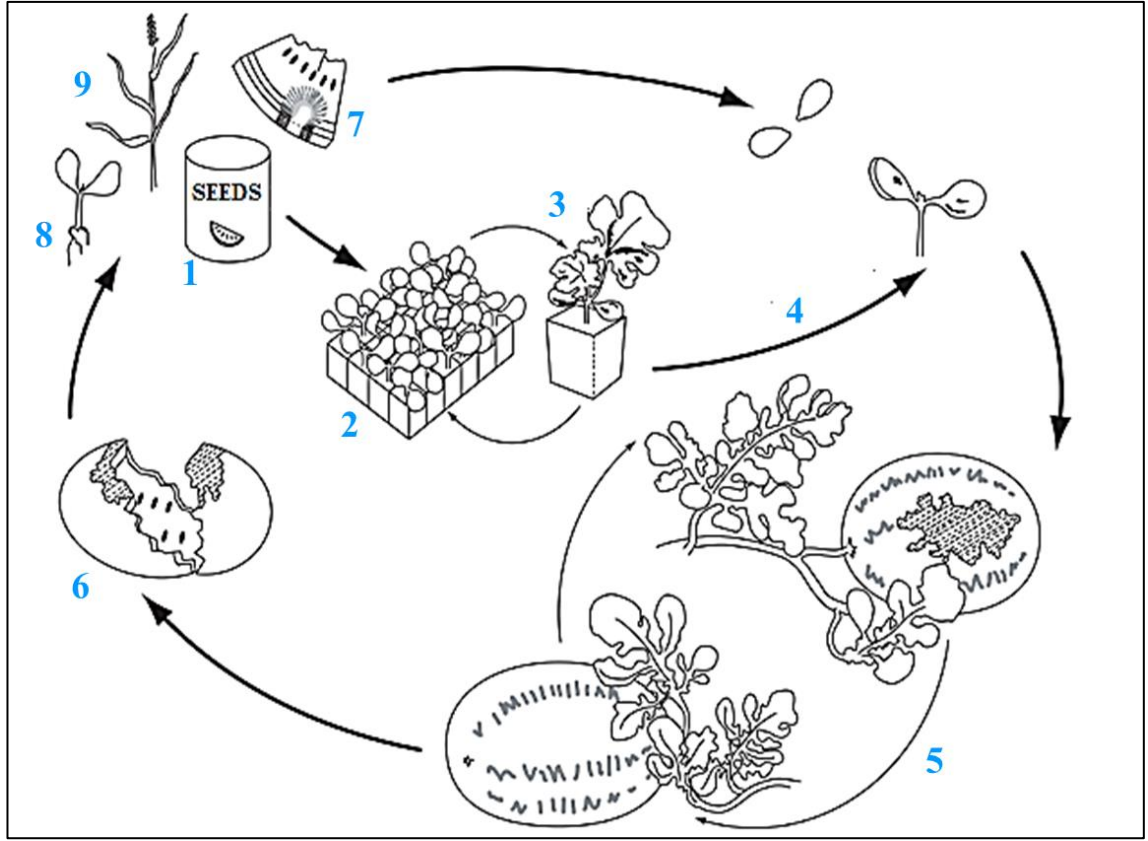
**Çizelge 1.3.** *Acidovorax citrulli*'nin konukçu ve konukçu tipleri

Konukçu		Konukçu tipi
<i>Citrullus lanatus</i>	Karpuz	Birincil (Primer)
<i>Citrullus lanatus</i> var. <i>citroides</i>	Yem karpuzu	Yabani/Yabancı ot
<i>Cucumis melo</i>	Kavun	Birincil (Primer)
<i>Cucumis sativus</i>	Hıyar	İkincil (Sekonder)
<i>Cucurbita moschata</i>	Bal kabağı	İkincil (Sekonder)
<i>Cucurbita pepo</i>	Sakız kabağı	İkincil (Sekonder)
<i>Piper betle</i>	Betel biberi	Tesadüfi (Gönüllü Konukçu)

*A. citrulli* tohum kökenli patojendir ve tohumla bulaşır. Kontamine tohumlar *A. citrulli* hastalık etmeninin yayılması birincil inokulumun en önemli kaynağını temsil etmektedir. *A. citrulli* tohumdan fide aktarımında, karpuz başta olmak üzere birçok Cucurbitaceae familyasındaki bitkilerde hastalık oluşturmaktadır (Hopkins ve Thompson 2002a). Enfekte olmuş bitki döküntüleri de potansiyel inokulum kaynaklarıdır; ancak, bunlar tüm ortamlarda önemli değildir. Bulaşık tohumlar doğrudan toprağa ekildiğinde, ortaya çıkan fidelerin bir kısmı çimlenmeden 6 ve 10 gün sonra Karpuz Bakteriyel Meyve Lekesi belirtileri ortaya çıkmaktadır. Belirtiler gelişiminin kesin zamanı, çevresel şartlara (birincil olarak sıcaklık ve bağıl nem) ve tohum başına *A. citrulli* popülasyonuna bağlıdır. Yüksek sıcaklık, bağıl nem ve şiddetli tohum bulaşıklığı *A. citrulli*'nin daha hızlı belirtiler ekspresyonuna yol açmaktadır (Burdman ve Walcott 2012).

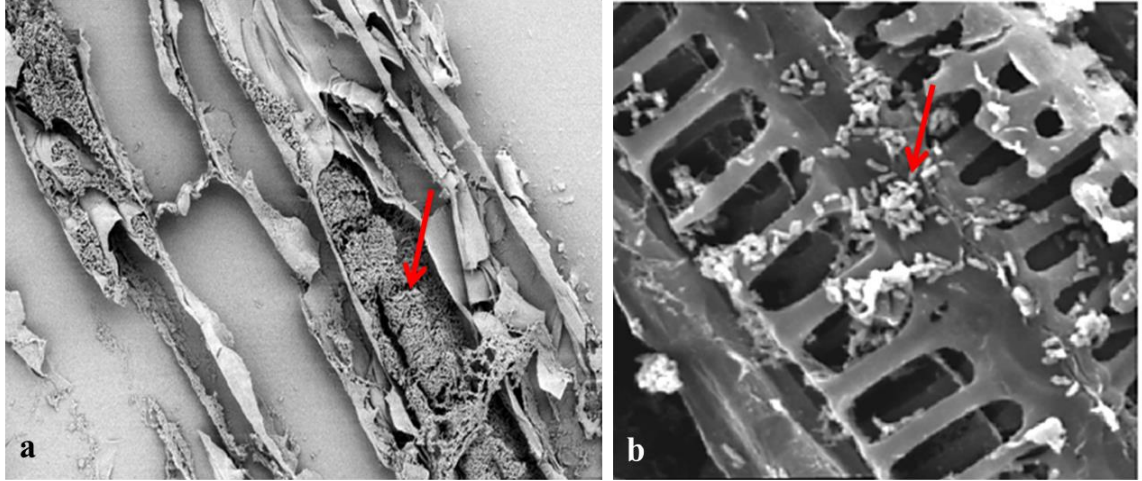
Karpuz Bakteriyel Meyve Lekesi hastalığının epidemik gelişimi için en önemli birincil inokülüm kaynağını patojen ile kontamine tohumlar oluşturmaktadır (1). Transplant üretimi için tohumlar, saksı ortamında yetiştirilerek fide elde edilmektedir (2). Fidler transplant üretim tesislerinde sıcak, nemli ortamda muhafaza edilmektedir. Bu koşullar hastalığın gelişimi için de elverişli koşullar olmaktadır. İstila edilmiş tohumlardan bakteriler, tohum kılıfından kotiledonlar ortaya çıktıkça gelişmekte olan fideleri enfekte etmektedir. Püskürtme ile sulama, *A. citrulli* komşu fidelere etkili bir şekilde yayılmaktadır(3). Seradaki sekonder yayılma, tarlalara ulaşan enfekteli fidelerdir (4). Bitkiler tarlada büyüdükçe, patojen yeni yapraklara ve komşu bitkilere yayılmaktadır (5). Enfekte olmuş bitkilerin kalıntılarındaki lezyonlar, olgunlaşmamış meyvelerin enfeksiyonu için bir inokulum kaynağını oluşturmaktadır (6). Karakteristik leke belirtileri olgunlaşmadan kısa bir süre önce meyvede görülmektedir. Hastalıklı meyve çürüğünden tohumlar toprağa dökülmektedir (7). Bu tohumlar, takip eden sezonda enfekte olmuş fideleri oluşturur ve yerel inokulum kaynağını oluşturmaktadır (8). *A. citrulli*'nin enfekte olmuş kabakgil yabancı otlarında ve tarladaki fidelerde oluşturduğu etki, çeşitli çevresel faktörlerden etkilenmektedir (9) (Şekil 1.4) (Silva 2016).





**Şekil 1.4.** Karpuz Bakteriye Meyve Lekesinin hastalık döngüsü (Walcott 2005)

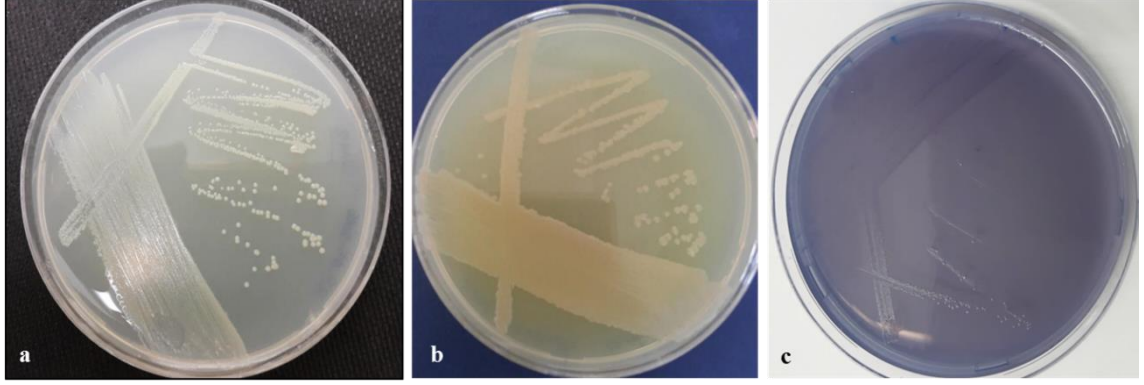
*A. citrulli* gram negatif, 0.5  $\mu\text{m}$ -1.7  $\mu\text{m}$  ortalama boyutlarında, yaklaşık 5.0 mikron uzunluğunda) çubuk şekilli, aerobik ve polar kamçılı bir bakteridir (Schaad vd. 1978; Hopkins ve Thompson 2002b). Genom büyüklüğü 5352.8 kb (Accession:NC\_008752)'dir. İlk inokulum kaynağı tohumdur. Yağmur, çiğ, sulama suyu, böcekler, hayvanlar, kullanılan alet ve ekipmanlar ile patojen yayılır. Epifitik olarak kalabilir. Bitkiye açılan yaralardan ve doğal açıklıklardan giriş yaparlar. Patojen hücreleri tohumda, hücreler arası boşluklarda lokalize olabilmektedir (Şekil 1.5) (Rane ve Latin 1992). Optimum gelişme sıcaklığı 32 °C olup 4-30 °C' de 26 ay karpuz tohumlarında canlılığını koruduğu tespit edilmiştir (Shirakawa vd. 2003).



**Şekil 1.5.** Taramalı elektron mikroskobu ile *Acidovorax citrulli*'nin ksilem iletim demetinde (20 µm) (Bahar vd. 2009a) (a) ve kotiledon dokusunun apoplastındaki (hücreler arası boşluk) hücre kolonizasyonu (b) (Walcott 2005)

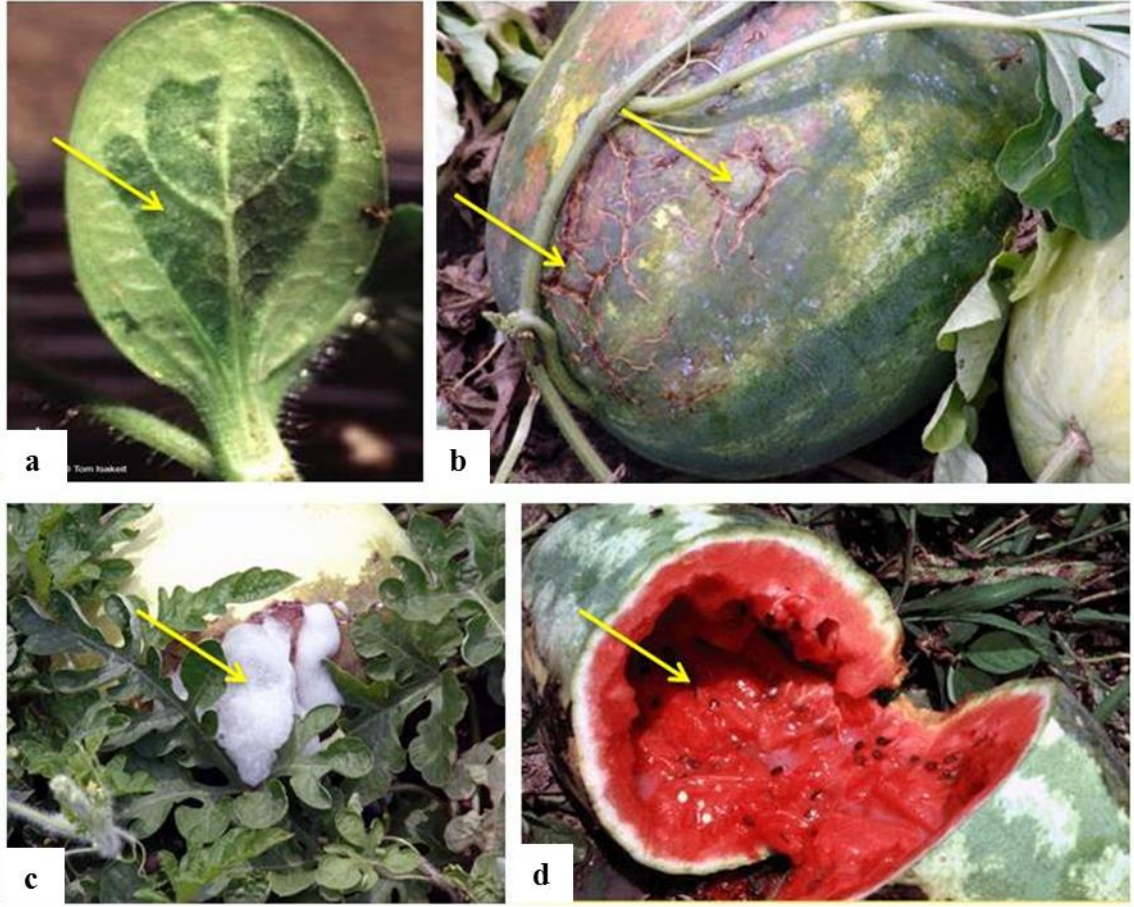
*A. citrulli*'nin koloni gelişiminde King's B besi ortamında (King vd. 1954), 48 saat inkübasyondan sonra (Schaad vd. 1978) sonra tüm kenarları, yarı saydam, pürüzsüz ve hafif dışbükey yuvarlak, floresan olmayan yapıda olmaktadır (Şekil 1.6-b). Koloniler 30 °C'de 5 günlük inkübasyondan sonra 2-3 mm çapa ulaşabilmektedir (Schaad vd. 1978; Bahar vd. 2009b). *A. citrulli*, arginin dihidrolaz-negatif, oksidaz-pozitif, CVP (crystal violet pectat) ortamının çukurlaşması negatif, nitrat redüksiyonu ve levan üretimi negatiftir. Patojen de lipolitik ve nişastayı hidrolize etmez özellikle, ancak hafif jelatin hidrolizine neden olmaktadır (Somodi v. 1991). *A. citrulli* β-alanin, D-serin, n-propanol, etanol, sitrat ve fruktozu kullanır, ancak sükröz veya glukozda gelişme göstermemektedir (Schaad vd. 1978). *A. citrulli* strainleri genellikle inokülasyondan 24 saat sonra tütün yapraklarında hipersensitif bir tepki indüklemektedir (Somodi vd. 1991). *A. citrulli*'nin GC içeriği % 65-67 arasında değişmektedir (Schaad vd. 1978).

*A. citrulli*'nin *in-vitro* koşullarında gelişiminde farklı besi ortamlarında gelişim göstermektedir (Şekil 1.6). Çalışmalarda genellikle kullanılan ve bizim çalışmamızda da kullandığımız nutrient agar, King's B (King vd. 1954) ve *A. citrulli*'nin tohumdan tespiti için, yarı seçici besi ortamı ethanol bromcresol purple/brilliant blue R (EBB)'dir (Schaad ve Sechler 1999). EBB besi ortamında krem rengi ortası şişkin etrafında düzensiz çember ile çevrili tipik koloni oluşturmaktadır (Schaad ve Sechler 1999) (Şekil 1.6-c).



**Şekil 1.6.** *Acidovorax citrulli*'nin *in-vitro* koşullarda koloni gelişimi (a: NA, b: King's B, c: EBB)

Karpuz Bakteriyel Meyve Leke hastalığının ilk belirtisi kotiledon yapraklarda görülmektedir. Kotiledon suyla ıslanmış bir belirti oluşturur (Şekil 1.7-a). Daha sonra yapraklarda küçük koyu kahverengi lekeler oluşturur. Meyveler 2-3 haftalık gelişimdedeyken bile bakteriyel etmen tarafından enfeksiyondan etkilenebilmektedir. Meyvelerde oluşan lekeler ilk başta küçük, suyla ıslanmış gibi bir belirti oluşturur, daha sonra ise lekeler hızla büyür ve meyve kabuğunun tüm yüzeyini kaplayabilmektedir (Şekil 1.7-b). Yoğun nemli koşullarda meyve kabuğu üzerindeki lekelerin bulunduğu yerlerden bakteriyel sıvı (ooze) çıkışı gözlenmektedir (Şekil 1.7-c). İleri dönemlerde lekelerin rengi kırmızı kahverengiye dönmekte ve çatlaklar ortaya çıkmaktadır (Şekil 1.7-B). Bu çatlakların oluşması saprofit organizmaların, genel meyve çürüklüğüne sebep olabilmektedir (Şekil 1.7-d). Benzer belirtiler diğer cucurbit bitkilerinde de görülmektedir (O'Brien ve Martin 1999; Walcott 2005). Hastalık için uygun koşulların (sıcaklık, nem, yağışlı hava) olduğu bölgelerde kayıplar % 90-100 oranında olmaktadır (Anonim 2009).



**Şekil 1.7.** Karpuz Bakteriyel Meyve Lekesi hastalığının kotiledon yaprakta (a) ve meyvedeki tipik semptomları (b-c-d) (Walcott 2005)

Yetiştiricilikte üretim verimliliğini arttırmak için ticari tohumluk üretiminde fide transplantları kullanılmaktadır. Tohumlar sera koşullarına göre ekilerek 3-4 hafta sonra fideler tarlaya aktarılmaktadır. Yüksek sıcaklıklar, bağıl nem, yoğun bitki popülasyonları ve püskürtme sulama dahil olmak üzere tipik transplant koşulları, Karpuz Bakteriyel Meyve Lekesi gelişimi için oldukça elverişlidir ve fideler arasında hızla yayılabilmektedir. Aerosol üretimi nedeniyle, düşük oranda bile *A. citrulli* ile bulaşık tohumlardan elde edilen tohumlarda, % 100 fide enfeksiyonu ile sonuçlanabilmektedir. Son çalışmalar, bir tohum partisinde *A. citrulli* içeren tek bir tohumun bile sera koşullarında Karpuz Bakteriyel Meyve Lekesi bulaşmasına yol açabileceğini göstermiştir (Dutta vd. 2012a). Karpuz Bakteriyel Meyve Lekesinin yetiştiricilik alanında ilerlemesinin çevresel koşullara bağlı olmaktadır (Bahar ve Burdman 2010). İlkbahar veya yaz aylarında şiddetli yağış ve rüzgarlı koşullar Karpuz Bakteriyel Meyve Lekesi gelişmesine tetiklemektedir (Schaad vd. 2003). Alandaki enfekte bitkicikler; gerçek yapraklar ve daha önemlisi gelişmemiş meyveler için bir inokulum kaynağıdır (Latin ve Hopkins 1995). Patojenin stomaya (Frankle vd. 1993) veya çiçeğe (Walcott vd. 2003) nüfuz ederek meyveye bulaşması gerçekleşmektedir. Karpuz meyvesi enfeksiyonunun, meyve stomalarının anthesis sonrası 2-3 hafta oluştuğunu göstermiştir. Meyve gelişiminin erken aşamalarında, semptomlar yoktur, ancak karakteristik suyla ıslatılmış lezyonlar, hasat olgunluğundan kısa bir süre önce gelişmektedir. Meyveler sonunda

tarlada çürümekte ve çürüyen dokudaki bakteriler ya da içindeki kirlenmiş tohumlar sonraki mevsimde inokulum kaynağı olmaktadır (Frankle vd. 1993).

Karpuz Bakteriyel Meyve Leke hastalığının dayanıklı hiçbir ticari cucurbit çeşidi bulunmamaktadır. Bu nedenle, etkili hastalık yönetimi, tohum, transplant ve meyve üretiminde bir dizi yaklaşımın entegrasyonunu gerektirmektedir. Tohumlar primer inokulumun en önemli kaynağı olduğundan, tohum enfeksiyonunu önlemeye yönelik çabalar kritik olmaktadır. Kabakgil tohumları genellikle serin kuru iklime sahip veya kuru dönemlerde olan ülkelerde üretilir. Ticari tohum üretimi için sadece *A. citrulli* içermeyen stok tohumlar kullanılmalı ve tohum alanları kontaminasyondan kaçınmak için diğer cucurbit alanlarından fiziksel olarak ayrılmalıdır. Tohum alanları, Karpuz Bakteriyel Meyve Leke hastalığının meyve ve yaprak belirtileri açısından görsel olarak incelenmeli ve simptomatik bitkiler içeren alanlar tohum üretimi için kullanılmamalıdır (Burdman ve Walcott 2012). Cucurbit tohumlarının dekontaminasyonu için bir dizi tedavi önerilmiştir; ancak, bugüne kadar hiçbiri % 100 etkili olmamıştır. Tohum muamelelerinin etkinliğini etkileyen faktörler; tohum muamelelerinin tohum kabuğuna nüfuz etme yeteneği ve tohum üzerinde yada içinde bulunan bakterilerin lokasyonu olmaktadır. Uygulanan kimyasal ilaçların tohum muamelelerinde hastalığın fide aktarımını azalttığı bildirilmişse de, bunlar genellikle bakteriyi tohum yüzeyinde yok etmekte başarısız olmaktadır (Sowell ve Schaad 1979). Bu nedenle, mücadele uygulamaları giderek azalmaktadır. Kesin çözümünün bulunmaması sebebiyle, dayanıklı çeşit ve anaç kullanımı, hastalığın kontrolünde büyük önem kazanmaktadır. *A. citrulli*, sadece o yılın ürününü etkilemekle kalmayıp, karpuz tohumları ve bitki artıkları ile gelecek yıllardaki ürüne de etki edip bazı durumlarda meyvenin yetiştiricilik alanında patlamasına ve bitki artıklarının alana yayılmasına neden olmaktadır. Bu derece önemli olan bir hastalığın, modern biyoteknolojik yöntemler kullanılarak tanısının yapılabilmesi kapsamında çalışmalar yürütülecektir. Hastalık etmeninin bitki materyalinden erken tespit ve hızlı tanısı ile erken mücadelenin yapılması hastalığın zararının en aza indirilmesine olanak sağlayacaktır. Bu çalışma ile hem patojenin hızlı ve güvenilir tanısı için primer ve prob geliştirilerek bitkisel materyallerden kesin ve güvenilir tespit hedeflenmiş hem de Türkiye’deki yerel ve ticari karpuz çeşitleri test edilerek dayanıklı çeşit elde edilmesi hedeflenmiştir.

Bakteriyel patojenlerin tanı ve tespitinde geçmişten günümüze kadar geliştirilen birçok yöntem bulunmaktadır. Bunlar; hastalıklı bitki materyallerinden besi ortamlarına izolasyon, fidelerde belirti izleme yöntemi, test bitkilerine inokulasyon yöntemi, bakteriyofaj yöntemi, serolojik yöntemler, biyokimyasal yöntemler, mikroorganizmaların yağ asidi kompozisyonunun belirlenmesi ve genetik farklılıkların esas alındığı modern biyoteknolojik yöntemlerinden olan klasik PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ve Real-Time PCR (Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu) yöntemleridir.

Bu hastalığın kontrolünde çeşitli kültürel tedbirler, sertifikalı tohum kullanımı, tohuma çeşitli kimyasal ve biyolojik uygulamalar, yeşil aksam ilaçlamaları, toprak solarizasyonu uygulanırken, hastalık etmenine karşı en etkili mücadele yöntemi dayanıklı çeşittir.

*A. citrulli*’nin sebep olduğu Karpuz Bakteriyel Meyve Leke hastalığının etkin bir kimyasal mücadelesinin olmaması, meyvede verdiği zararın ekonomik açıdan çok fazla olması ve tohum kaynaklı bir patojen olmasının yanında karantina listesinde yer alması

gibi önemli faktörler etmenin erken dönemlerde tespitini gerekli kılmıştır. Bu amaçla çalışma kapsamında *A. citrulli*'nin spesifik primer seti ve prob geliştirilerek, Real-Time PCR yöntemi ile hastalığın direkt bitki dokularından hızlı, hassas ve kesin bir şekilde tanı ve tespiti amaçlanmıştır. Ayrıca yine bu çalışma kapsamında *A. citrulli*'nin tohumdaki popülasyon yoğunluğunun belirlenmesi için Kantitatif Real-Time PCR yöntemi ile tespit amaçlanmıştır.

## 2. KAYNAK TARAMASI

Ekonomik olarak önemli bitki hastalıklarının ve nedensel ajanlarının çoğu, modern fitopatolojinin ortaya çıkmasıyla birlikte, 19. yüzyılın sonları ile 20. yüzyılın başlarında tanımlanmıştır. Aksine, *Acidovorax citrulli*'nin rapor edilme tarihi 1960'larda başlamış ve 1980'lerin sonuna kadar bu hastalığın ekonomik etkisi önemli düzeyde olmamıştır. Bu nedenle, diğer önemli bitki hastalıklarına göre *A. citrulli*'nin oluşturduğu hastalıkla ilgili tespitler ve çalışmalar yakın geçmişte başlamıştır (Burdman ve Walcott 2012).

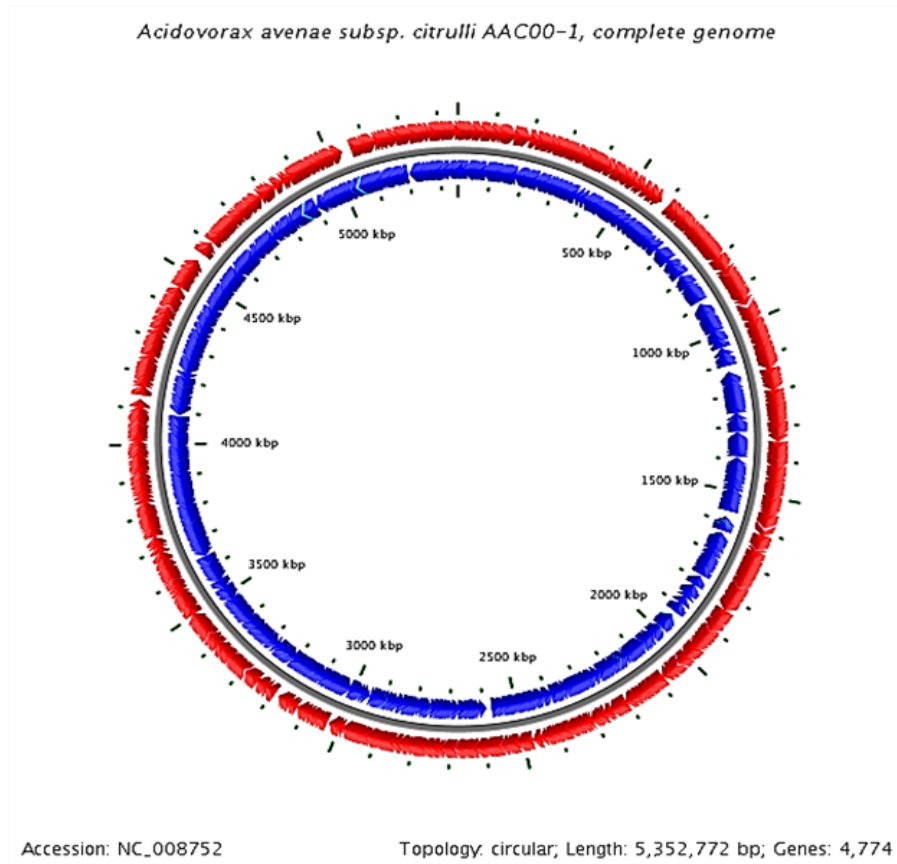
Karpuz Bakteriyel Meyve Leke hastalık etmeni *A. citrulli* kabakgillerde hastalık oluşturmaktadır. İlk olarak karpuz fidelerinde tespit edilerek *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli* (Schaad vd. 1978) olarak isimlendirilmiştir. Daha sonra ise DNA/DNA ve DNA-rRNA homolojisi ve fenotipik karakterlere göre tekrardan sınıflandırılarak *A. avenae* subsp. *citrulli* olarak isimlendirilmiştir (Willems vd. 1992). En son isimlendirme *A. citrulli* 16S rDNA ve 16S-23S rDNA ITS (internal transcribed spacer) bölgelerine ait dizilere ve AFLP analizlerine göre sınıflandırılmıştır (Schaad vd. 2008).

*A. citrulli*'nin biyolojisi ve patojenisitesine dayalı çok az şey bilinmektedir. Genom dizisi yapılan grup II straini AAC00-1'in (Joint Genome Institute (JGI; GenBankNC\_008752) tarafından 2007 yılında yayınlanmış Çizelge 2.1 ve *A. citrulli*'nin çok yönlü araştırılmasına büyük katkı sağlamıştır. AAC00-1 genomu, yaklaşık 5.3 Mb'lik tek bir dairesel kromozom içermektedir (Şekil 2.1). Yapılan çalışmalar ile Grup I ve II genomları arasındaki karşılaştırmalı analizlerin, uygun deneysel yaklaşımlarla birleştirilmesi, iki *A. citrulli* grubunun genetik faktörlerin belirlenmesini sağlayacağı düşünülmektedir (Burdman ve Walcott 2012).

**Çizelge 2.1.** *Acidovorax citrulli* AA C00-1 genomunun özellikleri

Özellikler	
Sıralama merkezi	DOE Joint Genome Institute
Yayın Tarihi	1 Mart 2007
Sıralama yöntemi	Sanger
Sıralama derinliği	11X
Dağılım	Tek bir kromozom
Boyut (bp)	5 352 772
GC (%)	68.53
DNA kodlama bölgeleri (%)	89.47
Toplam gen sayısı	4868
Protein kodlama genleri	4793
Tahmini fonksiyonlara sahip protein kodlama genleri	3376 (69.35%)
Açık okuma çerçeveleri sayısı	4709

\*JGI Entegre Mikrobiyal Genomlar (IMG; <http://img.jgi.doe.gov>) ve Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).



**Şekil 2.1.** *Acidovorax citrulli* (*Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*) AA C00-1 genom haritası

*A. citrulli* hastalık etmeninin tarihsel gelişiminde; 1965 yılında ABD'de bulunan ABD Tarım Bakanlığı Bitki Tanıtım İstasyonunda, Türkiye'den elde edilen nekrotik karpuz kotiledonlarından izole edilmiş, tanımlanamayan, tohumla taşınan bir fitobakterium bildirilmiştir (Webb ve Goth 1965). Webb ve Goth raporundan dört yıl sonra Crall ve Schenck 1969 yılında Karpuz Bakteriyel Meyve Lekesi simptomlarını tanımlamışlardır. 1967 ve 1968'de Leesburg, FL, ABD'deki deneysel bir istasyonda, yaprak lekeleriyle birlikte, meyve üzerinde büyük, koyu yeşil, suyla ıslatılmış lezyonların görünümünü bildirmişlerdir. Bununla birlikte, 1980'lerin sonuna kadar, hastalık sadece fideleri etkilediği ve tarlada karpuz meyvelerinde düşük bir hasar potansiyeline sahip olduğu düşünülmüştür (Sowell ve Schaad 1979). Hastalığın fide ile sınırlı olduğu bildirilmiş ve bu hastalık oluşumunun nedensel etmeni daha sonraki çalışmalarda Schaad ve arkadaşları tarafından 1978 yılında *Pseudomonas pseudoalcaligenes* ssp *citrulli* olarak sınıflandırılmıştır. İlk Karpuz Bakteriyel Meyve Leke hastalığının yaygınlığı Mariana Adaları'nda meydana geldiği (Wall ve Santos 1988) ve tüm karpuz tarlalarının meyve infeksiyonu sonucu kaybolduğu 1987 yılına kadar bu patojenin yıkıcı potansiyeli tespit edilmemiştir. Ticari karpuz alanlarındaki salgınlar, Florida, Indiana, Delaware ve Texas'taki yüksek verim kayıplarıyla birlikte hızla yayılmıştır (Latin ve Rane 1990; Evans ve Mulrooney 1991; Somodi vd. 1991; Black vd. 1994).



1995 yılında Sultaniçe köyü (Enez-Edirne) ticari karpuz tarlalarında karpuz üretimini önemli ölçüde azalmasının nedeni olan hastalık gerçek yapraklarda nekroz, geniş kök nekrozu ve meyve lekesi ile karakterize edilmiştir. Meyve, yaprak, yaprak sapı, dal ve kök lezyonlarının kenarlarından bir floresan olmayan Gram -, oksidaz + bakterisi izole edilmiştir. Bu izolatın tütünde aşırı duyarlılığı indüklediği test edilmiştir (cv. White Burley). Patojenik testler için, hem karpuz meyvesi hem de kotiledonlara,  $10^8$  cfu/ml bakteri süspansiyonu kullanılarak enjeksiyon ile inokülasyon yapılmıştır. Bakterinin doğal tohum kaynaklı aşılınması, enfekte olmuş karpuz meyvesinden çıkan 260 tohumdan 44'ünün fideler üzerinde semptomlara neden olduğu saptanmıştır. İzole edilen bakterinin morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri *A. avenae* subsp. *citrulli*'nin bildirilen özelliklerine benzediği için ve *A. avenae* subsp. *citrulli* olarak tanımlanmış ve bu Türkiye'de bakteri meyve lekelerinin ilk raporu olmuştur (Demir 1996).

1997'nin başlarında, Managua, Nikaragua ve Tipitapa'daki karpuz yetiştiricileri, meyvelerinde tanımlanamayan bir hastalık bildirmiştir. Sorunun kullanılan tohumlardan kaynaklı olduğu belirlenmiştir. Tarım Bakanlığı Bitki Koruma Bölümü tarafından bulaşık tohumlar toplatılmış ve bir dizi laboratuvar testi uygulanarak hastalığa, *A. avenae* subsp. *citrulli*'nin neden olduğunu saptamışlardır. Bu Nikaragua'daki bu bakterilerin ilk bildirilen raporu olmuş ve yerleşik patojenlerin listesine eklenmiştir (Munoz ve Monterroso 2002).

1990'larda, Karpuz Bakteriyel Meyve Leke hastalığının hızla yayılmasını konukçu aralığının genişlemesi ve küresel büyümesini etkilemiştir (Isakeit vd. 1997, 1998; Langston vd. 1999, Martin ve O'Brien, 1999; Walcott vd. 2004). Patojen dünya çapında, özellikle uluslararası üretim ve bulaşık tohumların satışı yoluyla yayılmıştır. Bugüne kadar Amerika, Asya, Avrupa, Afrika, Orta ve Uzak Doğu ve Avustralya'da Karpuz Bakteriyel Meyve Leke hastalık etmeni salgınları bildirilmiştir (Evans ve Mulrooney, 1991, Somodi vd. 1991, Black vd. 1994, O'Brien ve Martin, 1999, Schaad vd. 2003, Walcott vd. 2004, Burdman vd. 2005; Mirik vd. 2006, Ren vd. 2006, Palkovics vd. 2008, Park vd. 2008, Amadi vd. 2009, Holeva vd. 2010). Ayrıca, patojenin, konukçu olmayan bitkilerin tohumları yoluyla yayılması da mümkün olduğu bildirilmiştir. Assouline vd. 1997 yılında, İsrail'in, ülkeye ithal edilen domates tohumu sevkiyatlarından ve ithal tohumlardan elde edilen patlıcan fidelerinde Karpuz Bakteriyel Meyve Leke hastalık etmeninin izole edildiği bildirilmiştir. Bu rapor doğrultusunda 2000'li yılların başında İsrail'de hem karpuz hem de kavunda Karpuz Bakteriyel Meyve Leke hastalığı salgınları görülmüştür (Burdman vd. 2005).

Türkiye'nin Doğu Akdeniz Bölgesi'ndeki Adana ilinde 35.000 ha bir üretim alanında 2005 baharında, Karpuzda Bakteriyel Meyve Leke hastalığına benzeyen ciddi bir salgın gözlenmiştir. Bu çalışmada incelenen 13 ticari karpuz tarlasında, semptomlu meyve yaygınlığı % 30 ile 45 arasında olduğu gözlenmiştir. Bakteriler, etkilenmiş meyvelerden sürekli olarak izole edilmiş ve King's B besi ortamı üzerinde floresan olmayan koloniler gözlenmiştir. Tüm izolatlar oksidaz pozitif, gram negatif, arginin dihidrolaz negatif ve tütün yapraklarında hipersensitif yanıt oluşturmuştur. Biyokimyasal testler ve tek karbonlu substrat kullanımına dayanılarak % 75 ila 93 benzerlik indeksleri ile izolatların *A. avenae* subsp. *citrulli* olduğu belirlenmiştir. Üç hasat edilmiş karpuz meyvesinin kabuğu altında ve üç fidenin gövdesine bakteri süspansiyonu ( $10^8$  cfu/ml salin) enjekte edilerek saptanan dokuz strain için patojenisite testi gerçekleştirilmiştir.

Salin negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Aşılamadan 3 ila 5 gün sonra, tipik belirtiler gelişmiştir. Bakteri, inoküle edilmiş meyvelerden ve fidelerden kolaylıkla yeniden elde edilmiştir. Türkiye'nin Doğu Akdeniz Bölgesi'nde karpuz üzerinde ilk Karpuz Bakteriye Meyve Lekesi salgını olarak rapor edilmiştir (Mirik vd. 2006).

Taksonomi ile ilgili olarak yapılan çalışmaların yüksek seviyelerde fenotipik ve rRNA cistron benzerliklerinin bir sonucu olarak *Pseudomonas* cinsinden farklılıklar gözlemlendiği için *Acidovorax* cinsi üyelerine transfer edilmiştir (Willems vd. 1992) ve *Pseudomonas pseudoalcaligenes* ssp. *citrulli* (Schaad vd. 1978) *A. avenae* ssp. *citrulli* olarak yeniden sınıflandırılmıştır. Daha sonraki çalışmalar ile *A. avenae*'de ssp. *citrulli* iki diğer fitobakteriyel alt tür olduğu yulaf, mısır, buğday, arpa, çavdar, sorgum, şeker kamışı ve pirinç fideleri dahil olmak üzere Poaceae familyasının çeşitli türlerine patojenik olan *A. avenae* ssp. *avenae* ve orkideler için patojen olan *A. avenae* ssp. *cattleyae*'nin bulunduğu *Acidovorax* cinsine aktarılan (Willems vd. 1992) ve adlandırılan taksonomik çalışmalara son zamanlardaki çalışmalar ilave edilerek yeniden sınıflandırma önerilmiş ve Karpuz Bakteriye Meyve Leke hastalığının etmeni *A. citrulli* olarak tür seviyesinde yeniden adlandırılmıştır (Schaad vd. 2008).

*A. citrulli*'nin hastalıklı bitki materyalinden özellikle yaprak ve meyveden izolasyonda farklı yarı-seçici besi ortamları geliştirilmiştir. King's B ortamında 41 °C inkübasyonda ve 48 saat sonra pürüzsüz, yuvarlak krem renkli koloniler gelişmiştir (Schaad vd. 1978). Yeast extract-dextrose-CaCO<sub>3</sub> (YDC) agar ortamında saydam non-mukoid ve yuvarlak bej renkli koloniler oluşmuştur (Jones vd. 2001). Tohumlardan izolasyonda birkaç yarı-seçici besi ortamları geliştirilmiştir. Bunlar Ethanol bromcresol purple/brilliant blue R (Schaad ve Sechler 1999) ve ampicillin içeren EBB ortamı olan EBBA (Zhao vd. 2009) ortamlarıdır. EBB ortamları *A. citrulli*'nin koloni farklılaşması için geliştirilmiştir (Schaad ve Sechler 1999). İzolasyonda elde edilen bakteriyel süspansiyon 37 °C de gelişmeye bırakılarak inkübasyondan beş gün sonra EBB veya EBBA ortamında 1.5-2 mm çapında, dışbükey, hafif açık kenar boşlukları ile yayılan yeşil-mavimsi koloniler elde edilmiştir (Zhao vd. 2009).

Fide transplant tesislerinde Karpuz Bakteriye Meyve Lekesi için sıfır toleransla, tohum sağlığı testi hastalık yönetimi için çok önemlidir. *A. citrulli* için tohumların test edilmesinde birçok polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) bazlı yöntemler geliştirilmektedir (Walcott ve Gitaitis 2000; Song vd. 2003; Fessehaie vd. 2005; Bahar vd. 2008; Park vd. 2008). Bununla birlikte, cucurbit tohumları PCR inhibitörleri içerdiğinden, Bio-PCR, immünomagnetik ayırma ve PCR (IMS-PCR) ile manyetik yakalama hibridizasyonu ve PCR gibi bir dizi teknik, algılama doğruluğunu ve verimliliğini arttırmak için geliştirilmiştir (Walcott ve Gitaitis 2000; Walcott vd. 2006; Ha vd. 2009; Zhao vd. 2009).

Nükleik asit temelli moleküler yöntemler de *A. citrulli* ait 16S ribozomal DNA (rDNA), 16S-23S internal transcribed spacer (ITS) bölgesi, BOX fragmenti ve *hrp* gen dizisi kullanılarak farklı metotlar geliştirilmiştir (Woese 1987).

*A. citrulli*'nin 16S-23S ITS bölgesine göre klasik PCR yöntemi için SEQID4/SEQID5 primerleri dizayn edilmiştir. Yapılan çalışmada primerlerin *A. citrulli*'nin tespiti için yüksek spesifiklikte olduğu tespit edilmiştir (Schaad vd. 2000).

Karpuz tohumunda *A. avenae* subsp. *citrulli*'nin saptanması için immünomagnetik ayırıştırma ve polimeraz zincir reaksiyonu (IMS-PCR) bazlı bir deney geliştirilmiştir. IMS, King's B besi ortamına doğrudan yayılma üzerine *A. avenae* subsp. *citrulli*'nin geri kazanılmasında 10 kat artış görülmüş ve tohum enkazının varlığı IMS verimliliğini azaltmıştır. Sentetik oligonükleotid primerleri, bilinen *A. avenae* subsp. *citrulli*'nin 16S rRNA genine dayanılarak tasarlanmış ve PCR ile spesifik DNA amplifikasyonu için test edilmiştir. Test edilen tüm *A. avenae* subsp. *citrulli* strainlerinde primerler DNA'ya bağlanmış amplifikasyon gerçekleşmiş fakat aynı zamanda yakın ilişkili birçok bakteri ile ampikonlar oluşturduğu gözlenmiştir. IMS-PCR, direkt PCR'ye göre IMS-PCR için *A. avenae* subsp. *citrulli*'nin belirlenme eşiği, karpuz çekirdeği yıkamasında 10 cfu/ml ve % 0.1 enfekteli çekirdekler tutarlı bir şekilde tespit edilmiş. IMS-PCR, karpuz çekirdeklerinde *A. avenae* subsp. *citrulli*'yi tespit etmede kullanılabilirliği belirlenmiştir. Fakat çalışmada diğer *Acidovorax* türleri de tespit edilebildiğinden kaynaklı bu primerlerin spesifiklik seviyesi yüksek olmadığı belirlenmiştir (Walcott ve Gitaitis 2000).

*A. avenae* subsp. *citrulli* ile bulaşık tohumların karpuz çiçeği aşılamadaki etkinliğinin araştırılmasında çiçek başına  $1 \times 10^7$  veya  $1 \times 10^9$  cfu *A. avenae* subsp. *citrulli* bakteri süspansiyonları kullanılmıştır. Bulaştırılmış çiçeklerden elde edilen yaklaşık % 98 (84/87) meyvede symptom oluşmadığı gözlenmiştir. İmmünomagnetik ayırılma ve polimeraz zincir reaksiyonu kullanılarak, meyve symptomlarının olmamasına rağmen, test edilen tohum partilerinin % 44'ünde *A. avenae* subsp. *citrulli* tespit edilmiştir. Ayrıca, tohum partilerinin % 31'inden canlı hücre saptanmıştır. Çalışmada karpuz çiçeklerinin, *A. avenae* subsp. *citrulli* tarafından meyve ve tohum bulaşması için potansiyel bir giriş yeri olduğunu ortaya konulmuştur (Walcott vd. 2003).

*Acidovorax avenae* türlerinin ve *A. avenae* subsp. *citrulli*'nin hızlı tespiti için PCR analizleri geliştirmek için, 16S-23S rDNA'nın intergenik aralayıcı bölgesinin dizisi elde edilmiş ve bu bölgeye spesifik klasik primerler ve real-time PCR primerleri ve problemleri tasarlanmıştır. Türler özgü klasik primerleri Oaf1/Oar1 ve real-time PCR primerleri Oaf1/Oar2 ve prob AaP1, farklı konukçulardan tüm *A. avenae* strainlerinde tanımlama gerçekleştirmiş, buna karşılık *A. avenae* subsp. *citrulli*'ye özgü klasik primerler Aacf2/Aacr2 ve Real-Time PCR primerleri Aacf3/Aacr2 ve prob AaP2 sadece *A. avenae* subsp. *citrulli*'de spesifik olduğu diğer türlerde amplifikasyon gerçekleştirmediği saptanmıştır (Song vd. 2003).

Bir dizi cucurbit konukçularından elde edilen 121 *A. citrulli* straini evrensel popülasyonunu analiz etmek için PFGE-DNA parmak izi ve gaz kromatografisi-yağ asidi metil esterini (GC-FAME) kullanarak, genetik ve fizyolojik olarak ayrı iki grup olduğu ortaya konulmuştur. Grup II strainleri esas olarak karpuzdan izole edilirken, grup I ATCC tipi straininin yanı sıra diğer cucurbit konakçularından elde edilen strainleri içerdiği saptanmıştır (Walcott vd. 2000). Sonraki bir çalışmada, tekrarlayan PCR kullanarak iki genetik olarak ayrı *A. citrulli* strainlerinin varlığını doğrulamışlardır. Grup I strainlerinde ayrıca L-leucine olmadığı ve bir dizi cucurbit konukçusunda orta derecede agresif olduğunu doğrulanmıştır. Bunun aksine, esas olarak karpuzdan izole edilen grup II strainlerinin, karpuz üzerinde oldukça agresif olduğu, ancak sadece diğer cucurbitlerde hafif derecede agresif olduğu saptanmıştır (Walcott vd. 2004).

*A. avenae* subsp. *citrulli*, İsrail'deki 2000 ile 2003 yılları arasında karpuz ve kavunda yetiştirilen alanlarda ilk önemli hastalık oluşumu gerçekleştiği rapor edilmiştir. Bu salgınlarla ilişkili 12 bakteriyel izolatı, patojenite analizleri, yağ asit metil esterlerin gaz kromatografisi ve substrat kullanım profilleri ile ortaya konulmuştur. İzolatların tohum, fide ve meyve aşılı ile farklı konukçularda agresif olmaları ve PFGE ve tekrarlayan-PCR yaklaşımları kullanılarak DNA parmak izi profillerine göre karakterize edilmiştir. *A. avenae* subsp. *citrulli* içerisindeki iki farklı grubun, biri karpuz (grup II) ile daha çok ilişkili olan strainleri içerdiği, diğeri ise genellikle sudan etkilenmeyen kabakgiller ile ilişkili olan strainleri (grup I) içerdiğini saptamışlardır. Çalışmada, her iki gruptan alınan izolatların İsrail'de elde edilen izolatların PFGE analizi ile, daha önce rapor edilmemiş olan beş farklı haplotipe bölünebildiği saptanmıştır (Burdman vd. 2005).

*A. avenae* subsp. *citrulli* için ticari ölçekli PCR tabanlı analiz geliştirmek için immünomagnetik ayrılma (IMS) parametreleri optimize edilmiştir. Hedef hücre geri kazanımı için en uygun koşullar, kaplama için  $10^8$  immünomagnetik boncuk (IMB) başına 40 µg poliklonal anti-AAC antikoru, numune başına  $2.5 \times 10^7$  IMB ve 4 °C'de bir saat boyunca immünokaplamayı uygulamışlardır. Yapay olarak bulaştırılmış tohumlarla ( $10^4$  cfu/tohum) kontamine olmuş lotların kullanılmasıyla IMS-PCR, patojen % 25 ve % 87.5 oranında (n=10.000 tohum) sırasıyla % 0.01 ve % 0.1 bulaşıklığı saptamışlardır. Benzer bulaştırmaya sahip tohumluklar için, fide büyütme testi (SGO) için tespit frekansları % 12.5 ve % 37.5 bulunmuştur. Çalışmada, IMS-PCR'nin *A. avenae* subsp. *citrulli* ticari karpuz çekirdeklerinden tespiti için SGO'ya etkili bir alternatif olarak büyük bir potansiyele sahip olduğu saptanmıştır (Walcott vd. 2006).

Karpuz Bakteriyel Meyve Leke patojeni *A. avenae* subsp. *citrulli*'nin tespiti için bir immüno-yakalama PCR (IC-PCR) yöntemi, florür iyon seçici elektrot (ISE) yöntemi geliştirildi ve klasik PCR tekniği ve doğrudan PCR yöntemi ve büyüme kontrol yöntemi ile karşılaştırılmıştır. Sonuçlar, *A. avenae* subsp. *citrulli*'nin test edilen tüm strainlerinde, IC-PCR ve direkt PCR yöntemiyle 360 bp spesifik fragment oluşturduğu, diğer 10 farklı cins strainin ise negatif PCR sonucu gösterdiği saptanmıştır. IC-PCR ve direkt PCR yönteminin minimum saptama konsantrasyonu, sırasıyla yaklaşık  $50-10^2$  cfu/mL ve  $10^4$  cfu/mL olarak belirlenmiştir. IC-PCR ile pazarlardaki 7 farklı kavun tohumunun tespiti, 1 kantalup kavun çeşidinin, 2 bal kavun çeşidinin ve 2 karpuz çeşidinin tohumunun, neredeyse kavun tohumlarının büyüme kontrolünün sonucuyla eşleşen patojeni taşıdığını göstermiştir. IC-PCR'nin doğru, hassas, hızlı ve düşük maliyetli olduğu bu çalışmada vurgulanmıştır (Zhao vd. 2006).

*A. citrulli*'nin tohumdan tespiti için magnetik çekim-hibridizasyon PCR (MCH-PCR) yöntemi geliştirilmiştir. Bu yöntemde bir biyotinlenmiş hibritleşme yakalama sistemi bir streptavidin bağlantısı bir manyetik boncuk ile konjuge edilmiştir. Sonrasında denatüre olmuş DNA ekstraktına streptavidin kaplı manyetik boncuklar eklenir ve hibridizasyon gerçekleşmiştir. MCH Real-Time PCR yöntemi için BOX fragmentine göre 480 bp bölgeyi çoğaltan BOXAACF/BOXAACR2 primer seti ve 26 bazdan oluşan AACPROBE probe geliştirilmiştir. En düşük hücre konsantrasyonu  $10^5$  cfu/ml belirlenmiştir (Amagliani vd. 2006; Feng vd. 2006; Zhao vd. 2009). Benzer bir çalışmada ITS bölgesine göre 448 bp bölgeyi çoğaltan HuiF/HuiR primerleri ve 26 bazdan oluşan HuiP probu (TAMRA) geliştirilmiştir (Hui vd. 2007).

Karpuzda Bakteriyel Meyve Leke hastalığına neden olan *A. avenae* subsp. *citrulli*'nin tespiti için immuno-capture polimeraz zincir reaksiyonu (IC-PCR) metodu geliştirilmiştir. Bu yöntemde klasik PCR ile immunosorbent enrichment (ISE) birleştirilmiştir. IC-PCR ve klasik PCR yönteminde 360 bp kısmın amplifikasyonuna göre sonuçlar değerlendirilmiştir. Çalışmada sırasıyla minimum 50-100 cfu/ml ve  $10^4$  cfu/ml konsantrasyonlar tespit edilmiştir (Xiao vd. 2007).

Bakteriyel Meyve Leke hastalığına neden olan tohum kaynaklı *A. avenae* subsp. *citrulli* bakterisinin saptanması için yeni alt tür spesifik primerler, Aac strainleri ERIC ve BOX-PCR profillerinde elde edilen PCR fragmanlarına dayanılarak tasarlanmıştır. Her iki primer grubu ile PCR, farklı konumlardan ve konakçılardan alınan 30 strain tanımlanmış, ancak, *A. avenae* subsp. *citrulli*'nin bir strainin DNA'sı hariç, değerlendirilen diğer yakın türlerden ve alt türlerden DNA'yı çoğaltmamıştır. Klasik PCR yöntemi için BX-L1/ BX-S-R2 primerleri *A. citrulli*'nin BOX-PCR fragmentine göre dizayn edilmiş ve bu primerlerin yüksek spesifiklikte olduğu ve uygun olmayan koşullarda (annealing sıcaklığı 68 °C) bile duyarlılığının yüksek olduğu tespit edilmiştir. Primerler ayrıca kontamine karpuz ve kavun tohumu örneklerinden patojeni tespit etme yetenekleri açısından da değerlendirilmiştir. BX-S primerleri, % 0.02 infestasyon ile 5000 tohumlu örneklerin yıkanmasından patojenin saptanmasını kolaylaştırmıştır. Bu primer seti ayrıca immünomagnetik ayırma polimeraz zincir reaksiyonu (IMS-PCR) kullanılarak tespit için değerlendirilmiş ve tohum numunelerinde % 0.02'lik bulaşmayı saptayarak daha önce açıklanan bir primer seti (AACF2 / R3) kadar hassas olduğu saptanmıştır (Bahar vd. 2008).

Karpuz tohumlarından *A. citrulli*'nin tespiti için birkaç duyarlılığa göre tespit edebilen modifiye membran filtre immün boyaması (MFIS) yöntemi geliştirilmiştir. 1000 ticari tohumun cfu başına 100 ml tampon buffer uygulaması yapılmıştır (Matsuura vd. 2008).

Cucurbit manyetik yakalama hibridizasyonu (MCH) ve multipleks gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonunun (PCR) kullanılmasıyla *A. avenae* subsp. *citrulli*'nin ve *Didymella bryoniae*'nin tespiti yapılmıştır. *A. avenae* subsp. *citrulli*'nin DNA'sını hedefleyen tek iplikçikli DNA hibridizasyon yakalama problemleri, bakteriyel etmenin ve sakızlı kök yanıklığının etmeni izolatları, manyetik partiküllere kovalent olarak eklenmiş ve şablon DNA'sını selülozik tohumdan seçici olarak konsantre etmek için kullanılmıştır. Sekanslı şablon DNA'lar daha sonra patojene özgü TaqMan PCR deneyleri kullanılarak multipleks gerçek zamanlı PCR ile amplifiye edilmiştir. MCH multipleks gerçek zamanlı PCR testinde, en düşük sınır *A. avenae* subsp. *citrulli*'nin 10 cfu/ml tespit edilmiştir. Doğrudan gerçek zamanlı PCR testi, test edilen numunelerin % 25'inde (1/4 örnek) 100 fg/ $\mu$ l'lik *A. avenae* subsp. *citrulli* DNA'sı için bir saptama eşiği göstermesine rağmen, MCH gerçek zamanlı PCR'si % 100 algılama frekansı göstermiştir (Ha vd. 2009).

Karpuz Bakteriyel Meyve Leke hastalık etmeni olan *A. avenae* subsp. *citrulli* için geliştirilmiş bir çift antikoru sandviç nokta enzim bağlantılı İmmünosorbent Testi (DAS-Dot-ELISA) oluşturulmuştur. Bu geliştirilmiş DAS-Dot-ELISA testinde *A. avenae* subsp. *citrulli*'nin en düşük yoğunluk oranı  $1.9 \times 10^5$  cfu/ml belirlenmiştir. Her bir tohumun sonucu olarak, bu geliştirilmiş yöntem, % 99'unda microwell plaka ELISA ile çakışmış ve tatmin edici bir beklenti gösterdiğini saptamışlardır (Xiong vd. 2010).

*A. citrulli* için membran filtrasyonu ve döngü-aracılı izotermal amplifikasyon (LAMP) kullanılarak yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemde *hrpG-hrpX* gen dizisine göre F3/B3/FIP/BIP primerleri kullanılmıştır. Çalışmada, bakteri hassasiyeti  $10^3$  cfu/ml olarak belirlenmiştir (Oya vd. 2008). Son yıllarda da alttırlere spesifik olan HB2F2/HB2R2 primerleri *hrpB2* gen dizisine göre dizayn edilmiştir (Tian vd. 2010).

Karpuz Bakteriyel Meyve Leke hastalık etmeni *A. citrulli*'nin tespiti için ithal edilen karpuz tohumların doğrudan ezilmesiyle, çift antikorlu sandviç enzim bağlantılı immünosorbent (DAS-ELISA) yöntemi ile immunocapture polimeraz zincir reaksiyonu (IC-PCR) yöntemi kullanılarak tespit edilmiş, PCR ürünü çoğaltılmış ve dizilenmiştir. Sonuçlar, DAS ELISA-pozitif örneklerinin, IC-PCR testine tabi tutulduğunda da pozitif sonuçlar verdiğini göstermiştir. Dizi, *A. citrulli*'nin karşılık gelen 16S ribozomal RNA (rRNA) gen dizisine % 100 homoloji gösterdiği bulunmuştur. Sonuçlar ile 2006 yılında Tayvan, Çin'den ithal edilen bu karpuz tohumlarında *A. citrulli*'nin bulunduğunu göstermiştir (Furong vd. 2010).

Karpuz ve kavun meyve lekesine sebep olan tohum kaynaklı bakteri *A. avenae* subsp. *citrulli*'nin tespiti için immunosensöre dayalı spesifik monoklonal antikorlar 11E5 (MAb 11E5) kullanılarak yüzey plazmon rezonans (SPR görüntüleme) geliştirilmiş ve geleneksel ELISA tekniği ile karşılaştırılmıştır. SPR görüntüleme tekniğini kullanan *A. avenae* subsp. *citrulli* saptama sınırı (LOD) ve doğrudan saptama analizi  $10^6$  cfu/ml olarak belirlenmiş ve bir poliklonal antikor (PAb) kullanılarak SPR sinyalinin bir sonraki amplifikasyonu LOD'u  $5 \times 10^5$  cfu/ml'ye indirilmiştir. *A. avenae* subsp. *citrulli*'nin ELISA tekniği ile saptanması için için LOD oranı,  $5 \times 10^4$  cfu/ml belirlenmiştir. Bununla birlikte, SPR görüntülemesine dayanan sensör yüzeyi, yüzey rejenerasyonu açısından önemli bir avantaj sunarak, daha kısa bir zaman tahliliyle en az beş çevrime, çok-yönlü saptama üzerine bir uygulama ile çok kanallı analize ve yüzey kullanımı için kolay bir kullanıma olanak sağlamıştır. Doğal olarak enfekte olmuş bitkide *A. avenae* subsp. *citrulli* tespitinde yüzey doğal olarak enfekte olmuş numuneye karşı test edilmiş ve *A. avenae* subsp. *citrulli* bakterilerine karşı iyi seçicilik gösterdiği saptanmıştır (Puttharugsa vd. 2011).

*A. avenae* subsp. *citrulli*'nin saptanması için altın nano parçacık etiketli oligonükleotid problara dayanan DNA şerit sensörü geliştirilmiştir. Hedef DNA'nın hem nitel hem de yarı niceliksel saptamaları, geliştirilen DNA şerit sensörü kullanılarak saptanmıştır. Şerit sensörünün kalitatif tespit limiti (LOD) 4 nM olarak belirlemişlerdir. Yarı kantitatif tespit için LOD, 0-10 nM aralığında 0.48 nM olarak hesaplanmıştır. Genomik DNA'yı doğrudan DNA şerit sensörü kullanılarak tespit edilmiştir. Bu DNA şerit sensörü yerinde hızlı DNA taraması için potansiyel olarak yararlı bir araç olacağı çalışmada vurgulanmıştır (Zhao vd. 2011).

*A. avenae* subsp. *citrulli*'yi tohumdan saptamak için geliştirilen yöntemde; tohumlar 2 hafta boyunca test tüplerinde yetiştirilmiş ve bakteriler tohumlarda ve fidelerde yarı seçici olarak geliştirilmiştir. Daha sonra bitkiler, bakteriyel hücreleri askıya almak için su içinde kuvvetli bir şekilde çalkalama yapmışlar ve elde edilen süspansiyon, koloni sayısını belirlemek için seçici bir ortama yayılmıştır. Yöntemin, bakteri ile enfekte olmuş tohumların yüzdesini değerlendirmek için araştırma amaçlarına uygun olduğunu,

ancak binlerce tohumla birlikte ticari partilerdeki bakteriyel kontaminasyonu tespit etmekte uygun olmadığını saptamışlardır (Kubota vd. 2011).

Tohum kaynaklı bakteri *A. citrulli* 'ye özgü yeni bir monoklonal antikor (MAb) üretilmiştir. MAb 11E5, özellikle 19 *A. citrulli* strain ile reaksiyona girmiştir, ancak Comamonadaceae familyasından üç bakteri ile (*A. facilis*, *Comamonas acidovorans* ve *C. testosteroni*) ve farklı yedi fitopatogenik bakteriyle reaksiyon gerçekleşmemiştir. Ayrıca, bu MAb, ticari bir enzime bağlı immünosorbent assay (ELISA) bazlı kit ve ticari bir immüno-kromatografik şerit testi ile saptanmayan bir *A. citrulli* strainini de saptanmıştır. Western blot analizinde, MAb 11E5 moleküler kütlesi >170 kDa olan bir *A. citrulli* proteini ile reaksiyona girmiştir. MAb 11E5, iki sandviç ELISA sistemini geliştirmek için kullanılmıştır: MAb yakalanmış-sandviç ELISA (MC-sELISA) ve poliklonal antikor yakalanmış-sandviç ELISA (PC-sELISA). MC-sELISA, cucurbit yaprak ve tohum ekstraktlarında *A. citrulli* 'nin tespiti için PC-sELISA'dan 10 kat daha duyarlı bulunmuştur. MC-sELISA'nın tespit limiti  $5 \times 10^4$  cfu/ml saptanmıştır (Himananto vd. 2011).

*A. citrulli*'nin tohumdaki lokalizasyonunun etkilerinin araştırıldığı çalışmada pistil ve perikarp aşılansız lotlardan alınan tohum numuneleri (n=20 veya 50 tohum/lot), testa, perisperm-endosperm (PE) tabakası ve embriyo dokularına ayrılarak *A. citrulli* için türe özgü PCR ile test edilmiştir. Testa örneklerinin % 8'inden azında, tohum aşılama yöntemine bakılmaksızın *A. citrulli* pozitif olarak elde edilmiştir. Ek olarak, iki tohum lotu arasında kontamine testa yüzdeleri arasındaki fark anlamlı (P=0.64) bulunmamıştır. Real-Time PCR testi ile tayin edilen *A. citrulli*-pozitif PE tabaka örneklerinin yüzdesi, perikarpla aşılansız lotlardan (% 80.3) tohumlara kıyasla, potile inoküle edilmiş lotlardan (% 97) elde edilen tohumlar için önemli ölçüde daha yüksek saptanmıştır. *A. citrulli*-pozitif embriyo örneklerinde ortalama yüzde ise, pistil aşılansız lotlardan (% 94), perikarp aşılansız partilerin ( $\approx$ % 8,8) (P=0.0001) tohumlarından elde edilen tohumlara göre önemli ölçüde daha yüksek saptanmıştır. PE tabakalarının ve testa'nın uzaklaştırılması, perikarp aşılansız lotlardan (% 14.8), pistil aşılansız lotlara (% 72) göre *A. citrulli*'nin tohumdan tohuma geçiş oranlarında önemli bir düşüşe neden olduğunu tespit etmişlerdir (Dutta vd. 2012b).

*A. avenae* subsp. *citrulli*'nin PCR ve matriks destekli lazer desorpsiyon iyonizasyon süresi-uçuş kütle spektrometresi (MALDI-TOF MS) kombinasyonu kullanılarak *A. avenae* subsp. *citrulli*'nin virulens strainlerini tanımlamak için bir yöntem geliştirilmiştir. PCR ürünlerinin tek iplikçikli DNA'sı, bir enzim ve alkali denatürasyonundan sonra MALDI-TOF MS ile analiz edilmiştir. Kütle spektrumları, nükleotid sekanslarındaki farklılıkların bir sonucu olarak strainler arasında farklılık gösterdiği saptanmıştır (Kajiwara vd. 2012).

*A. citrulli*'nin tespiti için çapraz primasyon amplifikasyonu (CPA) yöntemi geliştirilmiştir. Yöntemde saf bakteri kültürü için CPA testinin duyarlılığında  $3.7 \times 10^3$  cfu/ml kullanılmıştır. Doğal olarak enfekte olmuş karpuz tohumlarındaki bakteriler, CPA testi kullanılarak tespit edilmiştir (Zhang vd. 2012).

2010-2011 yıllarının Şubat ve Ağustos aylarında, Adana ve Mersin illerinde kavun tarlalarında ve ticari fidanlıklarda hastalık belirtileri tespit edilmiştir. 2010 ve 2011

yıllarında yaklaşık 75 ve 85 dönümlük üretim alanlarında yaprak ve meyvelerde lezyonlar gözlenmiştir. İzolatların patojenitesi, kavun fideleri ve meyveleri kullanılarak saptamıştır. Klasik, serolojik ve moleküler analizlere göre *A. citrulli* olarak tanımlanmıştır (Horuz vd. 2014).

*A. citrulli* kavun ve karpuzda bakteriyel meyve lekesi oluşumunun, Brezilya'daki bazı bölgelerle sınırlı olduğu, ancak daha çok kavun üreten bölgelerde önemli kayıplara neden olduğu saptanmıştır. Çalışmada Brezilya'daki kavun ve karpuzdaki izolatları, biyokimyasal, patojenite, serolojik ve moleküler analizler yoluyla karşılaştırılmıştır. 15 biyokimyasal test, izolatlar ve konukçular arasında çapraz aşılama, ELISA ve REP, ERIC, BOX primerleri ile tekrarlayan dizi analizi (repPCR) yapılmış ve beslenme karakterizasyonu ya da seroloji ile hiçbir fark olmadığını saptamışlardır. Ancak çapraz aşılama, bazı bölgelerde kavunlarda yüksek agresifliğe neden olan farklı patojenite grupları gözlemlenmiştir (Melo vd. 2014).

Karpuz tohumlarında *A. avenae subsp. citrulli*'nin tespiti için nested-PCR yöntemi geliştirilmiştir. Nested PCR oluşturmak için BOX kısa tekrarlanan dizisinden türetilen iki çift spesifik primer setini (BX-L1/BX-R5 ve BX-L1/BX-S-R2) seçilmiştir. Farklı strainlerde *A. avenae subsp. citrulli*, sırasıyla BX-L1/BX-R5 ve BX-L1/BX-S-R2 spesifik primer setleri ile çoğaltılmıştır. Bir hedef bant, *A. avenae subsp. citrulli* strainlerini amplifiye etmiş, fakat *A. avenae subsp. cattleyae*, *A.avenae subsp. konjaci* ve diğer bakterilerde amplifiye saptanmamıştır. Nested-PCR testi, en düşük saptama sınırı  $4.7 \times 10^1$  cfu/ml, doğrudan PCR'den 1000 kat daha yüksek duyarlılıkta olduğu belirlenmiştir. Enfekte tohumun taşıyıcı oranı % 0.1-% 0.5 iken, pozitif saptama oranı % 66.7; enfekte tohumun taşıyıcı oranı % 1-% 10 olduğunda, pozitif saptama oranı % 83-% 100 olarak saptanmıştır (Wang vd. 2014).

2013 yılında Kaliforniya'da bulunan 10 dönümlük kavun arazisinden küçük (5 ila 10 mm çapında), koyu kırmızimsı-kahverengi, sarı halelerle çevrili açılmal lezyonlar ve yaprak kenarlarından orta kısma kadar uzanan daha geniş V şekilli lezyonlara sahip yapraklı bitkiler toplanmıştır. Toplanan izolatlar için pozitif immunoassay testine ve türlere özgü primer setleri, BX-L1/BX-S-R2 (Bahar vd. 2008) ve ZUP2436/2437 (Woudt vd. 2009) kullanılarak patojen *A. citrulli* olarak tanımlanmıştır. 16S ribozomal RNA geninin 360 bp'lik bir fragmanı, WFB1 ve WFB2 primerleri (Walcott vd. 2000) ile klasik PCR yöntemi kullanılarak test edilmiştir. BLAST sorgusu ile *A. citrulli* (CP000512) straini AAC00-1'in ilgili bölgeleri ile % 100 benzerlik gösterdiği saptanmıştır. Real-Time PCR deneyleri (Bahar vd. 2008; Woudt vd. 2009) kullanılarak *A. citrulli* için pozitif olarak test edilmiştir. Bu çalışma Karpuz Bakteriyel Meyve Leke hastalığının Kaliforniya'da ilk resmi kaydı olmuştur (Kumagai vd. 2014).

*A. avenae subsp. citrulli* tespiti için YD-repeat protein genini hedef alan yeni bir SYBR Green-dayalı Real-Time PCR testi geliştirilmiştir. Primer setinin spesifitesi, patojenler ve patojen olmayanlar da dahil olmak üzere 6 ayrı *A. avenae subsp. citrulli*, 7 diğer *Acidovorax* türü ve patojenik olmayan 22 izolattan saflaştırılmış DNA kullanılarak değerlendirilmiştir. AC158F/R primer seti, *A. avenae subsp. citrulli* strainlerinden elde edilen genomik DNA'dan beklenen boyuttaki tek bir band elde edilmiş, fakat diğer bakteri cinslerinde ve diğer *Acidovorax* türlerinde amplifikasyon gerçekleşmemiştir. Bu yöntemde reaksiyon başına  $5 \times 10^5$  fg/µl saflaştırılmış genomik DNA kullanarak veya



kalibre edilmiş bir hücre süspansiyonu kullanılarak çoğaltılmış hedef DNA'nın en az bir genom eşdeğerini tespit etmek mümkün olmuştur ve reaksiyon başına 6.5 koloni oluşturan birim kullanılmıştır (Cho vd. 2015).

*A. citrulli*, tohum kaynaklı bir patojendir ve meyvede bakteriyel leke oluşumuna neden olan bir patojendir. EPPO tarafından A1 karantina patojeni olarak listelenmiştir. Tohum sertifikası, tohum partilerinde hassas ve spesifik bir patojen tespitinin mevcudiyetine dayanmaktadır: Bu, etkili bir hastalık yönetimi stratejisi için şarttır. Bu nedenle, etkili bir DNA ekstraksiyonu ve saflaştırma prosedürü, sağlam bir PCR analizi sağlamak için kritik bir konudur. Tohum partilerindeki patojen tespiti, *A. citrulli* tarafından bilinen farklı kirlilik seviyelerini test ederek uygulanmıştır. Başlangıçta iki farklı örnek hazırlama yöntemi test edilmiş bunlar gecelik ıslatma ve kuru tohumların ezilmesi, ardından üç farklı manuel DNA ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen her bir DNA alt örneği, patojeni saptama yeteneğini değerlendirmek için SEQID3/SEQID4 ve WFB1/WFB2 olmak üzere iki farklı primer seti ile analiz edilmiştir. Sonuçlar, tohumların ıslatılmasına dayanan bir DNA ekstraksiyonu ve saflaştırma prosedürünün, yıkama sıvıları üzerinde DNeasy Plant Mini kitinin (Qiagen) kullanılmasının ardından, patojenin saptama eşiğini arttırmaya yetecek kadar yüksek miktarda DNA verdiğini göstermiştir (Giovanardi vd. 2015).

*A. citrulli*'yi PFGE ile çok merkezli sekans sınıflaması (MLST) ile grup I ve grup II olarak iki gruba ayırmışlardır. İki grubun içinde daha hızlı ayırt edilen izolatlar, spesifik polimerik zincir reaksiyonu (PCR) için bir çift spesifik primer, AAC00-1'in pilL genine göre tasarlanmıştır. PCR sonuçlarında, grup II izolatlarında 52 izolatın 51'i için 332-bp'lik bir bandın oluştuğu gözlenmiştir. Ancak 93 gruba ait grup I izolatlarında sadece üçü pozitif olduğu saptanmıştır (Zhong vd. 2016).

*A. citrulli* için TaqMan probu temelli izotermal PCR (TiiPCR) testine dayanarak bir yöntem geliştirilmiştir. İlk olarak, spesifik primerler ve problemleri, *A. citrulli*'nin genomundan spesifik bir DNA fragmanına dayanarak tasarlanmıştır. Her reaksiyon tüpünde 10 bakteri hücresi ve 1.8'in üzerinde bir floresan sinyal yoğunluğu ile tespit edilmiştir (Wu vd. 2016).

Bakterilerin enfekte tohumlarını sağlıklı tohumlardan hızlı, doğru ve tahribatsız bir tespit aracı olarak ayırmak için Raman hiperspektral görüntüleme tekniğini kullanmışlardır. ANOVA kullanılarak bakteri *A. citrulli* tarafından enfekte edilen karpuz tohumlarının ayrıştırılması için en uygun bant oranını belirlemek üzere 400-1800  $\text{cm}^{-1}$  spektral aralığında Raman hiperspektral görüntüleme verileri kullanılmıştır. Bakteriyle enfekte tohumların saptanması için 1076.8  $\text{cm}^{-1}$  ve 437  $\text{cm}^{-1}$  iki bant en uygun Raman tepe noktası olarak seçilmiştir. Sonuçlar, Raman hiperspektral görüntüleme tekniğinin, bakteriyle enfekte olmuş karpuz tohumlarının saptanması için iyi bir potansiyele sahip olduğunu ve geleneksel yöntemlere uygun bir alternatif oluşturabileceğini ortaya konulmuştur (Lee vd. 2017).

*A. citrulli*'yi tespit etmek için marker olarak fluorescein izotiyosiyanat kullanılarak immunoassay bantı geliştirilmiştir. Bakteri inkübasyonu için örnek kültür ortamına florescein izotiyosiyanat (FITC) ilave edilmiş ve bakteriler ultraviyole ışığı altında bir sarı-yeşil floresan yaydığını ve bir floresan prob haline dönüştüğünü

belirlenmiştir. Bu immüno Floresan bant (IFS), floresan bakteriler ve nitroselüloz zarındaki test alanında immobilize edilmiş etiketsiz monoklonal antikor (McAb) arasındaki bağlanmaya dayanmaktadır. Şeridin saptama sınırını 10 dakika içinde gözlemlenebilen bir sonuçla  $10^6$  cfu/ml saptamışlardır. Tespit sonuçları, doğal alan numunelerindeki bitki veya bilinmeyen mikroorganizmalardaki safsızlıklardan etkilenmeyecek ve IFS'nin yüksek doğruluğa sahip olduğunu belirten PCR sonuçları ile tutarlı olduğu gözlenmiştir. IFS, geleneksel enzime bağlı immünosorbent assay (ELISA) ve PCR yöntemleriyle karşılaştırıldığında tespit süresini ve basitleştirilmiş operasyon prosedürlerini azalttığı saptanmıştır (Zeng vd. 2018).

Gelişen teknoloji ile Real-Time PCR farklı prob sistemleri de geliştirilmiş ve kullanılmaya başlanmıştır. Günümüzde kullanılan en gelişmiş en ileri prob sistemlerinden biri LNA (Locked Nucleic Acid) adı verilen sistemdir. Bu sistemde, prob üzerinde yer alan DNA analogu monomerlerde bulunan şeker halkaları metilen bir köprü ile bağlanmıştır. Bu sayede monomerlerin her biri spesifik bağlanma için en uygun konformasyon olan N konformasyonunda sabit kalabilmektedirler. Bu durum spesifik olmayan bağlanmalara izin vermemekte, problemlerin spesifik bölgelere olan bağlanma afinitelerini arttırmakta ve gerçekleşen spesifik bağlanmaların daha stabil olmasını sağlamaktadır. Bu tip problemlere ait diziler, diğer çalışmalarda kullanılan Real-Time PCR problemlerin dizilerinden uzunluk olarak daha kısadır. Bu sayede prob dizisinin kendi içinde bağlanması olasılığını ortadan kaldırmakta ve amplifikasyon işleminin daha kısa sürede gerçekleşmesine imkan sağlamaktadır. LNA kimyasal yapısı Real-Time PCR yönteminin daha spesifik olarak çalışmasını ve alınan sonuçların daha hızlı ve güvenilir olmasını sağlamaktadır (Anonim 2014). Real-Time PCR yönteminin fitopatogen bakteriyel, fungal ve viral etmenlerin tanısında kullanılabilirliğini belirterek yöntemin avantaj ve dezavantajlarını tartışmışlardır. Real-Time PCR yöntemini klasik PCR yöntemine göre  $10^7$  kat daha hassas olması, kontaminasyon olasılığının daha düşük olması, elektroforezis işlemine gerek duyulmaması, hızlı sonuç vermesi gibi avantajları vardır (Freeman vd. 1999; Raeymaekers 2000).

*Pseudomonas tomato (syringae) pv. tomato*'nun tespit ve tanısını için spesifik primerler ve prob geliştirmişlerdir. Geliştirilen primer ve prob setiyle direkt bakteriyel hücreden, tohumdan ve hastalıklı bitki dokularından Real-Time PCR ve Real-Time Bio PCR yöntemleriyle kısa sürede ve hassas bir şekilde patojenin tanısı ve tespiti ortaya çıkarılmıştır (Basım ve Basım 2007).

Asma'da ciddi kayıplara neden olan *Xylella fastidiosa* için EBXY1-EBXY2 primer çifti-prob geliştirilerek Real-Time PCR yöntemi ile patojenin tanısı ve tespiti gerçekleştirilmiştir (Basım ve Basım 2009).

*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* ve *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*'nın tanısı ve tespiti için *Cmm*'ye ait *pat-1* gen dizisi ve *Xav*'ye ait *hrp* gen dizisini kullanarak Real-Time PCR yöntemi geliştirilmiştir. Geliştirilen primer ve problemlerin spesifikliği farklı bitki patojeni bakteriler kullanılarak test edilmiştir (Çaplık ve Basım 2009).

*Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* ve *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* patojenlerinin patojenisiteden

sorumlu özel gen bölgelerinden dizayn edilen primeler ve LNA prob kullanılarak Real-Time PCR ile tespitleri ve tanıları yapılmıştır (Öztürk ve Basım 2011).

*Erwinia amylovora*'nın tespiti ve tanısını yapmak amacıyla Real-Time PCR yöntemini kullanmışlardır. Real-Time PCR yöntemiyle tanısı için, patojenik bakterinin polisakkarit üretiminden sorumlu ve kromozomal *ams* gen'inin 1,6 kb'lik internal diziliminden prob ve primerler dizayn etmişlerdir. Kantitatif Real-Time PCR ile hastalıklı ve sağlıklı yaprak, sürgün ve çiçeği içeren bitki materyallerinden tespiti yapılarak, hastalık etmeninin çiçeklenme döneminden üretim sezonunun sonuna kadar epifitik popülasyonlarının değişimlerinin tespit edilmesine olanak sağlamıştır (Bozan ve Basım 2011).

Taç Gali hastalık etmeni, *Rhizobium vitis*'in oktopin, nopalin ve vitopin katabolize eden strainlerinin her birine özel geliştirilen primer ve prob setleri ve Real-Time PCR yöntemi kullanılarak hem direkt bakteriyel hücreden, hem asma bitki öz suyundan, hem de asma ve domates tümör dokularından oktopin ve nopalin sırasıyla, 62 ve 78 baz çifti uzunluğunda DNA fragmentlerini çoğaltılabilen hızlı ve hassas bir düzeyde tanı ve tespitlerinin yapılabileceği yöntem geliştirilmiştir (Turgut ve Basım 2014)

*Dickeya chrysanthemi*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pseudomonas cichorii*, *P. corrugata*, *P. fluorescens*, *P. mediterranea* ve *P. viridiflava*'nın patojenisiteden sorumlu özel gen bölgelerinden dizayn edilen primeler ve LNA proplar kullanılarak öz nekrozuna neden olan farklı bakteriyel patojenlerin Real-Time PCR ile tespitleri ve tanıları yapılmıştır (Baki ve Basım 2014).

*Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* tanısını ve tespitini için Real-Time PCR yöntemini kullanılmış ve yöntemde *hrpW* gen bölgesinden 593 bp'lik internal diziliminden faydalanılarak primerler geliştirilmiştir. Geliştirilen P3F/P5R1 primerleri 147 bp, P3F/P6R primerleri 158 bp'lik bölgeyi çoğaltmıştır. Farklı *P. syringae* pv. *actinidiae* strainleri ve farklı türlere ait bakteriyel izolatları çalışmada test edilmiştir. Çalışmada Kantitatif Real-Time PCR yöntemi ile *P. syringae* pv. *actinidiae*'nin kivi bitkisindeki popülasyon oranlarının kantitatif olarak tespitini sağlamıştır (Gallelli vd. 2014).

Turunçgillerde stubborn hastalık etmeni *Spiroplasma citri*'nin tanısını ve tespiti için Real-Time PCR yöntemi geliştirilmiştir. Real-Time PCR yönteminde *Spiroplasma citri*'nin tanı ve tespiti için *prophage* gen bölgesine göre Php-orf1 ve Php-orf3 primerlerini geliştirilmiş ve floresan boya olarak SYBR-Green kullanılmıştır (Wang vd. 2015).

Bakteriyel fide ve meyve lekelerinin hastalık etmeni *A. citrulli*'nin canlı hücreleri, bakteriyel çözelti DNA bağlayıcı boya ile muamele edildikten sonra gerçek zamanlı floresan polimeraz zincir reaksiyonu amplifikasyonu ile ölü hücrelerden ayırt edilmiştir. Çalışmada son yıllarda, gerçek zamanlı PCR'da DNA-interkalasyon yapan boya propidium monoazidin (PMA) kullanılmıştır. Primerler ve TaqMan probu *A. citrulli* genomuna (Aave\_1909, Gene ID: 4669443) dayanmakta ve *A. citrulli* için spesifik olarak geliştirmişlerdir. Bu Real-Time PCR yönteminde tespit eşiği, enfekte olmuş karpuz

tohumlarında canlı ve ölü hücreleri içeren  $10^3$  cfu/ml birim hücre süspansiyonlar kullanılmıştır (Tian vd. 2016).

Zeytin Dal Kanseri hastalık etmeni *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'ye özel primer seti ve LNA kullanılarak Real-Time PCR yöntemi geliştirilmiştir. Real-Time PCR yöntemi için *Indoleacetate-lysine ligase (iaaL)* gen dizisi kullanılmış ve bu diziyeye göre primer seti ve prob geliştirilmiştir. Çalışmada, bakteriyel hücre hassasiyet sınırı 2 hücre ve DNA hasasiyet sınırı ise 11.8 pg olarak saptanmıştır. Epifitik populasyon içerisindeki sadece canlı *P. savastanoi* pv. *savastanoi*'lerin tespiti için geliştirilen Kantitatif Real-Time Membran Bio-PCR yöntemi ile bitkideki canlı bakterilerin popülasyonunun kantitatif olarak tespit edilebileceği ortaya konulmuştur (Aktaş ve Basım 2017).

Kasava Yanıklık Hastalık etmeni *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* Real-Time PCR yöntemi ile kısa sürede, hassas bir şekilde tanısını yapmak amacıyla primer ve prob (LNA) setleri geliştirilmiştir. Geliştirilen yöntemde bakteriyel hücre hassasiyet sınırı 1 hücre ve DNA düzeyindeki hassasiyet sınırı ise, 13 pg olarak saptanmıştır. Çalışma ile Real-Time PCR yöntemini kullanarak her birine özel primer ve prob setleri geliştirilen Kasava Bakteriyel Yanıklık Hastalığı etmeni *X. axonopodis* pv. *manihotis*'nin bakteriyel hücreden ve hastalıklı bitki dokularından 20-25 dakikada hızlı bir şekilde tanı ve tespitlerini gerçekleştirmiştir (Abdullahi ve Basım 2017; Abdullahi vd. 2018).

Karpuz Bakteriyel Meyve Lekesi dünya çapında ekonomik açıdan önem oluşturan ilk sıralarda yer alan bakteri hastalığıdır. Patojen tohumla bulaşır ve birçok bitkide bitkinin tüm aşamalarında etki etmekte ve sonuçta yıkıcı meyve çürümelerine yol açmaktadır. Birçok fitobakteriyel hastalık gibi, Karpuz Bakteriyel Meyve Leke hastalığı ile kimyasal mücadele seçenekler sınırlıdır ve temel olarak bakır bazlı bileşikler mevcuttur. Buna ek olarak, Karpuz Bakteriyel Meyve Lekesi dayanıklılığı ile ticari cucurbit çeşitlerinin mevcut olmaması hastalık yönetimini zorlaştırmaktadır. Karpuz Bakteriyel Meyve Leke hastalığının mücadelesinde, gerekmedikçe, tohumluk üretim alanlarının tohum tarla denetimi ve sertifikasyonu, tohum sağlığı testi, fide denetimi ve profilaktik bakır bazlı yönetim yoluyla izole edilen tohumların üretimi yoluyla primerinokulumu hariç tutmayı amaçlayan entegre bir yaklaşımı mevcuttur. *A. avenae* subsp. *citrulli*'ye karşı mücadelede, Karpuz Bakteriyel Meyve Leke salgınları dünya çapında periyodik olarak devam etmektedir. Daha etkin bir entegre hastalık yönetimi stratejisi geliştirmek için, meyve ve tohum üretim ortamlarında Karpuz Bakteriyel Meyve Lekesi epidemiyolojisi ve patojenisitesinin daha iyi anlaşılması gerekmektedir. Ayrıca, tohum enfeksiyonundaki çiçeklerin rolünün anlaşılması, entegre hastalık yönetimi için potansiyel yollar saptanmaktadır (Walcott 2008).

1997'den beri Tayvan'da tarlalarda, suyla ıslatılmış küçük lezyonlarla kavun meyveleri bulunmuştur. Tayvan'daki farklı bölgelerden gelen hastalıklı karpuzdan izole edilen 2 strain yanı sıra, hastalıklı kavunlardan izole edilen on iki bakteri türü, *A. avenae* subsp. *citrulli* olarak tanımlanmıştır. Bu patojen, hıyar, su kabağı, acı kabak, balmumu kabak, oryantal dekapaj kavun, kabak ve şişe kabak için virulent olduğu saptanmıştır. Bu patojene 21 ticari kavun ve karpuz çeşidi duyarlı bulunmuştur. Hastalıklı fidelerden elde edilen tohumlara uygulanan, streptomisin+tetrasiklin % 10 WP, kasugamisin+bakır

oksiklorür % 81.3 WP veya % 1 hidroklorik asit muamelesinden sonra önemli ölçüde patojen etkisinin azaldığı saptanmıştır (Cheng vd. 2000).

*Agrobacterium tumefaciens*'in etkili bir AHL (N-asil-homoserin lakton) biyoassay straini JZA1, *A. avenae* subsp. *citrulli*'den AHL üretimini tespit etmek için kullanılmıştır. *A. avenae* subsp. *citrulli* bir 3-O-C8-homoserin (HSL) tipi sinyal molekülü üretmiştir. AHL moleküllerini bozabilen *aiiA* geni, NJF10 straini *A. avenae* subsp. *citrulli* straini NJF10-*aiiA*'a dönüştürülmüştür. NJF10-*aiiA*'dan gelen AHL üretimi, virulent tip NJF10 ile karşılaştırıldığında önemli ölçüde azaltılmıştır. Aşılama testleri, NJF10-*aiiA*'nın karpuz meyvelerinde belirgin bir virülans azalmasına sahip olduğunu göstermiştir. Çalışmada *A. avenae* subsp. *citrulli* tarafından yapılan AHL üretiminin patojenite ile ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır (Tao vd. 2009).

Gram-negatif bitki patojenik bakterilerde hipersensitif yanıt ve patojenite (*hrp*) genleri bulunur ve bakterilerin patojenitesinden sorumludur. Konukçu olmayan ve dayanıklı bitkiler üzerinde aşırı duyarlılık tepkisi (HR) oluşturabilirler. *hpaA*, *hrcT*, *hrcC* ve *hrpG* genleri, *A. avenae* subsp. *citrulli*'nin *hrp* geni kümesinden klonlanmıştır. Xj112 straininin mutantları, tek bir çaprazlama olayı ile başarıyla oluşturulmuştur. Elektron mikroskobu incelemesi ile, *hpaA* ve *hrpG* mutantlarının hücrelerinde flagella eksik olduğu ve hücre morfolojisinde belirgin bir şekilde değiştiğini, *hrcT* ve *hrcC* mutantlarının flagella ve hücre morfolojisinin değişmediği saptanmıştır. Ayrıca, *hpaA*, *hrcT* ve *hrcC* mutantları, tütünde HR ile indüklenen kapasiteyi ve *hrpG* mutanti önemli ölçüde kavun (*Hami cantaloupe*) yapraklarındaki patojenliği kaybetmiştir. Ayrıca, büyüme analizi sonuçları, *hpaA*, *hrcT*, *hrcC* ve *hrpG* mutantlarının kolonizasyonunun, sırasıyla, önemli ölçüde azaldığını göstermiştir. Genel olarak, bu sonuçlar, tip III salgılama sisteminin temel bir bileşeni olarak kavun bakteriyel meyve lekesinin *hrp* genlerinin, konakçı bitkiler üzerindeki patojenliği ve konakçı olmayan ve dirençli bitkilerde hastalık direncini etkilediğini göstermiştir (Wang vd. 2011).

*A. avenae* subsp. *citrulli*'nin alternatif konukçularıyla ilgili yapılan çalışmada, hastalık etmeni çeşitli türlerin/çeşitlerin, kabakgiller, soya fasulyesi, otsu bitkiler, baklagiller dahil olmak üzere ilk gerçek yaprak aşamasında bitkilerde belirlenmiştir. Çalışmada, sırasıyla, kavun ve karpuzdan izole edilen *Aac* 1.49 ve *Aac* 12.13 strainleri içeren bakteriyel süspansiyonlar yapraklara püskürterek inoküle edilmiştir. Bitkilerin duyarlılığı, inkübasyon süresi (PI) ve hastalık insidansı (INC) esas alınarak değerlendirilmiştir. Börülce, fasulye, tütün ve mısırdaki belirtisi gözlenmemiştir. Su kabağı (6.83 d) hariç en düşük PI'lar kabakgillerde (3.0 d) gözlenmiştir. Başka bir deneyde, kabak, patlıcan, papaya, karpuz, kavun, hıyar, biber ve domates meyvelerinde *Aac* 1.49 ve *Aac* 12.13 strainlerine karşı duyarlılık açısından analiz edilmiştir. Meyveye hastalık etmeni sub-epidermal enjeksiyon ile aşılanmıştır. PI ve INC'nin yanında dışsal lezyon çapı (DLE) ve lezyon derinliği (PL) ölçülerek hastalık şiddeti değerlendirilmiştir. Papaya, karpuz, kavun ve dolmalık biber meyvelerinde en düşük PI'lar (2.0 d) tespit edilmiştir. Kabak (% 93.75) ve bal kabağı (% 34.37) hariç tüm aşılanmış meyvelerde yüzde yüz insidans gözlenmiştir. En yüksek DLE'ler, *Aac* 1.49 straini için hıyar (1.47 cm) ve *Aac* 12.13 için karpuz (1.60 cm) ve kavun (1.70 cm) ile görülmüştür. En yüksek PL'ler karpuzda (*Aac* 1.49 ve *Aac* 12.13 strainleri için sırasıyla 1.72 ve 0.75 cm) görülmüştür. Patlıcan meyvelerinde dış simptom gözlenmemiş ancak iç kısımda derin lezyonlar gözlenmiştir (Nascimento vd. 2004). Bu çalışmalar ile *A.*

*citrulli*'nin alternatif konukçu olan ağaç kavunu tohumlarında en az 7 yıl boyunca hayatta kalabildiği ortaya konulmuştur (Dutta vd. 2014).

Meksika da ithal karpuz tohumlarındaki *A. avenae* subsp. *citrulli*'nin ülkeye ilk giriş ve ortaya çıkışının riskini analiz etmek için yapılan çalışmada NAPPFAST sistemi kullanılmıştır. Çalışma Meksika'da karpuz yetiştirme alanlarında bakterinin *A. avenae* subsp. *citrulli*'nin bulunma potansiyelini belirlemek için bir coğrafi analizde dahil olmak üzere bu patojeni değerlendirmek üzere modifiye edilmiş 5.02APHIS-PPQ risk analiz sürecine dayanmaktadır. Sonuçlar, toplam *A. avenae* subsp. *citrulli*'nin riskinin Meksika'da yüksek olduğunu ve kategorize edilen risk unsurları üzerinde 12 puanlık bir değer elde edildiğini göstermektedir. Yucatan, Quintana Roo, Campeche, Tabasco ve Güney Veracruz eyaletlerinde yetişen karpuz yetiştirme alanları, yüksek risk altında olduğu ve bunun nedeninin iklim koşulları, ekinlere duyarlı olduğu Mayıs ve Haziran aylarında bakterinin enfeksiyonunun yoğun olmasıyla desteklenmektedir. Sinaloa, Durango, Zacatecas, Meksika, Hidalgo, Queretaro, Michoacan, Guanajuato, Tlaxcala ve Puebla eyaletlerindeki karpuz üreten bölgelerde risk düşüktür. Bu riski en aza indirmek için tohumun peroksiasetik asit ile muamele edilmesi yaygın olarak tavsiye edilmektedir (Elizalde vd. 2011).

Birçok gram-negatif bitki-patojenik bakteri, protein efektörlerini, özel tip III sekresyon (T3S) sistemi yoluyla konakçı hücreye doğrudan salgılar (Alfano ve Collmer 2004; Bogdanove vd. 1996; Mansfield 2009) ve tip II sekresyon (T2S) sistemi ise bakteriyel sitoplazmadan hücre dışı çevreye birçok patogenezele ilişkili proteinin translokasyonundan sorumludur (Douzi vd. 2012). *A. citrulli* grup II straini AAC00-1'in genom dizisi ile bir Hrp-T3S sisteminin varlığı ortaya konulmuştur. Dizi analizi ve küme organizasyonu temelinde, *A. citrulli* *hrp* kümesi sınıf II'ye aittir. Hem grup I hem de II strainleri *hrp* mutantlarının jenerasyonu ve karakterizasyonu, *A. citrulli*'de, hem konukçuları üzerindeki patojenite hem de non-konukçu tütün ve domates üzerinde HR-indükleme yeteneği için fonksiyonel bir Hrp-T3S sisteminin gerekli olduğunu ortaya çıkarmıştır (Bahar ve Burdman, 2010; Johnson vd. 2011). *A. citrulli* AAC00-1, iki takım T2S gen kümesine sahiptir. Bir küme, *gsp1*, *gspA*, *S*, *B* ve *N*'den yoksundur, ikinci kümelenme, *gsp2*, *gspA*, *B*, *S* ve *F*'den yoksundur. *A. citrulli* AAC00-1'de *gspG*'nin (majör pseudopilin) her iki kopyasının silinmesi, kayıpla sonuçlanmıştır. *A. citrulli*'nin karpuz çekirdeği kolonizasyonu ve hastalığın fide aktarma deneylerinde, AAC00-1'in *gspG1/G2* delesyonu (T2S) mutanı, ekimden sonra 96 saatte tohum kolonizasyonunda önemli bir azalma ve tohumdan fide Karpuz Bakteriyel Meyve Leke hastalığının iletiminde önemli bir azalma gösterdiğini saptamışlardır (Johnson 2010). Tip IV pili (T4P) geniş bir bakteri yelpazesinin yüzeyinde bulunan uzantılardır. Bunlar, kamçıdan farklı olan, özgül dalgalanma özelliğinden bağımsız bir yüzey motilitesi için etkili bir araç teşkil eden ve yapışkanlık, kolonizasyon, biyofilm oluşumu, genetik materyal alımı ve virülans dahil olmak üzere birçok başka bakteriyel aktivitede yer alan yapılarıdır (Craig vd. 2004; Nudleman ve Kaiser, 2004). Yakın zamanda, virülans taramaları ile kombine edilen rastlantısal bir mutagenез yaklaşımı, T4P'nin, kavun fideleri üzerinde *A. citrulli* grubunun M6 strainin virülansına önemli ölçüde katkıda bulunduğunu ortaya çıkarmıştır. T4P düzeneği için gerekli olan bir proteini kodlayan *pilM*'de bozulmuş bir transpozon M6 mutantının, tohum transmisyonu ve kök inokülasyon deneylerini takiben tutunma motilitesi, biyofilm oluşumu ve virülanslığın bozulduğu gözlenmiştir (Bahar vd. 2009a; Bahar vd. 2010).

Karpuz Bakteriyel Meyve Leke hastalığına karşı direnç için bakterinin iki farklı bitki giriş yöntemi kullanılarak 22 farklı karpuz çeşidi taranmıştır. Çeşitler arasında hastalık şiddeti açısından önemli farklılıklar gözlenmiş, ancak hiçbir çeşit bakteri için dayanıklı olmadığı saptanmıştır. Saha testlerinde, 18 ticari tarladan oluşan meyveye tek tek inoküle edilmiş ve ayrıca hastalık yapraklarda doğal olarak enfekte olmuştur. Nispeten dayanıklı meyvelere sahip olan çeşitler arasında “Şeker Bebek”, “Jubilation”, “Mirage”, “Calsweet”, “Crimson Sweet”, “Royal Sweet” ve “Sangria” bulunmaktadır. Daha duyarlı kültivarların genellikle açık renkli bir kabuğu olduğu gözlenmiştir (Hopkins vd. 1993).

*A. avenae* subsp. *citrulli*'ye karşı dayanıklılıkta 1,344 *Citrullus* spp. ve *Praecitrullus fistulosus* çeşitleri kullanılmıştır. Çalışmada her bitki çeşidinden 16 tekerrür kullanılmış ve PI 532811 (Çin), PI482279 (Zimbabve), ve PI 385964 (Kenya) elde edilen çeşitler hastalık etmenine karşı daha dayanıklı olduğu tespit edilmiştir (Hopkins ve Thompson 2002b).

*A. avenae* subsp. *citrulli* olarak belirlenen on altı test straini, bakterilerin 16S rDNA genine göre evrensel primerler kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu ile amplifiye etmişler ve bunların amplifiye edilmiş fragmanlarının nükleotid sekanslarını elde etmişlerdir. Bu diziler ile GenBank'taki ilgili bakteri strainlerinin 16S rDNA dizisi arasındaki homolojini incelenmiş ve 16S rDNA sekanslarına dayanan bir filogenetik ağaç oluşturularak ve 6-9 strainlerinin 16S rDNA sekansları ve *A. avenae* subsp. *citrulli*'nin standart strainleri arasında üç nükleotit farkı bulunduğunu, homolojinin ise % 99.8'den fazla olduğunu saptanmıştır. Ağaçta strainler aynı filogenetik dalda kümelendiği belirlenmiştir (Zhang vd. 2007).

*A. avenae* subsp. *citrulli* nedensel ajan için tespit yöntemleri, tohumlar membran filtrasyonu ve ilmek aracılı izotermal amplifikasyon (LAMP) kullanarak yeni yöntem geliştirilmiştir. Bir LAMP primer seti, *A. avenae* subsp. *citrulli* 'deki *hrpG-hrpX* gen ara parçasının spesifik amplifikasyonu için dizayn edilmiştir. Bu çalışmada *A. avenae* subsp. *citrulli*'nin tespit duyarlılığı için 1000 adet her iki karpuz, balmumu kabağı ve kavun tohumuna 100 ml suda yaklaşık 10E3 cfu yapay olarak bulaştırılmıştır. Doğal olarak enfekte olmuş kavun ve karpuz tohumlarından da *A. avenae* subsp. *citrulli*'yi tespit edilmiştir (Oya vd. 2008).

Zimbabve ve Zambiya'dan elde edilen karpuz geçişlerinden oluşan beş popülasyonun BFB'ye yüksek düzeyde direnç gösterdiklerini bildirmiştir (Hopkins ve Thompson 2002b). Crimson Sweet özellikteki karpuz çeşidi ile yapılan ıslah çalışmasında PI 482279 ve PI 494817 çeşitlerinde *A. avenae* subsp. *citrulli* karşı dayanıklılık belirtileri gözlenmiştir (Hopkins ve Levi 2008). Daha yakın zamanlarda Wechter vd. (2011) yaptığı çalışmada toplanan bitkilerden 332 *Cucumis* sp. ve dört *C. melo* ve bir *C. ficifolius* bitkisinin yüksek düzeyde *A. citrulli*'ye direnç gösterdiğini bildirmişlerdir. Bahar vd. (2009b) yabancı kavunlarda *A. citrulli*'ye toleranslı olduklarını bildirmiştir.

MH21 olarak isimlendirdikleri izolatu, hastalıklı kavun meyvesinden izole etmişler ve *A. avenae* subsp. *citrulli* olarak tanımlanmıştır. Çalışmada, MH21 izolatu, kavun fidesi üzerinde patojenliği kusurlu olan mutantları seçmek için transpozon Mini-Tn5

kullanılarak mutasyona uğratılmıştır. Southern blot analizi, transpozon TnS'nin, MH21 izolatı kromozomundaki rastgele ve tek kopya eklemeleri oluşturduğunu ortaya çıkarmıştır. Bir mutant M543, kavun fidesi üzerinde patojenitesini kaybettiği ve Tn5 tarafından bozulan genin, iyi belgelenmiş bazı bakteriyel patojenlerde Tip III sekresyon sisteminin (TTSS) korunmuş bir iç zar proteinini kodlayan *hrcR* geninin homologue olduğu belirlenmiştir. Saksı deneyleri, M543'ün patojenikliğini, plazmidin geniş tipli *hrcR* geni ile tamamlanabileceğini ortaya çıkarmıştır. Ayrıca, *hrcR* genindeki mutant M543, tütün yaprağı üzerinde aşırı duyarlı reaksiyonunu tetikleme yeteneğini de yitirdiğini saptamışlardır (Zhengguang vd. 2009).

Kuzey Çin'deki hamı kavunda (*Cucumis melo* var. *saccharinus*) ciddi epidemi yapan Karpuz Bakteriyel Meyve Leke hastalığı için biyo-kontrol ajanları kullanılmak için bitki epifitik mayaları elde ederek bir çalışma yapılmıştır. Sonuçlar, Çin'de üç farklı yerden toplanan bitkilerin yapraklarından veya çiçeklerinden izole edilen 463 maya straininden 24'ünün agar üzerinde antibiyotik ve 732-1 strainini içeren sekiz antagonistik maya strainininin 18 mm çapından daha büyük inhibisyon bölgeleri oluşturduğunu göstermiştir. Xinjiang'da yetişen karpuzdan izole edilen 0732-1 straininin sprej uygulaması, *A. avenae* subsp. *citrulli*'nin hamı kavunun yaprakları üzerindeki hastalıklarının görülme sıklığını ve şiddetini azaltmada etkili olmuştur. Hamı kavun tohumlarının, 0732-1 maya strainlerinin hücresiz kültürel süzüntüleri ile muamelesi, tohumlu *A. avenae* subsp. *citrulli*'nin neden olduğu fide yanıklığının şiddetinde önemli bir azalmaya neden olduğunu ve streptomycine sülfat (% 0.1 w/v) ve hidroklorik asit (% 2 v/v) içeren kimyasal tohum muamelelerinin etkinliğinin önemli ölçüde farklı olmadığını ( $P > 0.05$ ) saptamışlardır. Morfolojik ve fizyolojik özelliklerine ve ribozomal DNA'nın iç transkripsiyonlu ara parçasının DNA sekansının analizine dayanarak, maya straini 0732-1 *Pichia anomala* Kurtzman olarak tanımlanmıştır. Bu çalışma, maya straini 0732-1'in, *A. avenae* subsp. *citrulli*'nin neden olduğu hamı kavun bakteriyel meyve lekesinin biyo-kontrolü potansiyeli olan bir madde olduğunu göstermiştir (Wang vd. 2009).

*A. avenae* subsp. *citrulli*'nin *Citrullus* spp.'de az sayıda bitki girişinde (PIs) sınırlı direnç bulunmasına rağmen, *Cucumis* spp.'nin germplazm hatlarında yüksek direnç seviyeleri rapor edilmemiştir. Bu çalışmada 332 *Cucumis* spp. PI'ler, yeni geliştirilen bir tohum vakum-infüzyon testi kullanılarak *A. avenae* subsp. *citrulli*'ye karşı direnç açısından taranmıştır. PI'nin *A. avenae* subsp. *citrulli*'ye iletilmesinde önemli farklılıklar gözlenmiştir. Çizgilerin çoğunun hastalığa aşırı derecede duyarlı olduğunu ve bununla birlikte, daha düşük direnç düzeylerine sahip birkaç PI de tanımlanmıştır. Test edilen 332 PI'dan 16'sı standart bir sprej inokülasyon testi kullanılarak ek değerlendirme için seçmişlerdir. Hepsisi *C. melo*'ya ait PI 353814, PI 381171, PI 536573, PI 614401 ve PI 504558 (*C. ficifolius*)'un iki bağımsız sprej inokülasyon testinde duyarlı kontrol kültürlerinden veya diğer PI'lerden önemli ölçüde daha fazla direnç seviyesine sahip olduğu saptanmıştır. Bu PI'lerden geliştirilen germplazm hatları, *Cucumis* yetiştirme programlarında *A. avenae* subsp. *citrulli*'ye karşı direnç kaynağı olarak yararlı olabileceğini belirtilmiştir (Wechter vd. 2011).

Etkili mücadele yöntemi olmaması sebebiyle, *A. citrulli* için biyolojik kontrol tohumu tedavisi olarak patojenik olmayan *A. citrulli* etkinliğinin araştırıldığı çalışmada AAC00 1Δ*hrcR* tipinde bir tip III salgılama sistemi mutantı olan *A. citrulli* üretilmiştir.



Bu mutant, karpuz üzerinde patojenik olmayan ancak çimlenen karpuz tohumunu kolonize etme yeteneğini koruduğu saptanmıştır. Doğal olarak, *A. citrulli* ile enfekte edilen karpuz tohumu ile AAC00-1ΔhrcC ile muamele edilmiş kontrol tohumuna göre % 81.8 oranında hastalığın fide aktarımını azaltmıştır (Johnson vd. 2011).

*A. avenae* subsp. *citrulli*'ye karşı mücadelede G-14 *Paenibacillus polymyxa* izolatu kullanılmıştır. 28 °C'de pH 7'de gelişmeye bırakılmıştır. Besi ortamında *A. avenae* subsp. *citrulli*'yi inhibe ettiği gözlenmiştir (Shi vd. 2012).

*A. citrulli*'nin neden olduğu Karpuz Bakteriyel Meyve Lekesi, Brezilya'daki karpuz bitkisi için ciddi bir tehdittir. Meyve lekelerinin yönetiminde potansiyel kullanım ile genotiplerin seçilmesi, çiçeklenme ve meyvecilik sırasında bitkilerin yanı sıra çiçeklenme öncesi (29 genotip) Brezilya Kuzeydoğu, fide ve bitkileri için Cucurbits Germplasm Active Bank'a ait karpuz genotiplerinin direnç düzeyi (yedi genotip) araştırılmıştır. Genotipler, tanımlayıcı ölçeklerin yardımıyla tahmin edilen hastalığın insidansı veya şiddeti açısından değerlendirilmiştir. Ek olarak, semptomatik ve asimptomatik meyvelerden elde edilen tohumlarda *A. citrulli*'nin aktarımı belirlenmiştir. Karpuz genotipi, meyve lekesine karşı immün olmadığı gözlenmiş ve çoğunluk direnç tepkilerinde farklılıklar göstermiştir. Bununla birlikte, BGCIA 979, BGCIA 34 ve Sugar Baby genotipleri bitki gelişiminin en üst safhalarında yüksek düzeyde direnç göstermişlerdir, bu da bu genotiplerin üreme programlarında kullanılabilir meyve lekesi direnç genlerine sahip olduğunu göstermektedir. Test edilen yedi genotipin semptomatik ve asimptomatik meyvelerinden elde edilen tohumlar, *A. citrulli*'nin sırasıyla % 35.3 ve % 8.7 oranlarında bulaşma oranlarını göstermiştir. Bu sonuçlar, asimptomatik meyvelerin, bakterilerin bulaşmasından sorumlu olan kontamine tohumlar taşıyabildiğini doğrulamaktadır (Carvalho vd. 2013).

Antibakteriyel etkiye sahip kitosan karpuz fidelerinde *A. citrulli*'ye karşı kullanılmıştır. Sonuçlar, üç tip kitosanın, özellikle de 0.40 mg/ml'de kitosan A'nın, *A. citrulli*'nin büyümesini önemli ölçüde engellediğini göstermiştir. Kitosan A'nın antibakteriyel aktivitesi kitosan konsantrasyonu ve inkübasyon süresinden etkilenmiştir. Kitosanın direkt antibakteriyel aktivitesi, transmisyon elektron mikroskopik gözlemiyle kanıtlanan membran lizisine etkisiyle gerçekleşmiştir. Toprakta ekilen karpuz fidelerinin hastalık indeksi ve perlit içinde ekilen fidelerin ölüm oranı, patojen kontrolüne kıyasla 0.40 mg/ml'de kitosan A ile önemli ölçüde azalmıştır. Toprağa ekilen karpuz fidelerinin taze ve kuru ağırlığı kitosan tohumu muamelesi ile artırılmıştır. Laboratuvar uygulamalarında bakteriyel kültürde kitosan konsantrasyon miktarı olarak 0.40 mg/ml önemli derecede etkili olduğu saptanmıştır (Li vd. 2013).

*A. citrulli*'ye dayanıklı çeşit saha deneyi, 1699 çeşit kullanılmış, 3 yıl ve tek bitki parsellerinin 2 replikasyonu ile tesadüfî tam bir blok olarak yapılmıştır. Hastalık derecesi, hastalık alan boyunca homojen olarak dağıldığı zaman 0-9 arasında olan (0=simptom yok, 1-2= iz, 3-4= hafif, 5-6= orta, 7-8= şiddetli ve 9= ölü) skala ile değerlendirilmiştir. Her yıl birkaç kez değerlendirme yapılmıştır. Haftalık değerlendirmelerde yapılan istatistiksel analizler, girişimler arasında hastalık şiddetinde anlamlı farklılıkların olduğunu göstermiştir (P= 0.05). Dirençlilik, 4.5'den küçük oran ve replikasyonlar üzerinde düşük standart sapma ve çoklu çoğaltma ( $\geq 4$ ) temel alınarak belirlenmiştir. Seçilen 23 dayanıklı çeşit, Zimbabve, Zambiya, Güney Afrika ve

Nijerya'dan temin edilmiş ve *C. lanatus* ya da *C. lanatus* var. *citroides* bitkilerinde gerçekleşmiştir (Ma 2014).

Çalışmada, kavunda *A. citrulli*'nin sekonder yayılımını etkileyen bitki parçaları ve kültür uygulamaları (sulama yöntemleri ve bakterisit spreyle) incelenmiştir. Yağmurlama sulama, enfekte fidelerden patojeni komşu sağlıklı fidelerin% 95'ine yaydığı ve bunların % 80'i yüksek hastalık şiddeti gösterdiği belirlenmiştir. Tersine, dalma sulama kullanıldığında, enfekte olanların komşu bitkileri hastalık belirtileri göstermemiştir. Kotiledon ortaya çıktıktan sonra Kocide ile yaprak tedavisi, hastalık insidansını % 40'a düşürdüğü, bitkilerin% 37'sinde hastalık şiddeti azaldığı gözlenmiştir. Fidelerin farklı bölgelerinde değerlendirilmesi, kotiledonların bitkinin en kolonize kısmı olduğunu ortaya çıkarmıştır. GFP-etiketli *A. citrulli* strainini ile enfekte fideler floresan ve konfokal lazer-tarama mikroskopu görüntüleri patojenin, kotiledonlar yüzeyinde bol agregatlar oluşturduğunu, yaygın olarak parenkima dokularında hücre arası boşluklarında kolonize ve vasküler sistemi boyunca hareket ettiği tespit edilmiştir. Bu çalışmanın sonuçları, kotiledon evresinde bakterisidal bir spreyle kombine olarak damlama sulama ile kavun fidelerinde *A. citrulli*'nin sekonder yayılmasının önlenmesinin Karpuz Bakteriyel Meyve Lekesinin kontrolü için etkili bir araç sağlayabileceğini göstermektedir (Chalupowicz vd. 2015).

Biyofilm oluşumu, çok sayıda bitki patojenik bakterilerinin virülensi için önemlidir. Gerçekten de, bazı virülens genlerinin, Karpuz Bakteriyel Meyve Lekesi patojeni *A. citrulli*'de biyofilm oluşumuna dahil olduğu bulunmuştur. Ancak, *A. citrulli*'nin bazı virulent strainleri, biyofilm oluşumu ve virülens arasındaki karmaşıklığı gösteren biyofilmi biçimlendirememiştir. Bu çalışmada, virülensle ilişkili genlerin Tn5 eklenmesi; patojenite testi ve yüksek verimli termal asimetrik interlaced PCR (hiTAIL-PCR) kullanılarak *A. citrulli*'nin biyofilm-kusurlu straininden tanımlanmıştır. Çalışmada, elde edilen 301 mutantlarından 22'sinin, yabancı tiplerle karşılaştırıldığında, A1 straininin virülensini önemli ölçüde azalttığını göstermiştir. Dahası, dizi analizi, elde edilen 22 mutantın, *Aave 4244* (katyon difüzyon kolaylaştırıcı soy taşıyıcı), *Aave 4286* (varsayımsal protein), *Aave 4189* (alfa/beta hidrolaz katlama), *Aave 1911* (IMP dehidrogenaz/GMP redüktaz bölgesi), *Aave 4383* (bakteriyel ihracat proteinleri, aile 1), *Aave 4256* (Hsp70 proteini), *Aave 0003* (histidin kinaz, DNA giraz B ve *HSP90* benzeri *ATPaz*) ve *Aave 2428* (piridoksal-fosfat bağımlı enzim) dahil olmak üzere sekiz gene *Tn5* eklenmesinden kaynaklandığını göstermiştir. Ayrıca, mutant *Aave 2428*'in büyümesi etkilenmemiştir ve hatta inkübasyon sıcaklığı, NaCl konsantrasyonu ve LB broth'un pH değerindeki değişim ile artmıştır ve bu genin bakteriyel virülense doğrudan dahil olabileceği ortaya çıkarılmıştır (Luo vd. 2015).

*A. citrulli*'ye karşı yapılan bir çalışmada kullanılan antibakteriyel aktivite için nanomateryaller (Ni nanopartiküller, Ni-grafitler ve grafitler) Radyo Frekansı (RF) - termal plazma ile hazırlanmıştır. Nanomalzemelerin antibakteriyel etkisini doğrulamak için onbeş strainde *A. citrulli* kullanılmıştır. Antibakteriyel aktivite testlerinin sonucu, Ni nanopartiküllerin, tüm on beş *A. citrulli* strainde % 100 inhibisyon oranı ile en etkili antibakteriyel ajan olduğu saptanmıştır. Ni-grafitin inhibisyon oranı grafit ile karşılaştırıldığında, Ni-grafitin *A. citrulli*'yi inhibe etmede daha etkili olduğu saptanmıştır (Park vd. 2015).

*A. avenae subsp. citrulli* iki yüz straini, Karpuz Bakteriyel Meyve Leke hastalığını etkin bir şekilde kontrol edebilen bazı antagonistik bakterileri taramak için kullanılmıştır. Antagonistik aktivite deneyleri, sera testleri ve saha denemeleri sonuçlarına dayanarak, 5 test straini hastalığı kontrol etmek için yüksek etkinlik göstermiş. 5 bakteri straininden biri, 54 isimli olan strain hastalığı kontrol etmek için en yüksek potansiyele sahip olan strain olarak belirlenmiştir. 54'ün biyo-kontrol etkinliği % 60'a kadar olmuştur. Straini karakterize etmek için, morfoloji analizi, fizyolojik biyokimyasal test ve biyomoleküler deney de dahil olmak üzere bakteriyi değerlendirmek için bir dizi yöntem kullanılmıştır. Strain 54'ün *Bacillus amyloliquefaciens* türüne ait olduğunu belirlenmiştir. Kolonizasyon testi sonuçları, 54'ün en yüksek kolonizasyon seviyelerine sahip olduğunu ve yaprakların üzerindeki strainin yoğunluğunun, yaprak başına  $10^5$  koloni oluşturan birim (cfu) olduğunu göstermiştir. *B. amyloliquefaciens* 54'ün, mevcut N, P, K ve yaprak klorofilinin içeriğinin yükseltilmesi nedeniyle bitki büyümesini destekleyebileceğini çalışma sonuçlarında saptanmıştır. Antagonistik bakteri 54, savunma ile ilişkili gen PR1'in ekspresyon seviyesini ve bitkideki hidrojen peroksidin birikmesini arttırarak Karpuz Bakteriyel Meyve Leke hastalığını önemli ölçüde kontrol edilebildiğini saptamışlardır. Bu aynı zamanda Karpuz Bakteriyel Meyve Lekesi hastalığını kontrol edebilen *B. amyloliquefaciens* straininin ilk raporu olmuştur (Jiang vd. 2015).

*A. avenae subsp. citrulli*'nin karpuzdaki etkinliğini kontrol etmek için yapılan çalışmada ticari antibakteriyel pestisitleri kullanmışlar ve uygulamada tohum ve fide aşamasında dört adet antibakteriyel pestisitinin etkinliğini araştırılmıştır. Çalışma da; tohumda % 90'ın üzerinde kontrol etkinliği gösteren oxytetracyclin WP, % 90'ın üzerinde kontrol verimi ve akvaryumda sıcak su arıtma yönteminde görülen asibenzolar-S-metil+mancozeb WP'nin tohumdaki enfeksiyon oranını azaltması mümkün olabileceği saptanmıştır (Back vd. 2016).

### 3. MATERYAL ve METOT

#### 3.1. Çalışmada Kullanılan Bakteriye Strainler

Bu çalışma kapsamında Akdeniz Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Fitopatoloji Anabilim Dalı, Bakteriyoloji Laboratuvarı'nda Prof. Dr. Hüseyin BASIM tarafından oluşturulmuş -86 °C'de vidalı 2 ml'lik steril tüpler içerisinde saklanan kültür stoklarındaki yerli ve yabancı *Acidovorax citrulli* strainleri ve farklı cins ve türlere ait bitki patojeni bakteriler kullanılmıştır (Çizelge 3.1, Çizelge 3.2).

**Çizelge 3.1.** Real-Time PCR'da test edilen yerli-yabancı *Acidovorax citrulli* strainleri

İzolot No	Konukçu	Tarih	Orijini	Yerli/Yabancı
FC247	Karpuz	1978	ABD	Yabancı
FC376	Karpuz	1989	ABD	Yabancı
FC383	Karpuz	2000	Gürcistan	Yabancı
FC 454	Karpuz		Çin	Yabancı
FC 456	Karpuz		Çin	Yabancı
FC 458	Karpuz		Çin	Yabancı
FC 463	Karpuz		Çin	Yabancı
FC440-FC471	Karpuz	2000	Çin	Yabancı
FC513	Karpuz	2001	Tayland	Yabancı
FC515	Karpuz	1990	Gürcistan	Yabancı
FC517	Karpuz	1994	Gürcistan	Yabancı
M1	Kavun	2005	İsrail	Yabancı
M6	Kavun	2005	İsrail	Yabancı
8408	Karpuz		Türkiye	Yerli
Yeşim Aysan	Karpuz	2009	Türkiye	Yerli
HBCC2011	Hıyar	2011	Türkiye	Yerli
HBCP2011	Kabak	2011	Türkiye	Yerli
HBCM2009	Kavun	2009	Türkiye	Yerli
CM1	Kavun		Türkiye	Yerli
CM2	Kavun		Türkiye	Yerli
CW3	Karpuz		Türkiye	Yerli

**Çizelge 3.2.** Real-Time PCR'da kullanılan farklı bitki patojeni bakteriler

Bakteri İsmi	Konukçu	Tarih	Orijini	Referans
<i>Bacillus subtilis</i>	Toprak	2008	Türkiye	H.Basım
<i>Erwinia amylovora</i>	Armut	2011	Türkiye	H.Basım
<i>Pectobacterium caratovora</i> subsp. <i>caratovora</i>	Domates	2004	Türkiye	H.Basım
<i>P. corrugata</i>	Domates		Türkiye	H.Basım
<i>P. tomato</i> pv. <i>tomato</i>	Domates	2008	Türkiye	H.Basım
<i>P. savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>	Zeytin	2008	Türkiye	H.Basım
<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>	Turunçgil	2008	Türkiye	H.Basım
<i>C. michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	Domates	2008	Türkiye	H. Basım
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	Fasulye	2003	Türkiye	R. Kotan
<i>Rhizobium vitis</i>	Asma		Türkiye	H.Basım
<i>Xylella fastidiosa</i>	Asma	2009	Türkiye	H.Basım
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	Biber	2009	Türkiye	H.Basım
<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	Lahana		Almanya	W. Zeller

### 3.2. Primerler ve Probu Tasarlanması

Karpuz Bakteriyel Meyve Leke hastalık etmeni *A. citrulli*'nin Real-Time PCR yöntemi için *hrpB2* gen dizisi ve ITS (internal transcribed spacer) bölgesi kullanılmıştır. Klasik PCR ile *hrpB2* gen dizisinin tanısında HB2F2/HB2R2 (Tian vd., 2010) primerleri kullanılmıştır (Çizelge 3.3). ITS bölgesi için ise gen banktan (NR\_114464) yararlanılmıştır. Genbankasından elde edilen ITS bölgesine ait 280 bp'lik bölge kullanılmıştır. *A. citrulli* strainlerinden seçilen izolatlar, *hrpB2* geni için klasik PCR'da test edilmiştir. *A. citrulli* strainlerinin *hrpB2* gen dizisi üzerindeki 290 bp'lik kısmı klasik PCR ile amplifiye edilmiştir. *A. citrulli* strainlerinin klasik PCR ile tanı ve tespitinin gerçekleştirilmesi amacıyla Çizelge 3.4'teki PCR programı kullanılmıştır.

**Çizelge 3.3.** *Acidovorax citrulli* *hrpB2* genine spesifik klasik PCR primer seti

Primer	Primer dizi (5'→3')	PCR ürünü	Referans
HB2F2	CCTCCAGCTGCCCGTATC	290 bp	(Tian vd. 2010)
HB2R2	CGGACACCCGGTACATCAGC		

Klasik PCR yönteminde kullanılacak bakteriyel süspansiyonların hazırlanması için -86 °C kültür koleksiyonunda stoklanan *A. citrulli* strainlerinden seçilenler nutriet agar (NA) besi ortamı aktarılmış ve 27 °C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Tek koloni gelişimi gözlenen bakteriler eppendorf tüplere steril öze yardımıyla alınıp steril deiyonize su ilave edilerek süspansiyonlar hazırlanmış ve bakteriyel konsantrasyonlar  $1 \times 10^8$  cfu/ml düzeyinde ayarlanması için Eppendorf Biophotometer 6131 spektrofotometresi kullanılmıştır. Bakteriyel konsantrasyonlar optik yoğunluğu  $1 \times 10^8$  cfu/ml'ye karşılık gelen  $OD_{600}=0.1$  olarak ayarlanmıştır.

PCR reaksiyonu için her örnek için 50 µl'lik karışımlar hazırlanmıştır. PCR yönteminde kullanılan master mix; 5.0 µl 10x buffer (Thermo Scientific, Massachusetts, USA), 3.0 µl (2.5mM) MgCl<sub>2</sub>, 8.0 µl (100 mM) dNTPs, 1 µl (320 pmol) her bir primerden, 0.25 µl (5U/MI) *Taq* polimeraz (Thermo Scientific, Massachusetts, USA), 27.8 µl of steril distile su ve 4.0 µl bakteriyel süspansiyon kullanılmıştır. PCR yöntemi Techne TC-512 Gradient Thermal Cycler (Bibby Scientific Limited, Staffordshire, İngiltere) klasik PCR cihazı kullanılarak ve optimize edilen Çizelge 3.4'te belirtilen PCR programı cihaza girilerek yapılmıştır. Elde edilen PCR ürünü (15 µl) ve 100 bp marker (Thermo Scientific, Massachusetts, USA) hazırlanan 1 % agarose jel in 0.5x TAE (Tris-Base 4.84 g, Acetic Acid [Glacial] 1.02 ml, 0.5 M EDTA [pH: 8.0] 2 ml, ddH<sub>2</sub>O 1000 ml) buffer'da 85 V/cm 1 saat 30 dakika yürütülmüştür. Agaroz jel ethidium bromide (0.5 µg/ml) içerisinde 15 dakika bekletilmiştir. Agaroz jelin görüntüsü ultraviyole (UV) ışık görüntüleme sisteminde (Viber Lourmat SR 12575 UV transilluminator (Fransa) ve BioCapt Sürümü 11.02, film-Sony Corporation-Shinagawa-ku, Tokyo, Japonya) görüntüleme kağıdına aktarılmıştır.

**Çizelge 3.4.** *Acidovorax citrulli*'nin *hrpB2* gen bölgesine göre optimize edilen klasik PCR programı

PCR Aşaması	Sıcaklık (°C)	Süre (Saniye)	Döngü Sayısı
Ön Denatürasyon	95	300	1
Denatürasyon	95	30	
Bağlanma	62	30	35
Uzama	72	45	
Son Uzama	72	300	1

A. *citrulli* için gen bankasından elde edilen ITS bölgesi ve klasik PCR yöntemiyle elde edilen amplifikasyon bölgelerinin sekansı BM Labosis - Macro Gene (Çankaya, Ankara) ([www.bmlabosis.com](http://www.bmlabosis.com)) tarafından yapılmıştır. Sekans sonuçları Bioedit programı (Hall 1999) kullanılarak birleştirilmiş ve GenBankası'nda blastları yapılmıştır. Bu bölgelere özel primer-prob setleri tasarlanmıştır. Tasarlanan problemler tıp alanındaki Real-Time PCR çalışmalarında kullanılan LNA (Locked Nucleic Acid) prob sistemidir (Petersen ve Wengel 2003). Çalışmada kullanılan LNA prob, Real-Time PCR sistemlerinde daha sıklıkla kullanılan 25-30 nükleotitlik uzun problemlardan dizi sayısı ve bağlanma oranı bakımından farklılık gösteren 8-9 nükleotitten oluşan LNA problemlerdir. Bu tip problemler dizi uzunluğu olarak daha kısa oldukları için kendi içinde bağlanma olasılığını ortadan kaldırmakta ve amplifikasyon işleminin daha kısa sürede gerçekleşmesine imkan sağlamaktadır (Anonim, 2014). Bu çalışmada kullanılan problemler raportör boya olarak fluorescein amidit (FAM), baskılayıcı boya olarak karboksitetrametilrodamin (TAMRA) içermektedir. PCR çalışmasında kullanılacak primerler BM Labosis - Macro Gene ([www.bmlabosis.com](http://www.bmlabosis.com)), problemler Roche Molecular Systems ([lifescience.roche.com](http://lifescience.roche.com)) laboratuvarına sentezletirilmiştir.

Çalışmada elde edilen diziler için *hrpB2* geni için sekans sonucunda 279 bp dizi elde edilmiş ve ITS bölgesi için ise gen bankasından elde edilen 280 bp'lik diziler kullanılmıştır. Her ikisinde de 88 bp uzunluğundaki bölgeyi çoğaltan primer-prob setleri tasarlanmıştır. Şekil 3.1' de yer alan bölgelerde kullanılan diziler ve dizi üzerindeki primer-prob setlerinin bağlanma yerleri farklı renklerle (mavi renk; primerler (left-right), pembe renk; prob) belirtilmiştir.

**hrpB2 geni**

CGTATCCCCGCGCCGGCCATCGAATCCGGGCGCCGCCAGCCCAGCAACCT  
 GAGCGCGCTGGCGGAGAAGTTCGCGC**GCATGATGGAAGGCAAGCCCCAG**  
 GCGCCCCTGGCCGAGATGGCCCCGACTCCACC**CTGGGCAA**CGCGCT**CAT**  
**GCACCAGGACGAATCC**ATGCGCAAGGCACTGCAGGACATGCACGCGCTGG  
 CCCACGCGCAGAAAGACAACCTCGATGAACGACATCGACATGACGTCCCGCC  
 AGATCGAGCTGATGTACCGGGTGTCCGA

**ITS bölgesi**

TTTCTGGAAAACAGCATTCAATATTGAACGCCACACTTATCGGTTGTTGGA  
 AGAAGTCGGTGCTAACCGACATGGGTCTGTAGCTCAGCTGGTTAGAGCACC  
 GTCTTGATAAAGCGGGGGTTCGTTGGTTCGAGCCAACTAGACCCACCAAAT  
 CTTCCGAACATAAGATGCGAGGATCAGTGGGGGATTAG**CTCAGCTGGGAG**  
**AGCACCTGCTTTGCAAGCAGGGGGTTCGTCGGTTCGATCCCGTCATCCTCCA**  
**CCAACCAATACGCTCTGCGGTAGGG**

**Şekil 3.1.** Real-Time PCR’da *Acidovorax citrulli*’nin tanısı için kullanılan diziler ve primer-prob setlerinin dizi üzerindeki bağlanma yerleri

**3.3. Real-Time PCR Optimizasyonu**

A. *citrulli*’nin Real-Time PCR ile kısa sürede tanılarının gerçekleştirilmesi amacıyla dizayn edilen primer-prob setleri Çizelge 3.5’de ve buna uygun optimize Real-Time PCR programı ise Çizelge 3.6’da verilmiştir. Real-Time PCR reaksiyonunda, primerlerin herbirinden 1.2 µl, 0.3 µl LNA prob, 4.8 µl dNTP karışımı, 3 µl 10X tampon çözelti, 7.2 µl MgCl<sub>2</sub>, 0.36 µl *Taq* polimeraz ve 9.54 µl steril deiyonize su ve 2 µl bakteriyel süspansiyon ya da kalıp DNA kullanılarak toplam hacim 29.6 µl olacak şekilde her bir reaksiyon için karışım solüsyonu hazırlanmıştır. Çalışmada geliştirilen Real-Time PCR yönteminin uygulanmasında Cepheid Smart Cycler II Real-Time PCR cihazı ve Cepheid Smart Cycler Software V.2.0c programı kullanılmıştır.

**Çizelge 3.5.** *Acidovorax citrulli*’nin Real-Time PCR yöntemi için geliştirilen primer-prob seti

Gen/Bölge	Primer	Primer dizi (5’→3’)	PCR ürünü
<i>hrpB2</i>	HBACHRPB2	GATTCGTCCTGGTGCATGA	88 bp
	HBACHRPB21	GCATGATGGAAGGCAAGC	
	Prob	CTGGGCAA	
ITS	HBAcITSL	CTCAGCTGGGAGAGCACCT	88 bp
	HBAcITSR	CCCTACCGCAGAGCGTATT	
	Prob	CTCCACCA	

**Çizelge 3.6.** *Acidovorax citrulli* için optimize edilmiş Real-Time PCR programı

Aşama	Sıcaklık (°C)	Süre (Saniye)	Döngü Sayısı
Ön Denatürasyon	95	120	1
Denatürasyon	95	15	
Bağlanma	56	10	35
Uzama	72	10	
Son Uzama	72	60	1

### 3.4. Primerler ve Probların *Acidovorax citrulli* Strainlerine Spesifikliğinin Belirlenmesi

*A. citrulli* patojenine özel tasarlanan primer-prob seti kullanılarak kültür koleksiyonunda bulunan Çizelge 3.1’de yer alan yerli ve yabancı strainlerin tanısı gerçekleştirilmiştir. Real-Time PCR işleminde kullanılacak tüm strainleri için kullanılan bakteriyel süspansiyonlar -86 °C deki kültür koleksiyonundan nutrient agar ve King’s B besi ortamına inoküle edilmiş ve 27 °C’de 48-72 saat inkübasyona bırakılmıştır. Besi ortamında gelişen bakteriler steril deiyonize su ile stok solüsyonlar hazırlanmış ve bakteriyel konsantrasyon yoğunluğu  $1 \times 10^8$  cfu/ml optik yoğunluğu  $OD_{600}=0.1$  olacak şekilde Eppendorf Biophotometer 6131 spektrofotometre cihazı kullanılarak ayarlanmıştır. Her strainden elde edilen stok süspansiyondan her iki bölgeye dizayn edilmiş primer-prob setlerinin spesifikliğini test etmek için 2’şer  $\mu$ l’lik bakteriyel süspansiyon kullanılarak Real-Time PCR işlemi gerçekleştirilmiştir.

### 3.5. Primerler ve Probların Saf DNA’dan Hassasiyetinin Belirlenmesi

*A. citrulli* etmeninin tespit edilebilir minimum DNA miktarının geliştirilen Real-Time PCR yöntemi ile tespiti için saf bakteriyel DNA’dan hassasiyet çalışması yapılmıştır. Çalışma için kültür koleksiyonunda yer alan en virülens *A. citrulli* 8408 strainini kullanılmıştır. Bakteri total genomik DNA izolasyonu için Thermo FastPrep FP120A-230 multi tüp homojenizatör (Thermo Scientific, Massachusetts, ABD) ve Qbiogene/BIO101 FastDNA moleküler izolasyon kiti (MP Biomedicals, Kaliforniya, ABD) kullanılmıştır.

*A. citrulli* strainlerinden izole edilen DNA’nın konsantrasyonun oranını belirlemek için ilk olarak nanogram düzeyinde ölçüm yapan Thermo NanoDrop ND-1000 spektrofotometre (Thermo Scientific, Massachusetts, ABD) ile yapılmış ve daha sonra 1000 kat daha düşük olan konsantrasyonun düzeyinde olan pikogram yoğunlukları için Invitrogen Qubit florometre (Invitrogen, Kaliforniya, ABD) cihazı kullanılmıştır. Başlangıç DNA yoğunluğu 372 ng düzeyinde elde edilmiş ve stok solüsyon olarak kullanılmıştır. Real-Time PCR yönteminin hassasiyetinin belirlenmesinde *A. citrulli* için 48.8 pg, 37.2 pg, 28.8 pg, 21.2 pg ve 12 pg DNA yoğunlukları elde edilmiştir. Pikogram düzeyinde ölçümler için gerekli olan kalibrasyon solüsyonlarında ve hazırlanan seyreltmelerde steril deiyonize su kullanılmıştır. Elde edilen her bir seviyedeki DNA’lardan 2’şer  $\mu$ l alınarak Real-Time PCR işlemi gerçekleştirilmiştir. Daha sonraki



aşamada pikogramın binde biri olan femtogram düzeyinde ölçüm için 12 pg stok solüsyon olarak kullanılmış ve bu solüsyondan 10'un katları şeklinde seyreltemeler yapılarak 1200 fg, 120 fg, 12 fg ve 1.2 fg elde edilmiştir. Elde edilen her bir seviyedeki DNA'lardan 2'şer µl alınarak Real-Time PCR işlemi gerçekleştirilmiştir.

### 3.6. Direkt Bakteriyel Hücreden Primerler ve Proben Hassasiyetinin Belirlenmesi

*A. citrulli* tespit edilebilecek minimum bakteri sayısının belirlenebilmesi için, en virülen 8408 straini NA besisi ortamına aktararak geliştirilmiş ve tek koloni gelişimi gözlenen petriyelerden  $1 \times 10^8$  cfu/ml yoğunluğunda çalışmada kullanılacak stok çözelti hazırlanmıştır. Hazırlanan stok çözülden  $10^{-1}$ 'den  $10^{-10}$ 'a kadar 10'un katları şeklinde seyreltmeler çalışmanın güvenilirliği için 3 tekerrürlü olarak ayrı ayrı tüplerde hazırlanmıştır. Elde edilen her bir solüsyondan 2'şer µl alınıp Real-Time PCR işlemi için kullanılmıştır. Eş zamanlı olarak hazırlanan  $10^{-1}$ 'den  $10^{-10}$ 'a kadar seyreltilmiş solüsyonlardan 2 µl alınıp 50 µl steril deiyonize su içerisinde karıştırılmış ve NA besisi ortamlarına steril yayma çubuk ile inokülasyon yapılmış ve 27 °C'de 3 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda petriyelerdeki koloni sayıları sayılmış ve minimum gelişme gösteren en düşük seyreltilmiş solüsyon yoğunluğu ve koloni sayısı belirlenmiştir.

### 3.7. Primerler ve Proben Seçiciliğinin Belirlenmesi

*A. citrulli* için geliştirilen primer ve probun özgüllüğünü belirlemek için primer-prob seti kültür koleksiyonundan seçilen diğer bitkilerde patojen olan bakteri türlerine karşı test edilmiştir (Çizelge 3.2). Real-Time PCR işleminde kullanılan bakteriyel süspansiyonların hazırlanması için -86 °C den NA besisi ortamlarına aktarılmış ve patojenler için uygun koşullarda inkübasyona bırakılmıştır. Bu ortamlarda geliştirilen kolonilerden biri seçilerek steril deiyonize su ile süspansiyon edilmiştir. Tüm patojenlerin bakteriyel konsantrasyonu  $1 \times 10^8$  cfu/ml olacak şekilde ayarlanmıştır. Her bitki patojeni bakteri için elde edilen süspansiyondan 2'şer µl alınarak Real-Time PCR işlemi gerçekleştirilmiştir.

### 3.8. *Acidovorax citrulli*'nin Hastalıklı Bitki Dokularından Tespiti

Bakteriyel patojenlerin hastalıklı bitki dokusundan tespiti için *A. citrulli* karakteristik semptom gösteren dokular (tek nekroz) kullanılmıştır. Sağlıklı doku ile hastalık belirtisi gösteren yaprak parçacıkları kesilerek yaklaşık 1 dk boyunca % 70 etanol ile yüzey sterilize edilmiş ve daha sonra steril distile su ile iki kere yıkanarak etanol uzaklaştırılmıştır. Daha sonra yaprak parçacıkları filtre kağıt (Whatman, 125 Dia, ABD) ile kurultularak steril bistiiri ile küçük parçacıklara (0.5-1 mm) ayrılmıştır. Yaprak parçacıkları santrifüj tüplerine alınmış ve steril ezme çubuk yardımı ile dokuların parçalanması bakterinin sıvı içine geçişi sağlanmıştır. Ezildikten sonra 14000 g' de 3 dk süre ile santrifüj edilmiş ve üzerine 30 µl MQ su ilave edilerek stok solüsyon hazırlanmıştır (Şekil 3.2). Bitki total DNA'sı ile tasarlanan primer-prob setlerinin herhangi bir amplifikasyon oluşturup oluşturmadığını kontrol etmek için sağlıklı bitkiden örnek alınarak bitki total genomik DNA izolasyonu PureLink™ Genomic DNA Mini Kit kullanılarak yapılmıştır. Bitki DNA'sı konsantrasyonu için Thermo NanoDrop ND-1000 spektrofotometre kullanılarak nanogram düzeyinde yaklaşık 100-150 ng/µl olacak

şekilde ayarlanmıştır. Çalışmada bitki total genomik DNA'dan 2 µl alınarak primer-prob setinin spesifikliği kontrol edilmiştir.



**Şekil 3.2.** *Acidovorax citrulli*'nin hastalıklı bitki dokularından izolasyonu

### 3.9. Real-Time Bio-PCR

Real-Time PCR ile tohum üzerinde var olan ölü bakterilerin de tespiti mümkün olabildiği için bu çalışmada tohum üzerinde canlı olarak bulunan patojenlerin tespiti için Real-Time Bio-PCR işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla öncelikle, en düşük bakteri sayısının tohumdan tespitinde kullanıldığı gibi stok bir bakteriyel süspansiyon hazırlanmış ve bu solüsyon  $10^{-1}$ 'den  $10^{-3}$ 'a kadar seyreltilmiştir. Tüplerdeki örneklerden 2 şer µl alınıp 50 µl deiyonize su içerisinde karıştırılarak NSA (Nutrient Sucrose Agar) besi ortamlarına steril yayma çubuk ile inokule edilmiş ve *A. citrulli*'nin gelişimi için inkübatörde  $27^{\circ}C$ 'de 16 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra petrilere 1 ml steril deiyonize su eklenerek canlı olan bakteriler yayma çubuğu kullanılarak besi ortamının yıkanması ile suya geçmesi sağlanmış ve süspansiyon, pipet ile 1,5 ml'lik eppendorf tüplerine aktarılmıştır. Elde edilen stok bakteriyel süspansiyon  $10^{-1}$ 'den  $10^{-3}$ 'e kadar seyreltilmiştir. Her seyreltmeden 2 µl alınarak Real-Time PCR işlemi gerçekleştirilmiştir.

### 3.10. Kantitatif Real-Time PCR ve PCR Etkinliği

Hastalıklı bitki materyallerindeki bakteri sayısının belirlenmesi için Kantitatif Real-Time PCR yöntemi uygulanmıştır. Real-Time PCR' da en düşük yoğunlukta

amplifikasyonun gerçekleştiği süspansiyon çalışmada kullanılmıştır. Bakteriyel tespit edilebilen yoğunluk *A. citrulli* için  $10^{-7}$  olarak sistemde belirlenmiş ve bu yoğunluğa denk gelen koloni sayıları cihaz programına girilerek kantitatif yöntem her iki primer-prob seti için uygulanmıştır.

Kantitatif Real-Time PCR reaksiyonu sonucunda *A. citrulli* için referans standart eğri oluşturmuştur. Standart eğrinin belirlenmesinde; eşik döngüsünün (Ct: threshold cycle) değerleri ile 10'un katları şeklinde elde edilmiş bakteri konsantrasyonlarının (cfu/2 µl) logaritmik artışındaki güçlü doğrusal ilişkiler arasında oluşan yüksek korelasyon katsayısı ile standart eğri elde edilmiştir. Standart eğri sonucunda denklemde eğrisinin  $R^2$  değeri elde edilmiş ve deneyler iki kez tekrarlanmıştır. Doğrusal gerileme eğrileri, her reaksiyonun eşik çevrimlerini (Ct) bakteriyel konsantrasyonlarının logaritmik değerlerine karşı çizerek ortaya çıkmıştır. Bu eğride verilerin güvenilir değerlerde olabilmesi için regrasyon değerinin 1'e yakın olması istenilen sonuçlardır. Oluşturulan bu referans eğri, sağlıklı veya hastalıklı bitki materyallerinden hazırlanmış bir bakteriyel solüsyonun 2µl'sindeki bakteri sayısını tespit ederek numunelerin kontrolünde refere bilgi olarak kullanılabilir düzeyde getirilmiştir. Sonuçta sağlıklı ve hastalıklı bir bitki materyallerinden alınan örneklerde *A. citrulli* etmeninin tespit edilebilecek ve ekonomik zarar seviyesi belirlenebilecektir.

PCR etkinliğini (E) belirlemek için;  $E = 10^{(-1 / \text{slope})} - 1$  (Rasmussen 2001) formülü kullanılmıştır. Standart eğri sonucu oluşan regrasyon denklemindeki değerler formülde yerine konularak PCR işleminin kullanılabilirlik seviyesinin ne kadar etkin olduğu yüzde (%) olarak ifade edilmiştir.

### **3.11. *Acidovorax citrulli*'nin Tohum Hassasiyetinin Belirlenmesi ve Tohumdaki Popülasyon Yoğunluğunun Kantitatif Real-Time PCR ile Karşılaştırılması**

*A. citrulli*'nin tohumdan tespiti için *in vitro* koşullarda yapay olarak bulaştırılacak 100 adet karpuz tohumu kullanılmıştır. Tohumlar steril bir petri kabı içerisinde  $1 \times 10^8$  cfu/ml taze kültürden hazırlanan bakteriyel süspansiyondan 1 ml alınarak muamele edilmiştir. Bu işlem sonrasında tohumlar, laminar kabin içerisinde 24 saat boyunca kurumaya bırakılmıştır. Daha sonra 100 adet karpuz tohumu 500 ml hacimli steril erlenmayer içerisine konularak üzerine 60 ml PE Buffer (85 gr NaCl, 0.2 KCl, 1.15 gr NaHPO ve 0.2 gr KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) ilave edilip 6 saat boyunca inkübatör içerisinde 27 °C'de 100 rpm hızındaki çalkalayıcıda bırakılmıştır. İnkübasyon süresinden sonra oluşan süspansiyondan 10 ml alınıp 4100 g'de 20 dk ve 4 °C'de santrifüjlenerek, oluşan pelet PE Buffer içerisinde iyice çözündürülerek stok çözelti oluşturulmuştur. Stok çözeltiden kantitatif sonuçlar ile karşılaştırma yapmak için en düşük seviye sınırı belirlenerek  $10^{-6}$ 'ya kadar seyreltme solüsyonları hazırlanmıştır. Her bir seyreltme örneğinden 2 µl alınıp Real-Time PCR işlemi uygulanmıştır.

Real-Time PCR sonucunda elde edilen seyreltmelerin Ct değerleri ile Kantitatif Real-Time PCR sonucu elde edilen standart eğri karşılaştırılarak tohumdaki bakteriyel popülasyon miktarları belirlenebilmiştir. Her iki primer-prob setleri için oluşturulan regrasyon eğrisi karşılaştırılmıştır.

### 3.12. Karpuz ve Kavun Çeşitlerinin *Acidovorax citrulli*'ye Karşı Duyarlılık Reaksiyonları

*A. citrulli*'ye karşı karpuz ve kavundaki duyarlılık reaksiyonlarının araştırılması için bitki materyalleri (tohum ve fide) bölgedeki tohum ve fide üreticilerinden temin edilmiştir. Temin edilen bazısı fide bazısı da tohum materyali olan 28 karpuz ve 31 kavun çeşidi (Çizelge 3.7) Bitki Koruma Bölümümüze ait serada tohumlar ve fideler iki gerçek yaprak oluncaya kadar ve fidelerde uygun koşullara aktararak yetiştirilmiştir. Daha sonra istenilen özelliklere sahip olan (kotiledon yaprakları ve en az iki gerçek yaprağa sahip bitki) fideler, 48 saat % 90-95 nispi nem içeren ortamda tutularak bakteriyel inokülasyona hazır hale getirilmiştir.

*A. citrulli*'nin bitkiye inokülasyonu için NA ortamında 48 saat boyunca geliştirilmiş strain NB (Nutrient Broth) sıvı besiyeri ortamına inoküle edilerek 27 °C'de yaklaşık 18-24 saat inkübasyonda bekletildikten sonra 3000 rpm'de 10 dk santrifüj yardımıyla çöktürülerek ardından steril saf suyu ile farklı strainler için spektrofotometrede (Eppendorf Biophotometer 6131) bakteriyel konsantrasyonlar 10<sup>8</sup> cfu/ml'ye karşılık gelen OD<sub>600</sub>=0.1 olacak şekilde ayarlanmıştır. Bu solüsyonlar fidelere püskürtülerek inokülasyon gerçekleştirilmiştir. Ayrıca eş zamanlı olarak enjeksiyon yöntemi ile bakteriyel solüsyon karpuz yapraklarına 5 ml enjektör ile yaprağın alt kısmından orta damar kısmından yaklaşık 50 µl bakteriyel konsantrasyon inoküle edilmiştir. Aynı bitkide bir yaprağa hastalık etmeni bir yaprağa da kontrol için steril su enjekte edilmiştir. İnokülasyon sonrasında hastalığın düzgün seyri için ortam sıcaklığı gün içinde 24±1 °C, gece sıcaklığının da 33 °C'nin üstüne çıkmaması için sera koşulları kontrol edilmiştir. Hastalığa dair belirtiler inokülasyondan yaklaşık 1 haftayla 10 gün sonra kotiledon ve gerçek yapraklarda spesifik lezyonlar Hopkins ve Levi (2008) skalasına göre 9 farklı seviyede değerlendirilmiştir.

Çalışmada uygulanan 1-9 skalasına göre:

1= simptom yok

2= kotiledonlarda çok küçük lezyonlar

3= kotiledonun <20% sini kaplayan küçük lezyonlar

4= kotiledonun >20% sini kaplayan küçük lezyonlar

5= kotiledonlarda nekrotik lezyonlar ile kloroz oluşumu 20- 50% oranında

6= kotiledon ve gerçek yapraklarda nekrotik lezyonlar %20-50 oranında

7= kotiledon ve yapraklarda büyük nekrotik lezyonlar >50% oranında

8= kotiledon ve yapraklarda nekrotik lezyonlar ve kloroz >50% oranında

9= kotiledon ve yapraklarda nekrozlar >90% oranında veya bitki ölümü

şeklindedir.

Karpuz ve kavun çeşitlerinin yapraklarındaki lezyonların yayılımı sürekli kontrol edilerek hastalığa karşı bitkideki duyarlılık reaksiyonları skalaya göre değerlendirilerek sonuçlar SPSS (Version 16.0) paket programları kullanılarak % 5 önem seviyesinde ANOVA GLM prosedürü uygulanarak Tukey ve Duncan çoklu karşılaştırma testleri uygulanarak çeşitlerin gösterdiği duyarlılık reaksiyonları istatistiksel olarak belirlenmiştir.

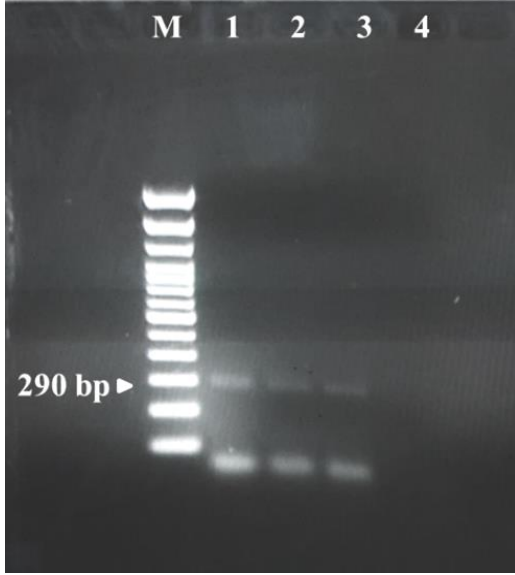
**Çizelge 3.7.** Duyarlılık testlerinde kullanılan karpuz ve kavun çeşitleri

No	Çeşit	Bitki	Fide/Tohum	No	Çeşit	Bitki	Fide/Tohum
1	Starbus F1	Karpuz	Fide	1	Balözü F1	Kavun	Fide
2	Joker F1	Karpuz	Fide	2	Alibey F1	Kavun	Fide
3	501 F1	Karpuz	Fide	3	Anka F1	Kavun	Fide
4	Üstün F1	Karpuz	Fide	4	Balhan F1	Kavun	Fide
5	Celine F1	Karpuz	Fide	5	Adahan F1	Kavun	Fide
6	Usta F1	Karpuz	Fide	6	Davutbey F1	Kavun	Fide
7	Nostalji F1	Karpuz	Fide	7	Dardanos F1	Kavun	Fide
8	Ohman F1	Karpuz	Fide	8	Karna F1	Kavun	Fide
9	Crimstar F1	Karpuz	Fide	9	Sinem F1	Kavun	Fide
10	Crimsonside	Karpuz	Fide	10	Hacıbey F1	Kavun	Fide
11	Odipus F1	Karpuz	Fide	11	Sigal F1	Kavun	Fide
12	Starburst F1	Karpuz	Fide	12	MGH78	Kavun	Fide
13	Empereror F1	Karpuz	Fide	13	Zümra F1	Kavun	Fide
14	Karaoğlan F1	Karpuz	Fide	14	Konak F1	Kavun	Fide
15	Elize F1	Karpuz	Fide	15	Melita F1	Kavun	Fide
16	Leanca F1	Karpuz	Fide	16	Napolyon F1	Kavun	Fide
17	Crimstil F1	Karpuz	Fide	17	Kırkağaç	Kavun	Fide
18	Karain F1	Karpuz	Fide	18	Ankara	Kavun	Tohum
19	Crimsonsweet	Karpuz	Fide	19	Adana	Kavun	Tohum
20	Ala (Crimson Glory F1)	Karpuz	Fide	20	Gazipaşa-dilimli	Kavun	Tohum
21	Style F1	Karpuz	Tohum	21	Çamlıca	Kavun	Tohum
22	Şahmaran F1	Karpuz	Tohum	22	Gladron-Gazipaşa	Kavun	Tohum
23	Carayan F1	Karpuz	Tohum	23	Eskişehir	Kavun	Tohum
24	Crisbye F1	Karpuz	Tohum	24	Zorbey	Kavun	Tohum
25	Adana	Karpuz	Tohum	25	Buğra F1	Kavun	Tohum
26	Gazipaşa-kara karpuz	Karpuz	Tohum	26	Şükrübey F1	Kavun	Tohum
27	Lena	Karpuz	Tohum	27	Çitirex	Kavun	Tohum
28	Bozbey	Karpuz	Tohum	28	Baldo F1	Kavun	Tohum
				29	Özbey	Kavun	Tohum
				30	İshakbey F1	Kavun	Tohum
				31	Payam F1	Kavun	Tohum

## 4. BULGULAR

### 4.1. *Acidovorax citrulli*'nin Klasik PCR ile Tanısı

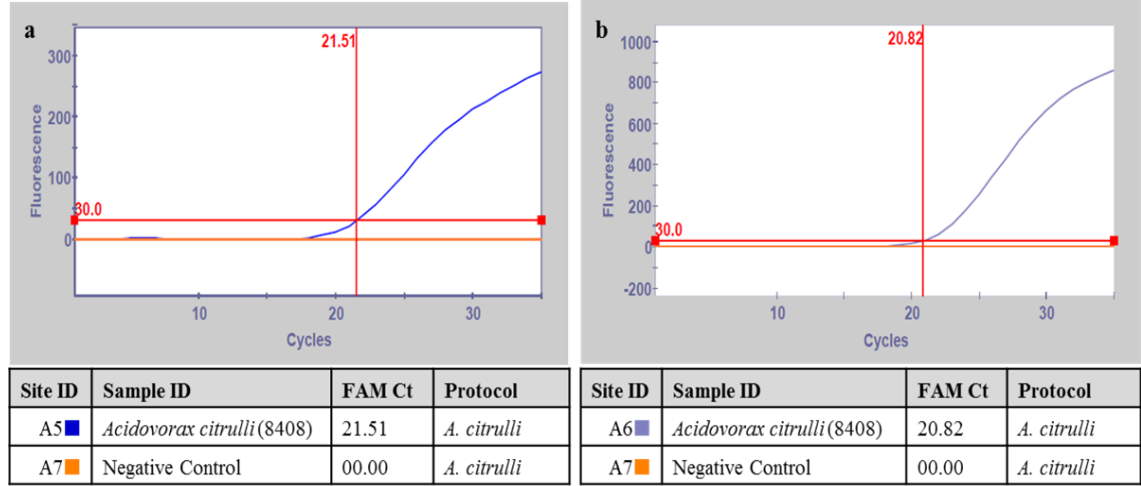
*Acidovorax citrulli*'nin *hrpB2* gen dizisinin Klasik PCR ile çoğaltmak için HB2F2/HB2R2 (Tian vd. 2010) primerleri ve bu primerlere uygun Çizelge 3.3'te yer alan PCR programı kullanılarak istenilen bölge çoğaltılmıştır (Şekil 4.1).



**Şekil 4.1.** *Acidovorax citrulli*'nin *hrpB2* geninin klasik PCR ile amplifikasyonu. M, marker (100 bp); 1, 2: 8408-Karpuz; 3: M1 Kavun; 4: NK (su) (Negatif kontrol)

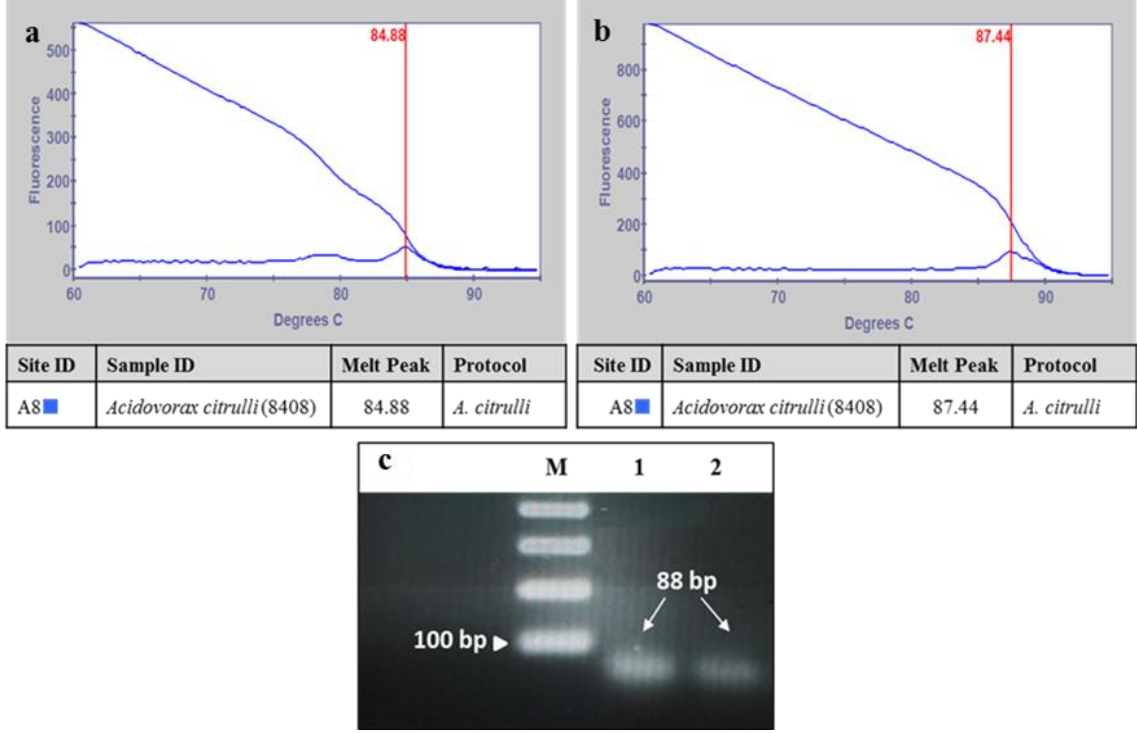
### 4.2. *Acidovorax citrulli*'nin Real-Time PCR ile Tanısı

*A. citrulli*'nin Real-Time PCR ile tanısını gerçekleştirmek için Akdeniz Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Fitopatoloji Anabilim Dalı'na ait kültür koleksiyonunda yer alan yerli ve yabancı *A. citrulli* strainleri kullanılarak *hrpB2* geni ve ITS bölgesi için tasarlanan primer-prob setleri ve optimize edilen Real-Time PCR programlarının kontrolü yapılmıştır (Şekil 4.2).



**Şekil 4.2.** *Acidovorax citrulli*'nin (a) *hrpB2* geni primer-prob setine ait ve (b) ITS bölgesi primer-prob setine ait Real-Time PCR sonuçları

Amplifikasyon sonrası erime eğrisi analizi, primer-dimer artifaktları için gerçek zamanlı PCR reaksiyonlarını kontrol etmek ve reaksiyon spesifitesini sağlamak için kullanılmaktadır. Nükleik asitlerin erime sıcaklığı, diğer faktörlerin yanı sıra, farklı PCR ürünleri, uzunluk, GC içeriği ve baz uyumsuzlukların varlığından etkilendiği için genellikle erime özelliklerine göre ayırt edilebilir. Bunun için çalışmada *A. citrulli*'nin tanısında kullanılan primer çiftleri ve floresan boya olarak SYBR Green kullanılarak Real-Time PCR da tek bir pik eğrisi oluşması ile Thermal Melting (Erime Grafiği) grafiği elde edilmiştir. *hrpB2* geni ve ITS bölgesi için tasarlanan primer çiftlerinin maximum erime sıcaklığı sırasıyla 84.88 °C ve 87.44 °C olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.3-a-b). Ayrıca Klasik PCR ile Real-Time PCR primerlerinin tek bant oluşturduğu kontrol edilmiş ve %2'lik (1 gr NuSieve Agaroz and 1 gr Agaroz) agaroz jelde 70 voltta 2 saat yürütülerek beklenen 88 bp'lik tek bir bant oluşumu ile başarılı sonuç elde edilmiştir (Şekil 4.3-c).

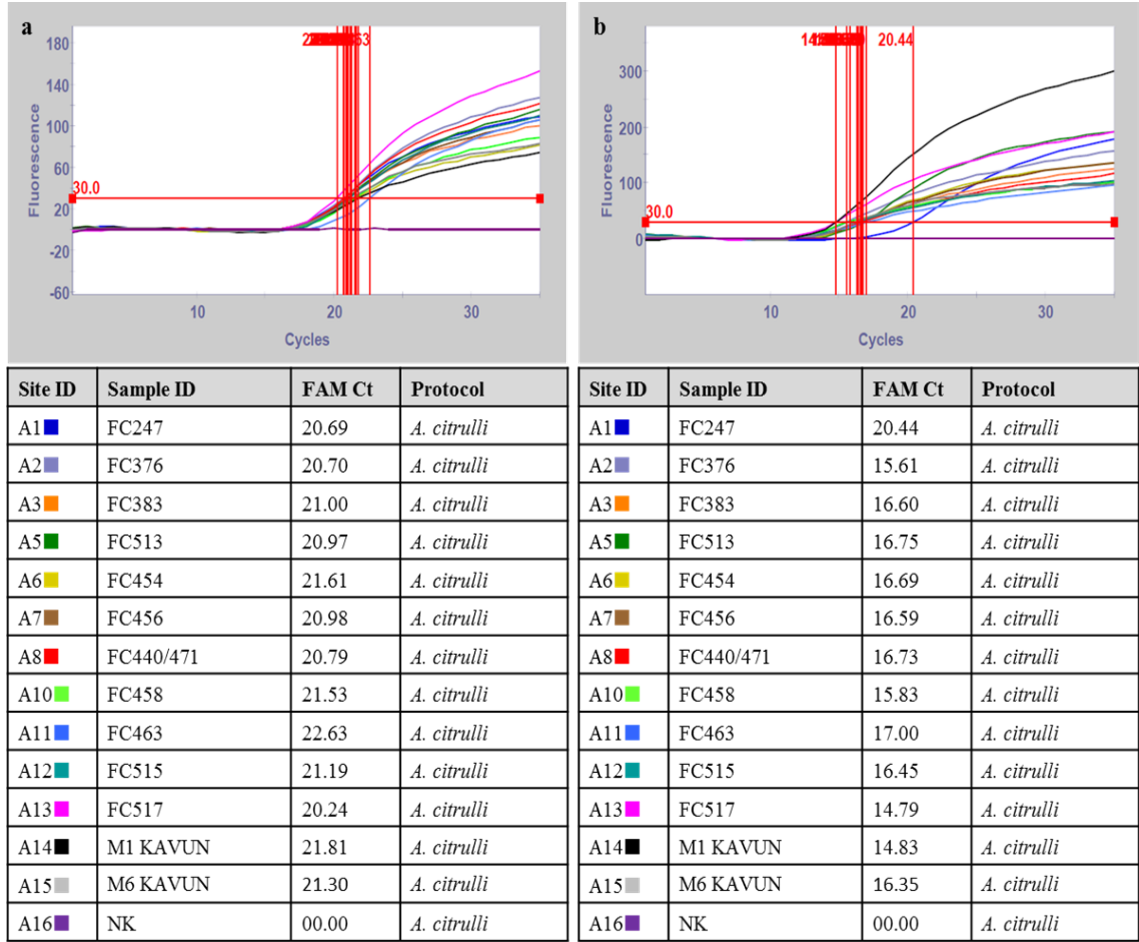


**Şekil 4.3.** *Acidovorax citrulli*'nin (a) *hrpB2* geni primer setine ait (b) ITS bölgesi primer setine ait erime grafiği ve Real-Time PCR primerleri ile klasik PCR sonuçlarının agoroz jelde görüntülenmesi (M: marker (100 bp), 1: *hrpB2* Real-Time primer seti, 2: ITS Real-Time PCR primer seti) (c)

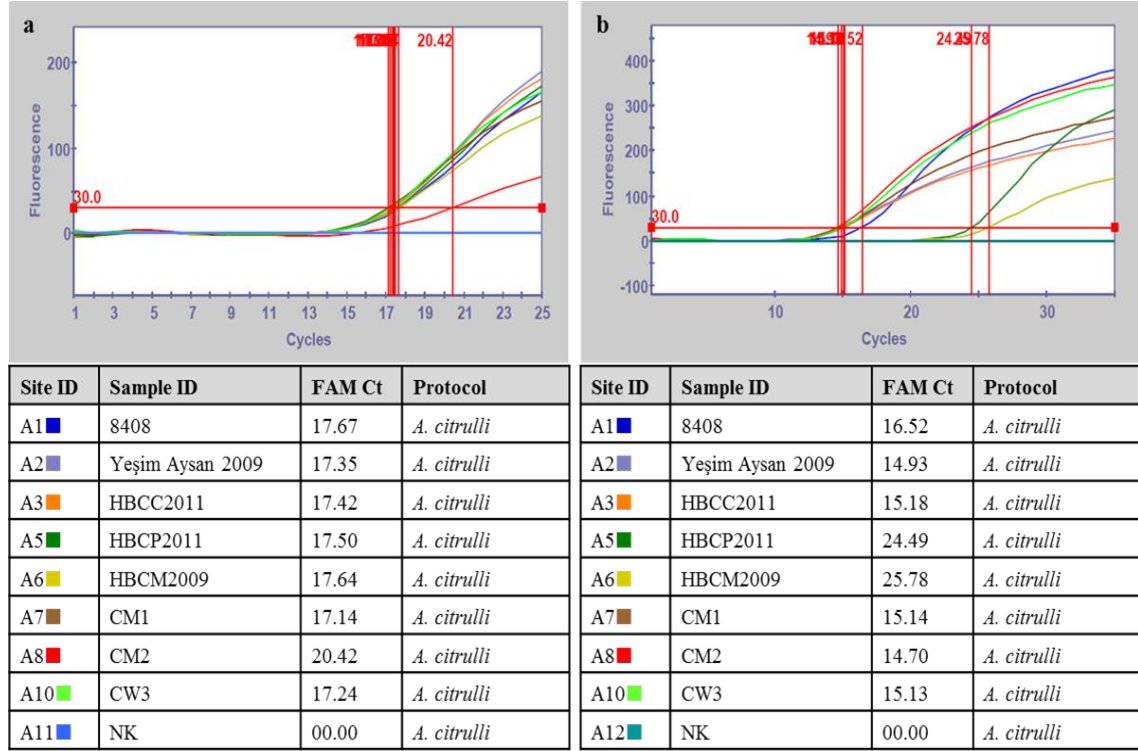
#### 4.3. *Acidovorax citrulli* Strainlerinin Real-Time PCR ile Tanısı

*A. citrulli*'nin Real-Time PCR ile tanısını gerçekleştirmek için kültür koleksiyonunda yer alan yerli ve yabancı *A. citrulli* strainleri kullanılarak primerler ve probun strainlere spesifikliğı test edilmiştir. Tasarlanan primerler ve probun *A. citrulli*'nin yerli ve yabancı kullanılan tüm strainlere spesifik olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.4; Şekil 4.5).





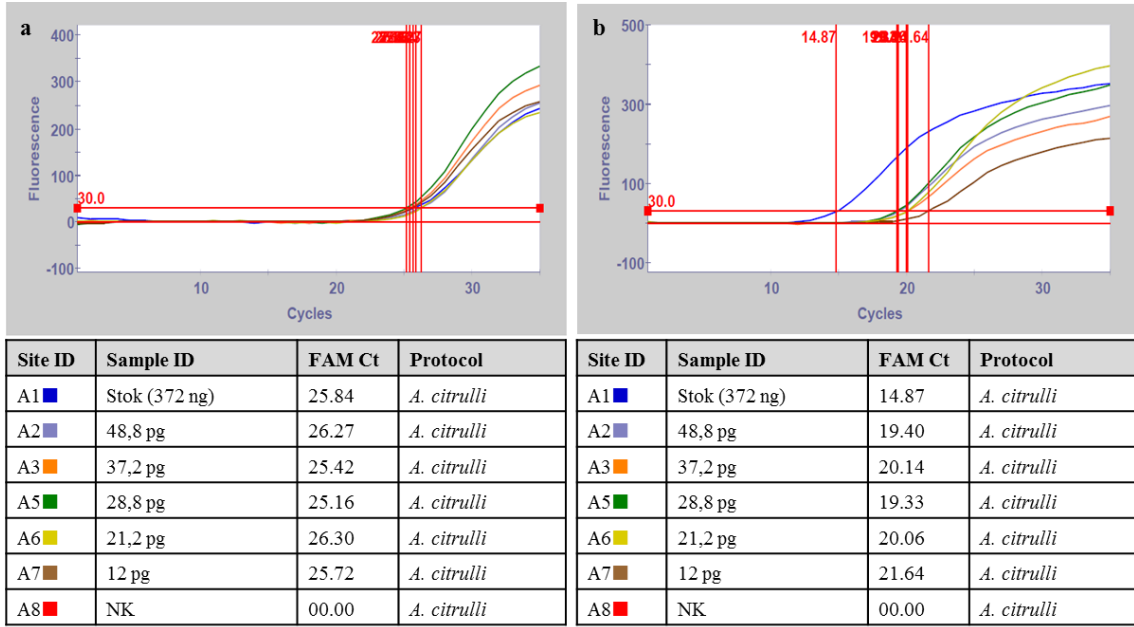
**Şekil 4.4.** *Acidovorax citrulli* yabancı strainlerin (a) *hrpB2* geni primer-prob setine ait ve (b) ITS bölgesi primer-prob setine ait Real-Time PCR sonuçları



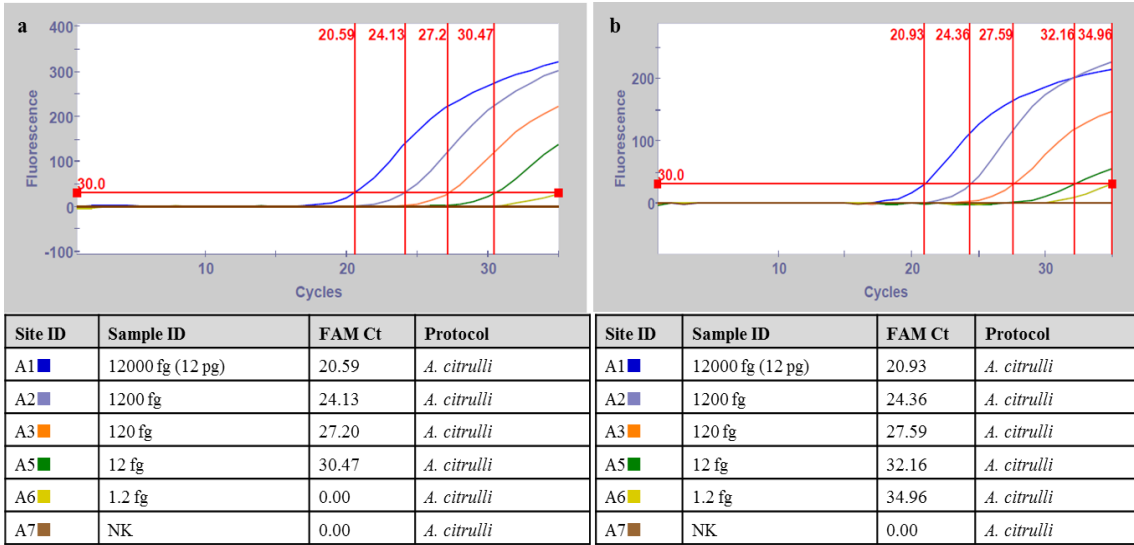
**Şekil 4.5.** *Acidovorax citrulli* yerli strainlerin (a) *hrpB2* geni primer-prob setine ait ve (b) ITS bölgesi primer-prob setine ait Real-Time PCR sonuçları

#### 4.4. Primerler-Prob setlerinin saf DNA'dan Hassasiyeti

Real-Time PCR ile primer seti ve probun genomik DNA'dan hassasiyetini belirlemek için *A. citrulli*'den izole edilen genomik DNA'ya önce ng düzeyinde ölçüm sonucu 372 ng elde edildi ve stok solüsyon olarak kullanılmıştır. Daha sonra pg düzeyinde ölçümleri yapılmıştır. Pikogram düzeyindeki ölçümlerde yaklaşık 48.8 pg, 37.2 pg, 28.8 pg, 21.2 pg ve 12 pg düzeyinde seyreltmeler elde edilmiştir. elde edilen seyreltmeler Real-Time PCR yöntemi her iki primer-prob seti ile tespit edilmiştir (Şekil 4.6). Bir sonraki aşamada pikogramın alt birimi olan femtogram düzeyinde tespit en minimum seviye tespitinin yapılabilirliği denenmiştir. Bu kısımda 12 pg stok solüsyon olarak alınmıştır ve 10'nun katları şeklinde seyreltme yapılarak 1200 fg, 120 fg, 12 fg ve 1.2 fg elde edilmiştir. Hazırlanan seyreltmeler Real-Time PCR'da test edilmiş ve uygulanan yöntem ile patojenin tespitinde kullanılan her iki primer-prob setlerinin *A. citrulli*'nin genomik DNA'sından minimum sınır 12 fg olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.7).



**Şekil 4.6.** *Acidovorax citrulli*'nin saf DNA'dan (pikogram düzeyinde) (a) *hrpB2* geni primer-prob setine ait ve (b) ITS bölgesi primer-prob setine ait Real-Time PCR hassasiyet sonuçları



**Şekil 4.7.** *Acidovorax citrulli*'nin saf DNA'dan (femtogram düzeyinde) (a) *hrpB2* geni primer-prob setine ait ve (b) ITS bölgesi primer-prob setine ait Real-Time PCR hassasiyet sonuçları

#### 4.5. Direkt Bakteriyel Hücreden Primer ve Prob Setlerinin Hassasiyeti

*A. citrulli*'nin direkt bakteriyel hücreden hassasiyet limitini belirlemek için yapılan seyreltme sonuçlarında her iki primer-prob için yapılan Real-Time PCR'da bakteriyel hücre tespit limiti  $10^{-7}$  (Çizelge 4.1; Şekil 4.8) olarak saptanmıştır. Eş zamanlı yapılan petri uygulamasında NA besi ortamına yapılan 3'lü tekerrür sonucunda ortalama minimum bakteriyel koloni sayısı  $10^{-7}$ 'de 2 (cfu/ml) olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.7).

**Çizelge 4.1.** Direkt bakteriyel hücre hassasiyet çalışmasında hazırlanan bakteriyel seyreltmelerin NA besi ortamındaki koloni sayıları

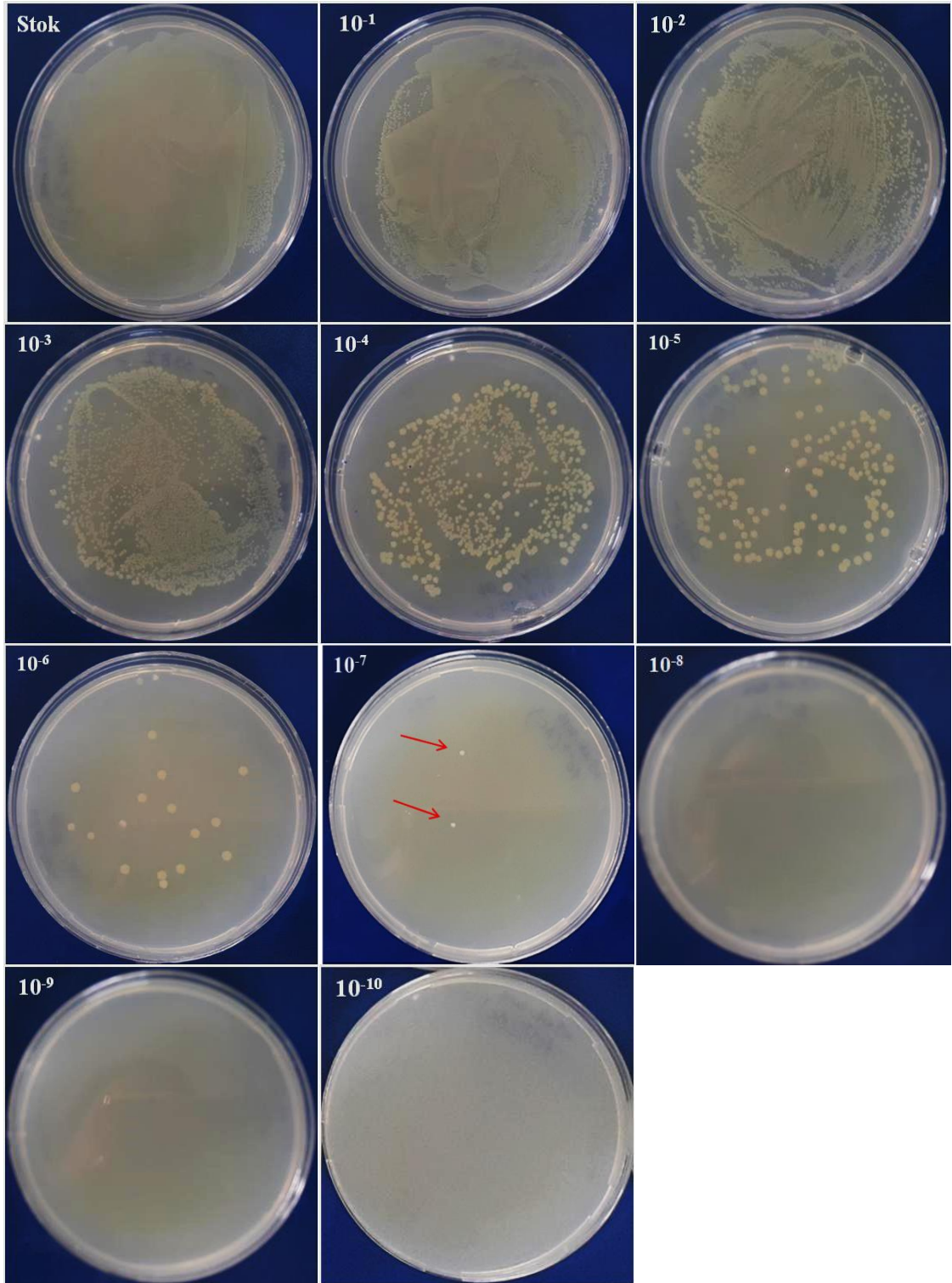
Konsantrasyonlar	Tekerrür			Hesaplama		Real-Time PCR
	1	2	3	$\bar{x}$	std	P/N
Stok	*	*	*	-	-	+
$10^{-1}$	*	*	*	-	-	+
$10^{-2}$	*	*	*	-	-	+
$10^{-3}$	3986	3988	3983	3985,6	2.51	+
$10^{-4}$	462	463	461	462	1.00	+
$10^{-5}$	134	133	136	134,3	1.53	+
$10^{-6}$	16	14	17	15,6	1.53	+
$10^{-7}$	2	2	2	2	0	+
$10^{-8}$	0	0	0	0	0	-
$10^{-9}$	0	0	0	0	0	-
$10^{-10}$	0	0	0	0	0	-
<b>Negatif Kontrol</b>	0	0	0	0	0	-

\*: Petride yoğun bakteri gelişimi nedeniyle sayılamadı

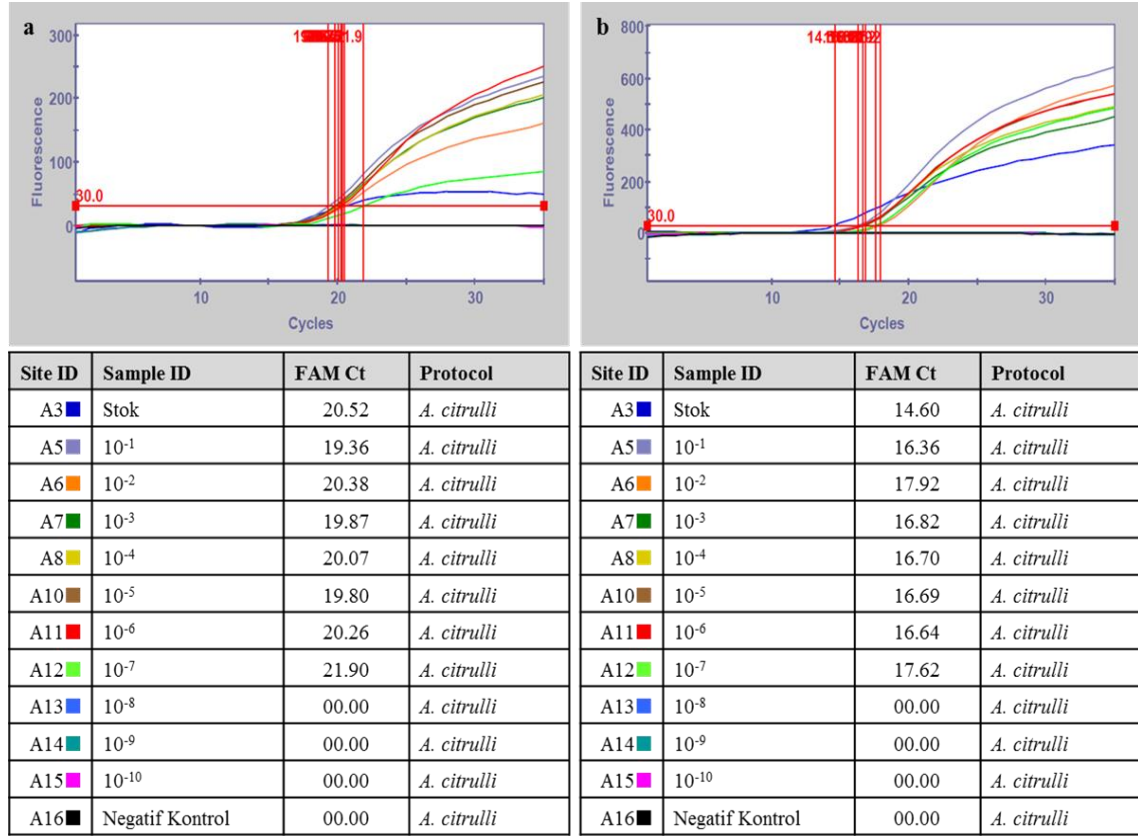
std: Standart sapma

P/N: Pozitif/Negatif

$\bar{x}$ : Aritmetik ortalama



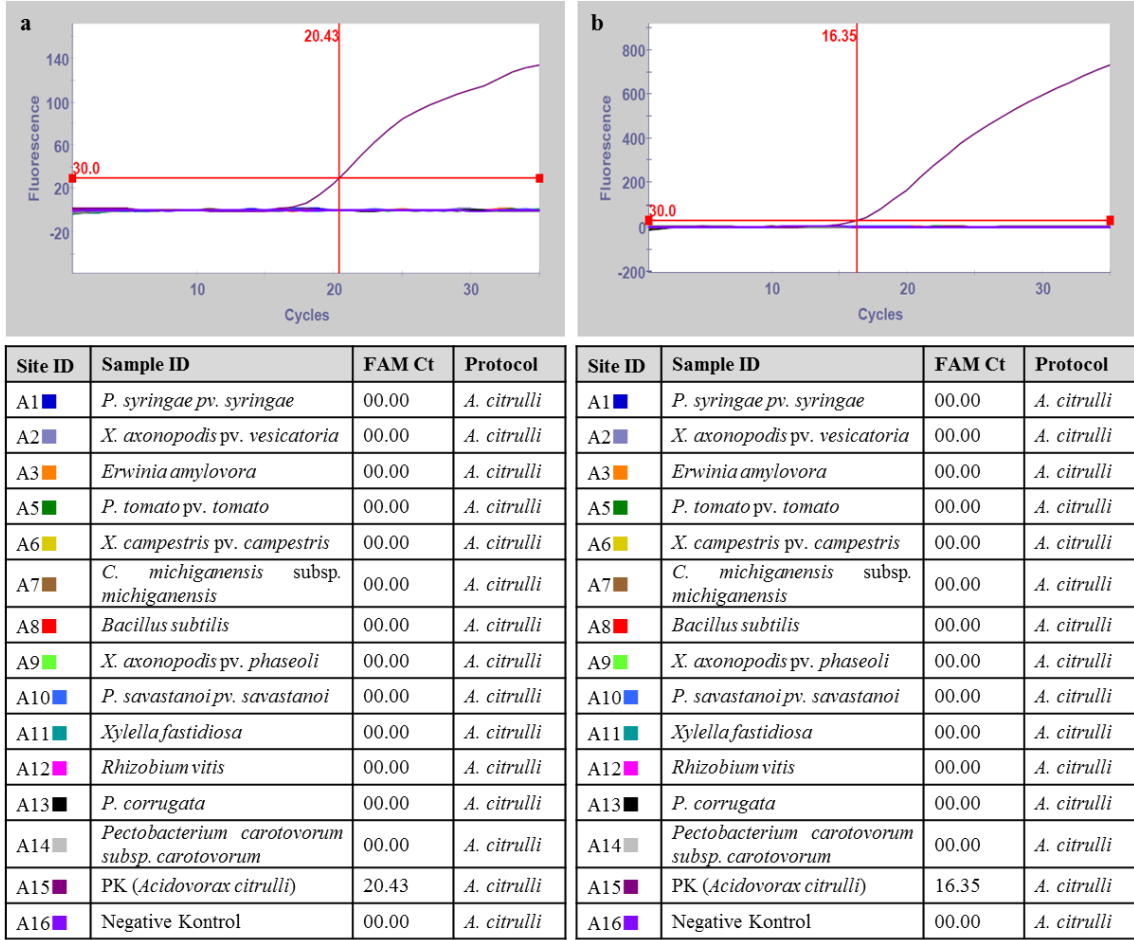
**Şekil 4.7.** Direkt bakteriyel hücredeki primer-prob setlerinin hassasiyetindeki bakteriyel seyreltmelerin (stok ila  $10^{-10}$ 'a kadar) NA besi ortamındaki gelişimi



**Şekil 4.8.** Direkt *Acidovorax citrulli* hücrelerinden (a) *hrpB2* geni primer-prob setine ait ve (b) ITS bölgesi primer-prob setine ait Real-Time PCR hassasiyet sonuçları

#### 4.6. Primerler ve Probun Seçiciliği

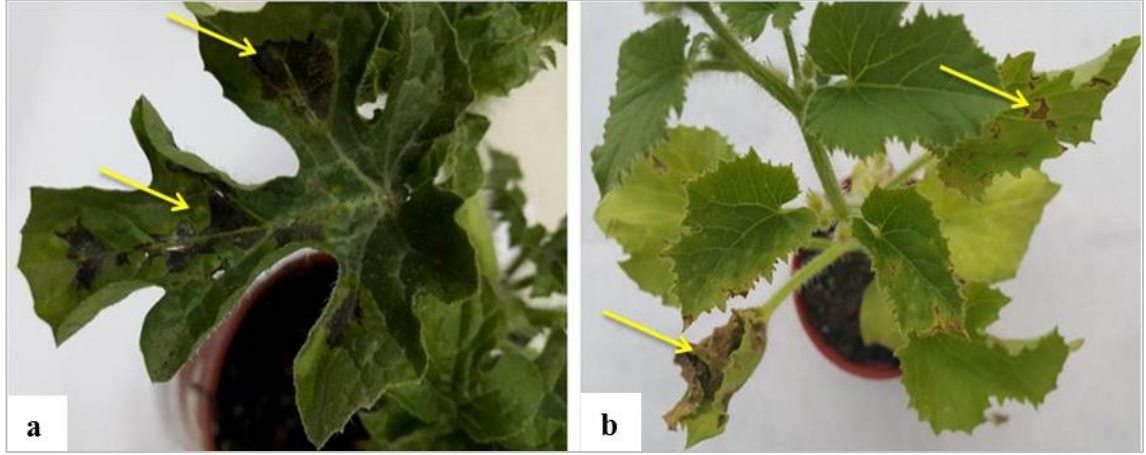
Karpuz Bakteriyel Leke hastalık etmeninin tanı ve tespiti için *hrpB2* geni ve ITS bölgesine göre tasarlanan primer-prob setlerinin seçiciliğini saptamak amacıyla, geliştirilen Real-Time PCR yöntemi *A. citrulli* (Çizelge 3.1) ve diğer bitki patojeni bakterilere (Çizelge 3.2) uygulanmıştır. Uygulama sonucunda *A. citrulli* için tasarlanan her iki primer-prob setleri sadece *A. citrulli* bakterisine spesifik olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.9).



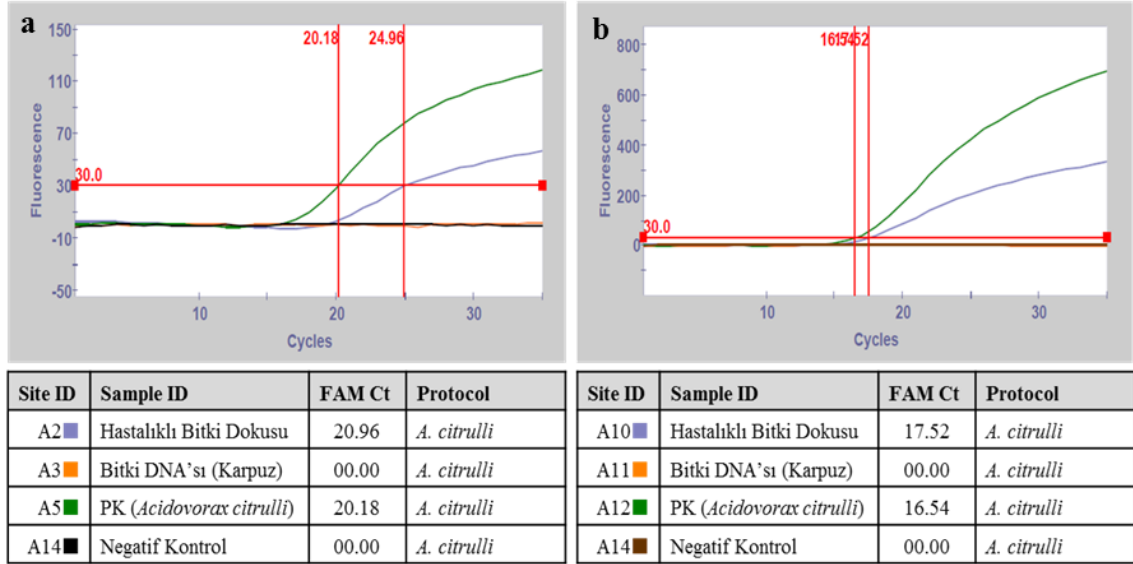
Şekil 4.9. *Acidovorax citrulli* strainlerinin (a) *hrpB2* geni primer-prob setine ve (b) ITS bölgesi primer-prob setine göre Real-Time PCR seçicilik sonuçları

#### 4.7. Real-Time PCR ile Hastalıklı Bitki Dokularından *Acidovorax citrulli*'nin Tespiti

Karpuz ve kavun yetiştiriciliğinde ürün ve kalite kayıplarına sebep olan *A. citrulli*'nin Real-Time PCR ile direkt hastalıklı bitki dokularından tespiti için enfekteli karpuz bitkisinin yapraklarındaki Şekil 4.10'daki sarı okla gösterilen nekrotik dokulardan alınan hastalıklı yaprak parçacıkları eppendorf tüpünde ezilerek elde edilen solüsyondan 2 µl alınarak Real-Time PCR işlemi gerçekleştirilmiştir. Çalışmada primer-prob setlerinin spesifikliğı için bitki DNA'da test edilmiştir (Şekil 4.11).



**Şekil 4.10.** (a) Karpuz ve (b) kavunda *Acidovorax citrulli*'nin oluşturduğu nekrotik simptomlar (Bu çalışmadan)

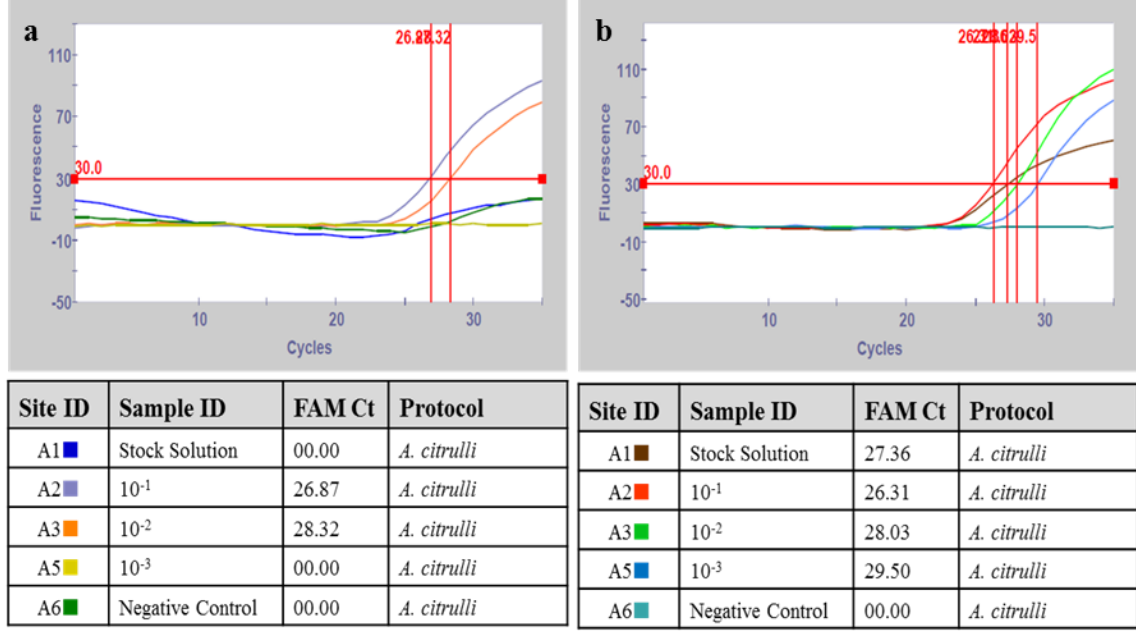


**Şekil 4.11.** *Acidovorax citrulli*'nin direkt hastalıklı bitki dokusundan (a) *hrpB2* geni primer-prob setine ve (b) ITS bölgesi primer-prob setine göre Real-Time PCR sonuçları

#### 4.8. Real-Time Bio-PCR

Real-Time PCR yöntemi ile hem canlı ve hem de ölü bakterilerin tespiti mümkün olabilmektedir. Bu nedenle bu çalışmada yalnız canlı *A. citrulli* popülasyonlarının tespitini gerçekleştirmek amacıyla Real-Time Bio-PCR işlemi gerçekleştirilmiştir. Stok,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  ve  $10^{-3}$  seviyeleri ile yapılan Real-Time Bio-PCR işlemi sonucunda patojenin her iki primer-prob seti ile tespiti yapılmıştır (Şekil 4.12).

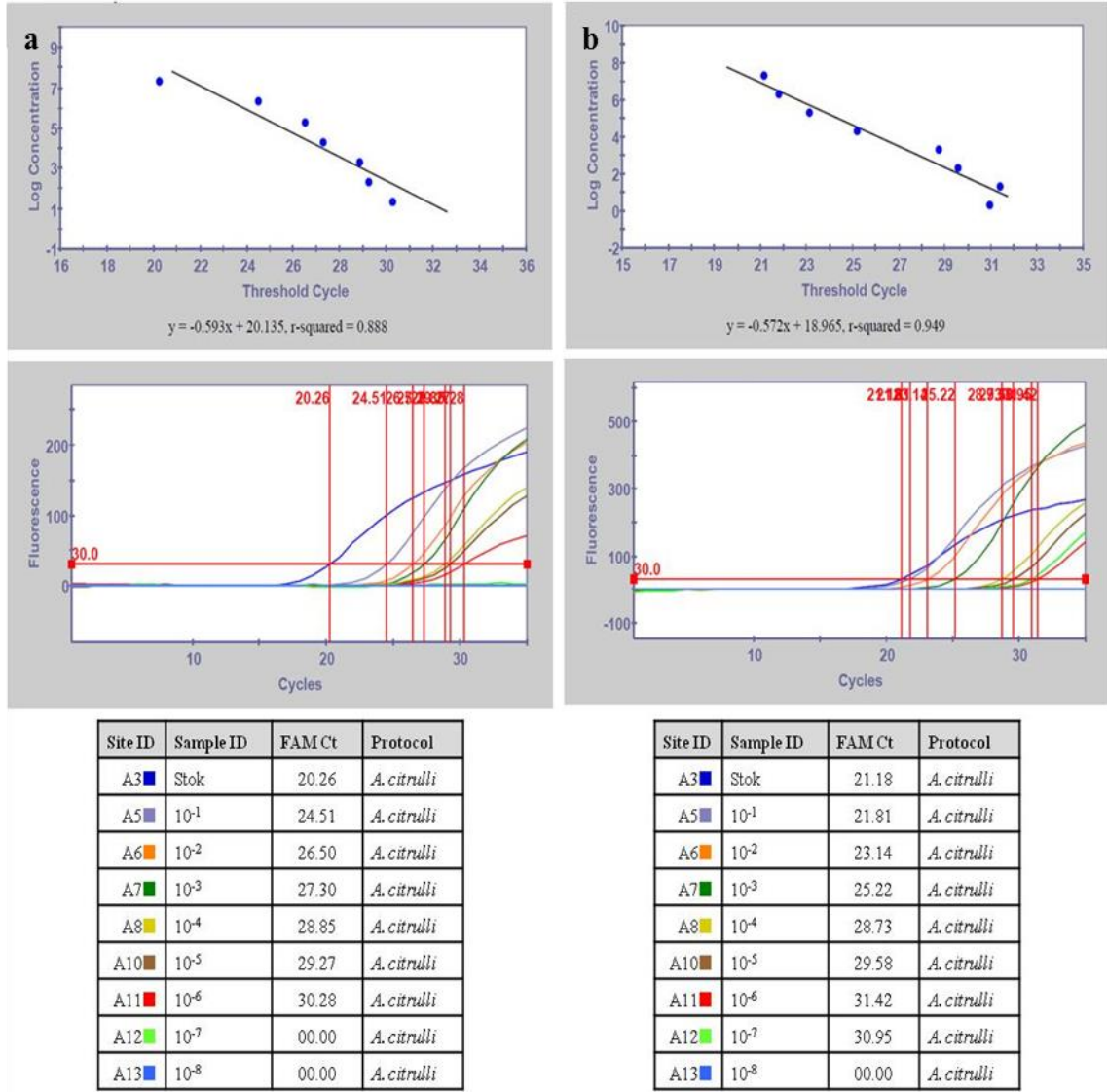




**Şekil 4.12.** *Acidovorax citrulli*'nin karpuz tohumlarından (a) *hrpB2* geni primer-prob setine ait ve (b) ITS bölgesi primer-prob setine ait Real-Time Bio-PCR sonuçları

#### 4.9. Kantitatif Real-Time PCR ve PCR Etkinliği

Erken dönemde bitki materyallerinde bulunan epifitik bakterilerin sayısının belirlenmesi için Kantitatif Real-Time PCR işlemi ile referans standart eğri oluşturulmuştur. Bunun için hazırlanan stok çözeltiden 10<sup>-1</sup>' den 10<sup>-10</sup>' a kadar 10' un katları şeklinde seyreltme yapılmıştır. Hazırlanan seyreltmeler NA besi ortamına yayılmış ve gelişen koloniler sayılmıştır. Sayım sonrası elde edilen veriler Kantitatif Real-Time PCR işlemi için programına kaydedilmiştir. Kantitatif Real-Time PCR işleminde oluşan amplifikasyon değerlerine bağlı olarak referans bir standart eğri oluşturulmuştur (Şekil. 4.13).



**Şekil 4.13.** *Acidovorax citrulli*'nin (a) *hrpB2* geni primer-prob setine ait ve (b) ITS bölgesi primer-prob setine ait Kantitatif Real-Time PCR için referans standart eğrinin oluşturulması

Eşik döngüsünün (Ct: threshold cycle) değerleri ile 10' nun katları şeklinde elde edilmiş bakteri konsantrasyonlarının (cfu/2 µl) logaritmik artışındaki güçlü doğrusal ilişkiler arasında oluşan yüksek korelasyon katsayıları ile elde edilen standart eğri sonucunda oluşan denklemdeki slope değeri kullanılarak her iki primer-prob seti için test edilmiş ve PCR etkinliği (E);  $E = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$  hesaplanmış Çizelge 4.2'de verilmiştir.

**Çizelge 4.2.** Kantitatif Real-Time PCR: Standart eğri ve PCR etkinliği

Strain	Locus	Regresyon Denklemi	<sup>a</sup> R <sup>2</sup>	<sup>b</sup> Slope	<sup>c</sup> Y = int	<sup>d</sup> PCR etkinliği (E) (%)
<i>A. citrulli</i>	<i>hrpB2</i>	$y = -0.593 + 20.135x$	0.888	-0.593	20.135	97.941
	ITS	$y = -0.572 + 18.965x$	0.949	-0.572	18.965	98.215

<sup>a</sup>R<sup>2</sup>, aynı ve farklı seri dilüsyonların teknik kopyaları arasında veri doğrusalığının bir ölçüsüdür; 1 en uygundur.

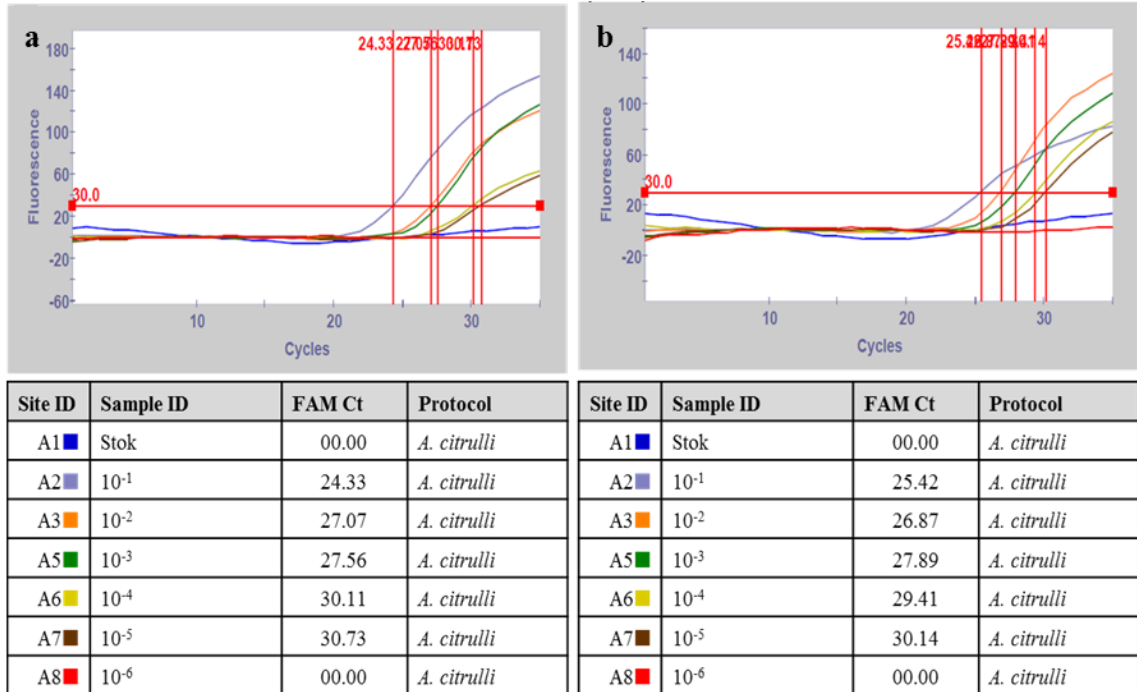
<sup>b</sup>Slope, Standart eğri için denklemin açısal katsayısıdır ( $y = mx + b$ ).

<sup>c</sup>Y = int, eğrinin y eksenini geçtiği Ct değerini temsil eder.

<sup>d</sup>E = PCR etkinliği, % 100 maksimum teorik değerdir, yani her döngüde moleküllerin mükemmel iki katına çıkması anlamına gelmektedir ( $E = 10^{(-1/\text{eğim})} - 1$ )

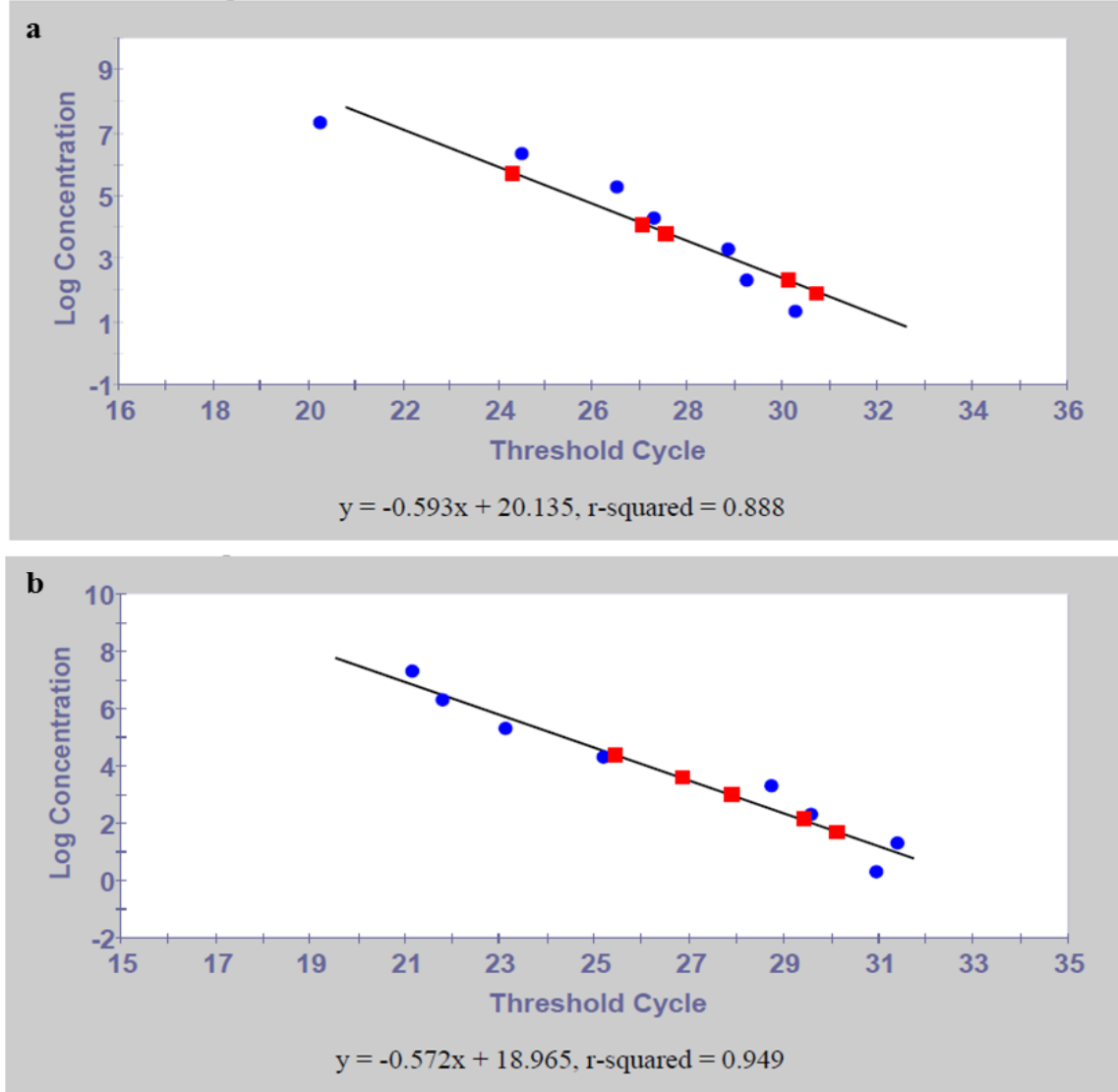
#### 4.10. *Acidovorax citrulli*'nin Tohum Hassasiyetinin Belirlenmesi ve Tohumdaki Popülasyon Yoğunluğunun Kantitatif Real-Time PCR ile Karşılaştırılması

*A. citrulli*'nin tohumdan tespiti için *in vitro* koşullarda yapay olarak bulaştırılan 100 adet karpuz tohumu kullanılarak elde edilen stok çözeltiden kantitatif sonuçlar ile karşılaştırma yapmak için en düşük seviye 10<sup>-6</sup>'ye kadar seyreltme solüsyonlar test edilmiştir (Şekil 4.14). Real-time PCR sonucunda elde edilen seyreltmelerin Ct değerleri ile Kantitatif Real-Time PCR sonucu elde edilen standart eğri karşılaştırılarak tohumdaki bakteriyel popülasyon miktarları belirlenmiştir. Her iki primer-prob setleri için oluşturulan regresyon eğrisi karşılaştırılmıştır.



**Şekil 4.14.** *Acidovorax citrulli*'nin tohumdan (a) *hrpB2* geni primer-prob setine ait ve (b) ITS bölgesi primer-prob setine ait Real-Time PCR hassasiyet sonuçları

Hastalık etmeni ile bulaşık karpuz tohumu Kantitatif Real-Time PCR' da test edilmiştir. Sonuçlar, referans verisi ile karşılaştırılarak tohumdaki *A. citrulli*'ye ait bakteriyel populasyon belirlenmiştir. Çalışmanın sonucunda, 100 tohumdan elde edilen süspansiyon her iki primer-prob seti ile karşılaştırılmıştır. Karşılaştırma sonucunda elde edilen Ct değerleri referans eğrideki standart aralığında yer almıştır. Şekil 4.15'teki egride mavi noktalar standart ve kırmızı noktalar örneği temsil etmektedir. Referans eğri ile tohum hassasiyet verileri karşılaştırılarak populasyon sayısı ve grafik elde edilmiştir. Bulaşık tohumdan yaklaşık  $8 \times 10^6$  (*hrpB2* primer-prob seti) ve  $5 \times 10^6$  (ITS primer-prob seti) bakteri tespit edilmiştir.



Data Type	Symbol
Unknown	■
Standard	●

**Şekil 4.15.** *Acidovorax citrulli*'nin tohumda (a) *hrpB2* geni primer-prob setine ait ve (b) ITS bölgesi primer-prob setine ait Kantitatif Real-Time PCR sonuçları

#### 4.11. Karpuz ve Kavun Çeşitlerinin *Acidovorax citrulli*'ye Karşı Duyarlılık Reaksiyonları

*A. citrulli*'ye karşı karpuz ve kavundaki duyarlılık reaksiyonlarının araştırılması için bitki materyalleri (tohum ve fide) bölgedeki üreticilerden temin edilerek duyarlılık reaksiyonunun araştırılması için uygun koşullarda yetiştirilerek geliştirilmiştir. Gelişen bitkilere en patojenik *A. citrulli* strainni içeren bakteri süspansiyonu hem sprey hemde enjeksiyon yoluyla inoküle edilmiştir. Hastalığın inkübasyon süresi sonucunda (10 gün) tüm farklı karpuz ve kavun çeşitlerinde kontrol bitkisi ölçek alınarak hastalık oluşumu gözlenmiştir. Bitkilerdeki hastalık oluşumu kotiledon yapraklar ve gerçek yapraklar baz alınarak bitkideki fizyolojik değişimler; 9 farklı değerden oluşan skala ölçeğine göre değerlendirilmiştir.

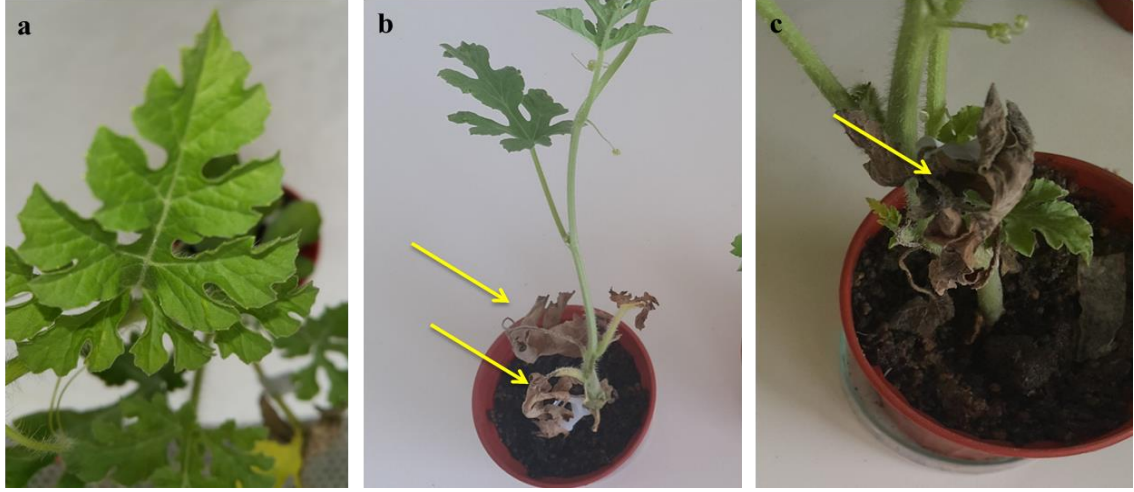
Karpuz çeşitlerindeki değerlendirme sonucunda 28 çeşit içerisinde Nostalji F1 ve Crimsonsweet çeşitlerinde simptomotolojik farklılık gözlenmiştir. Diğer karpuz çeşitlerinde kloroz oluşumu, kotiledon yapraklar ve gerçek yapraklardaki hastalık gelişimi yoğun (9. skala) bir şekilde belirlenmiştir (Şekil 4.16). Nostalji F1 ve Crimsonsweet çeşitlerinde kotiledon ve yapraklarda nekrotik lezyonlar ve kloroz >50% oranında (8. skala) gözlenmiştir (Şekil 4.17/18).

Kavun çeşitlerindeki değerlendirme sonucunda 31 çeşit içerisinde Baldo F1, Çıtirex ve adahan F1 çeşitlerinde simptomotolojik farklılık gözlenmiştir. Diğer kavun çeşitlerinde kloroz oluşumu, kotiledon yapraklar ve gerçek yapraklardaki hastalık gelişimi yoğun (9. skala) bir şekilde gözlenmiştir (Şekil 4.19). Baldo F1, Çıtirex ve Adahan F1 çeşidinde kotiledon ve yapraklarda büyük nekrotik lezyonlar >50% oranında (7. skala) belirlenmiştir. Kloroz oluşumu adahan çeşidinde baldo ve çıtirex çeşitlerine nazaran daha fazla oluşmuştur (Şekil 4.20/21/22).

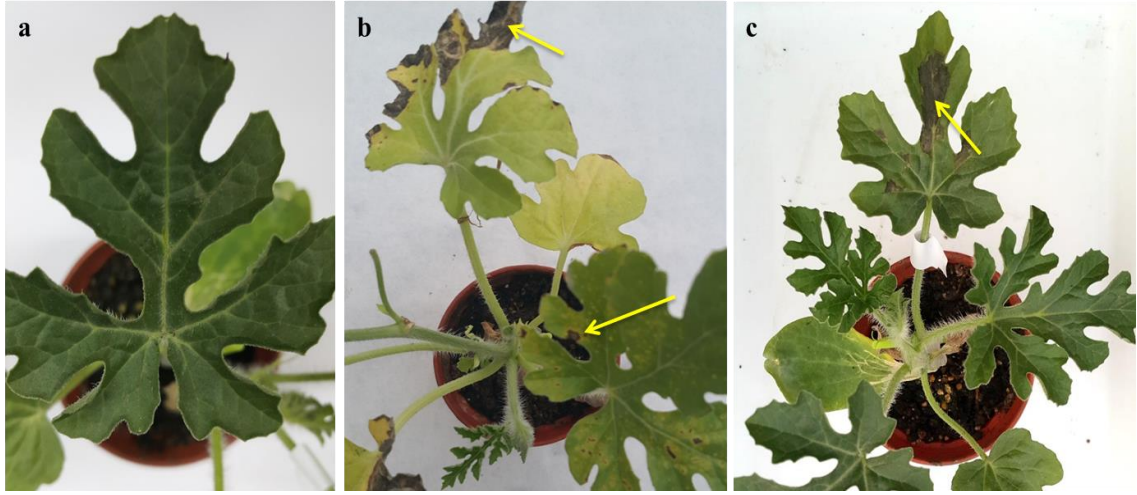
Bitkilerdeki hastalık oluşumunun kotiledon yapraklarda başlayıp gerçek ve yeni yaprakçıklara doğru ilerlediği saptanmıştır. Kullanılan skala ile inoküle edilen toplam 59 farklı karpuz ve kavun çeşidindeki simptom gözlemleri istatistiki olarak değerlendirilmiş ve Çizelge 4.3'de detaylandırılmıştır.

Çalışmada kullanılan farklı karpuz ve kavun çeşitlerinin hastalığa karşı gösterdiği duyarlılık reaksiyonları SPSS (Version 16.0) paket programları kullanılarak %5 önem seviyesinde ANOVA prosedürü uygulanarak Tukey ve Duncan çoklu karşılaştırma testleri uygulanarak çeşitlerin gösterdiği duyarlılık reaksiyonları belirlenmiştir. SPSS, p değerini (Sig.-Önem seviyesi) vermektedir. Eğer bu değer 0,05'ten küçükse  $H_0$  hipotezi reddedilir. Tukey testi ve Duncan testlerinde Sig. değeri >0.05 olarak elde edildiği için homojenlik testi için olan  $H_0$  hipotezi kabul edilmiştir. Yani %95 güvenli grupların varyansları homojendir ve istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Gruplar arasında önem seviyesinde bir farklılık varken grupların kendi içinde bir farklılık bulunmamıştır. Grupların arasındaki farklılığı incelediğimizde karpuz çeşitlerinden "Nostalji F1" ve "Crimsonsweet", kavun çeşitlerinden de "Baldo F1", "Çıtirex" ve "Adahan F1" diğer çeşitlere göre simptomotolojik oranlarda farklılık göstermiş olmasına rağmen hastalık oluşumunun yoğunluğu bitkideki duyarlılık için anlamlı bulunmamıştır (Çizelge 4.4; Çizelge 4.5).

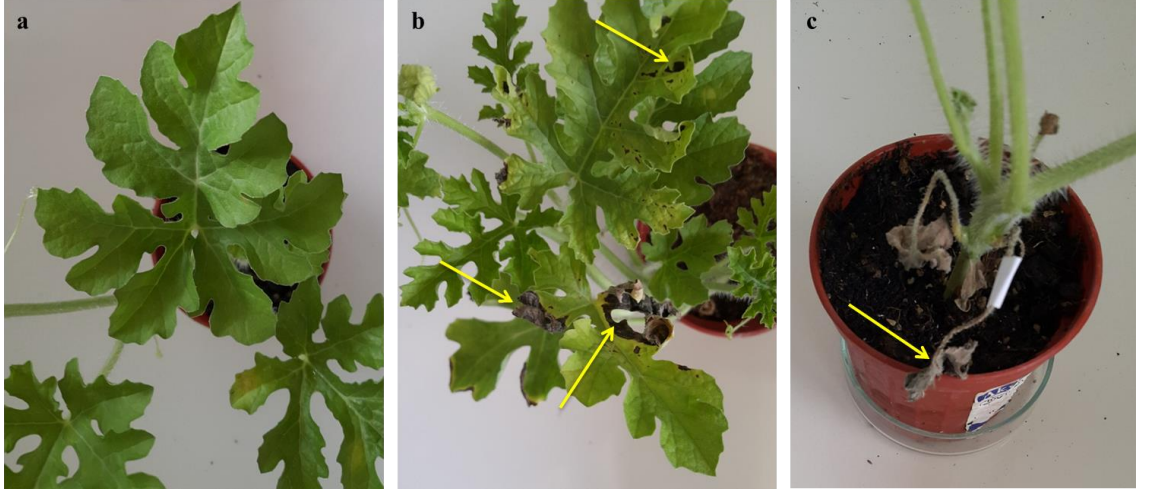
Bitki çeşit özelliklerinin etkisi ile bitkide hastalık değişik oranlarda olmuştur. Bitkilerdeki oluşan belirtiler hastalık etmeninin bitkide yayılmasında yeterli görülmüştür. Bu gözlem ayrıca bitkilere eş zamanlı yapılan enjeksiyon ile patojenin bitkiye inokülasyonu ile de desteklenmiştir. Bu sonuçlar değerlendirildiğinde bitkilerdeki duyarlılık reaksiyonu testi verilerine göre test edilen tüm bitkilerde dayanıklı çeşit tespit edilememiştir.



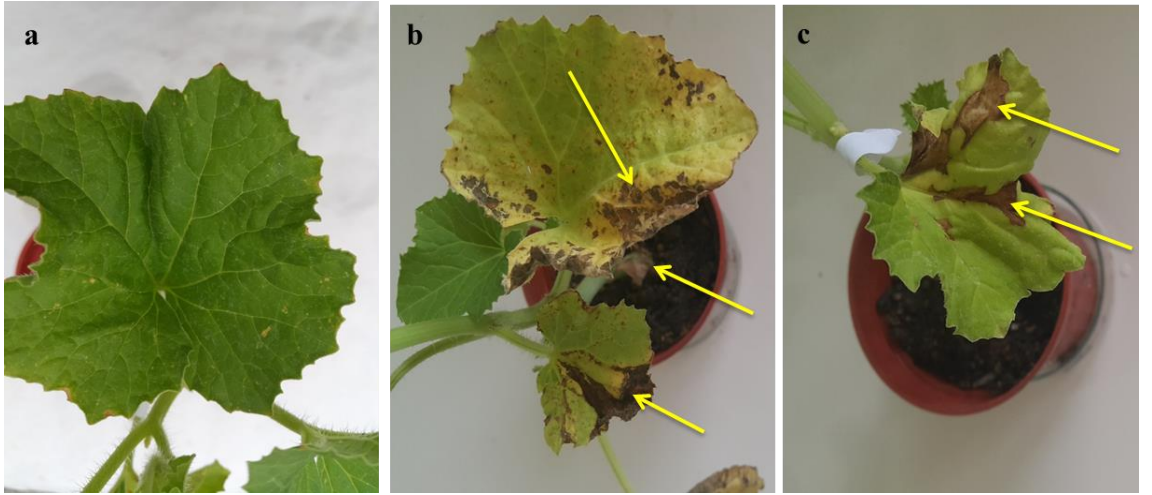
**Şekil 4.16.** *Acidovorax citrulli* ile test edilen karpuz bitkisinde (Elize F1) hastalık oluşumu (Skala ölçeği: 9) (a: Kontrol, b: Sprey uygulama c: Enjeksiyon uygulama)



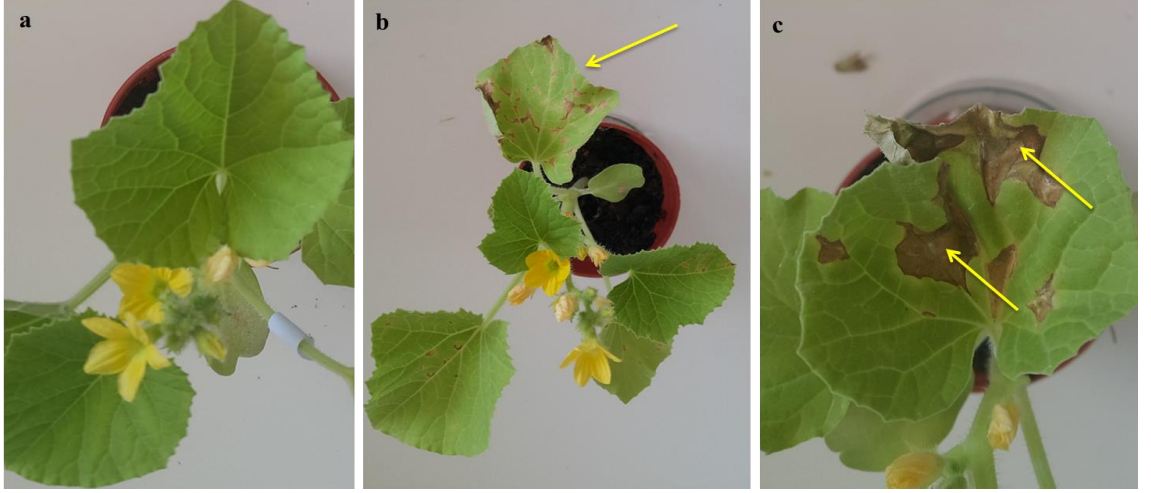
**Şekil 4.17.** *Acidovorax citrulli* ile test edilen Nostalji F1 çeşidinde oluşan nekrotik yaprak belirtileri (Skala ölçeği: 8) (a: Kontrol, b: Sprey uygulama c: Enjeksiyon uygulama)



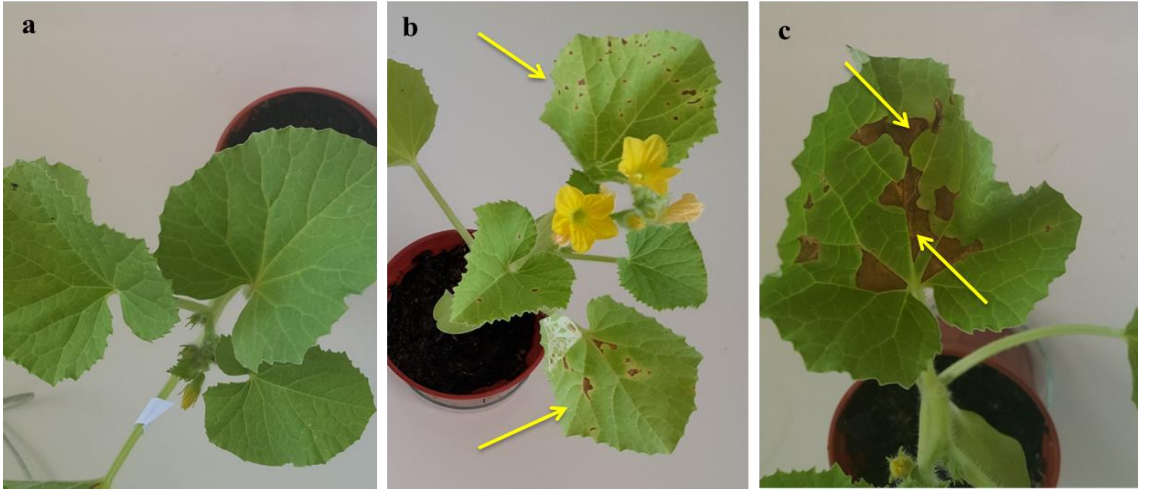
**Şekil 4.18.** *Acidovorax citrulli* ile test edilen Crimsonsweet karpuz çeşidinde oluşan nekrotik yaprak belirtileri (Skala ölçüğü: 8) (a: Kontrol, b: Sprey uygulama c: Enjeksiyon uygulama)



**Şekil 4.19.** *Acidovorax citrulli* ile test edilen kavun bitkisinde (Sinem F1) hastalık oluşumu (Skala ölçüğü: 9) (a: Kontrol, b: Sprey uygulama c: Enjeksiyon uygulama)

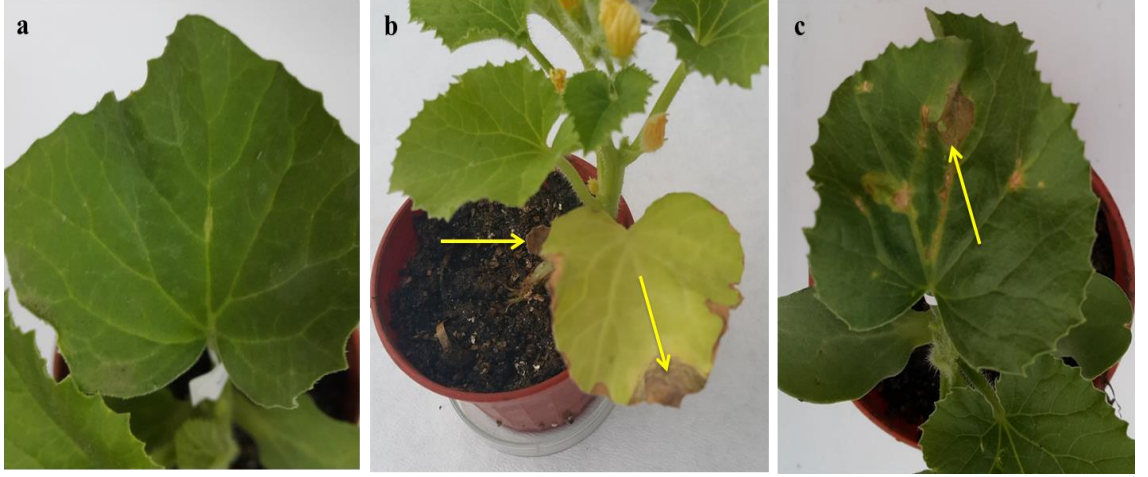


**Şekil 4.20.** *Acidovorax citrulli* ile test edilen Baldo F1 kavun çeşidinde oluşan nekrotik yaprak belirtileri (Skala ölçüğü: 7) (a: Kontrol, b: Sprey uygulama c: Enjeksiyon uygulama)



**Şekil 4.21.** *Acidovorax citrulli* ile test edilen Çıtırex kavun çeşidinde oluşan nekrotik yaprak belirtileri (Skala ölçüğü:7) (a: Kontrol, b: Sprey uygulama c: Enjeksiyon uygulama)





**Şekil 4.22.** *Acidovorax citrulli* ile test edilen Adahan F1 kavun çeşidinde oluşan nekrotik yaprak belirtileri (Skala ölçüğü:7) (a: Kontrol, b: Sprey uygulama c: Enjeksiyon uygulama)

**Çizelge 4.3.** Karpuz ve kavun çeşitlerinin *Acidovorax citrulli*'ye karşı duyarlılık reaksiyonlarının simptomolojik olarak değerlendirilmesi (Sprey uygulama)

Çeşit	Karpuz/ Kavun	Kotiledon-Nekrotik Lezyonlar				Kloroz Oluşumu				Gerçek Yapraklar-Nekrotik Lezyonlar					Nekrotik Lezyon Rengi
		Az	Orta	Yoğun	Yaprağın Tamamı	Az	Orta	Yoğun	Yeni Yapraklarda Oluşum	Az	Orta	Yoğun	Yaprağın Tamamı	Yeni Yapraklarda Oluşum	
Joker F1	Karpuz				+			+	+				+	+	Koyu kahverengi-siyaha yakın
Starbus F1	Karpuz				+			+	+				+	+	Koyu kahverengi-siyaha yakın
Celine F1	Karpuz				+			+	+				+	+	Koyu kahverengi-siyaha yakın
Üstün F1	Karpuz				+			+	+				+	+	Koyu kahverengi-siyaha yakın
Ohman F1	Karpuz				+			+	+				+	+	Koyu kahverengi
Usta F1	Karpuz				+			+	+				+	+	Koyu kahverengi
Nostalji F1	Karpuz				+			+	+			+	+	+	Koyu kahverengi-siyaha yakın
501 F1	Karpuz				+			+	+				+	+	Koyu kahverengi
Crimstar F1	Karpuz				+		+		+				+	+	Koyu kahverengi-siyaha yakın
Crimsontide	Karpuz			+				+	+				+	+	Koyu kahverengi-siyaha yakın
Odipus F1	Karpuz				+	+			+				+	+	Koyu kahverengi-siyaha yakın
Starburst F1	Karpuz				+			+	+				+	+	Koyu kahverengi

Çizelge 4.3.'nin Devamı

Çeşit	Karpuz/ Kavun	Kotiledon-Nekrotik Lezyonlar				Kloroz Oluşumu				Gerçek Yapraklar-Nekrotik Lezyonlar					Nekrotik Lezyon Rengi
		Az	Orta	Yoğun	Yaprağın Tamamı	Az	Orta	Yoğun	Yeni Yapraklarda Oluşum	Az	Orta	Yoğun	Yaprağın Tamamı	Yeni Yapraklarda Oluşum	
Empreror F1	Karpuz			+			+	+				+	+	Koyu kahverengi-siyaha yakın	
Karaoğlan F1	Karpuz				+		+	+				+	+	Koyu kahverengi	
Elize F1	Karpuz				+		+	+				+	+	Koyu kahverengi	
Leanca F1	Karpuz			+		+		+				+	+	Koyu kahverengi	
Crimstil F1	Karpuz				+		+	+				+	+	Koyu kahverengi	
Karain F1	Karpuz				+		+	+				+	+	Koyu kahverengi	
Crimsonsweet	Karpuz				+			+	+		+		+	Koyu kahverengi-siyaha yakın	
Ala F1 (Crimson Glory F1)	Karpuz				+		+	+				+	+	Koyu kahverengi	
Style F1	Karpuz				+		+	+				+	+	Koyu kahverengi-siyaha yakın	
Şahmaran F1	Karpuz			+				+	+			+	+	Koyu kahverengi-siyaha yakın	
Carayan F1	Karpuz				+			+	+			+	+	Koyu kahverengi	
Crisbye F1	Karpuz				+			+	+			+	+	Koyu kahverengi-siyaha yakın	

## Çizelge 4.3.'nin Devamı

Çeşit	Karpuz/ Kavun	Kotiledon-Nekrotik Lezyonlar				Kloroz Oluşumu				Gerçek Yapraklar-Nekrotik Lezyonlar					Nekrotik Lezyon Rengi
		Az	Orta	Yoğun	Yaprağın Tamamı	Az	Orta	Yoğun	Yeni Yapraklarda Oluşum	Az	Orta	Yoğun	Yaprağın Tamamı	Yeni Yapraklarda Oluşum	
Adana	Karpuz				+		+		+				+	+	Koyu kahverengi-siyaha yakın
Gazipaşa-kara karpuz	Karpuz				+			+	+				+	+	Koyu kahverengi-siyaha yakın
Lena	Karpuz				+		+		+				+	+	Koyu kahverengi-siyaha yakın
Bozbey	Karpuz				+			+	+				+	+	Koyu kahverengi-siyaha yakın
Alibey F1	Kavun				+	+			+				+	+	Kahverengi
Balhan F1	Kavun				+			+	+				+	+	Kahverengi
Anka F1	Kavun		+					+	+				+	+	Kahverengi
Balözü F1	Kavun				+			+	+			+		+	Kahverengi
Adahan F1	Kavun				+			+	+		+			+	Kahverengi
Davutbey F1	Kavun				+	+			+			+		+	Kahverengi
Dardanos F1	Kavun				+		+		+			+	+	+	Kahverengi
Karna F1	Kavun				+			+	+			+		+	Kahverengi

Çizelge 4.3.'nin Devamı

Çeşit	Karpuz/ Kavun	Kotiledon-Nekrotik Lezyonlar				Kloroz Oluşumu				Gerçek Yapraklar-Nekrotik Lezyonlar					Nekrotik Lezyon Rengi
		Az	Orta	Yoğun	Yaprağın Tamamı	Az	Orta	Yoğun	Yeni Yapraklarda Oluşum	Az	Orta	Yoğun	Yaprağın Tamamı	Yeni Yapraklarda Oluşum	
Sinem F1	Kavun				+			+	+			+		+	Kahverengi
Hacıbey F1	Kavun				+			+	+			+	+		Kahverengi
Sigal F1	Kavun			+				+	+			+		+	Kahverengi
MGH78	Kavun				+		+		+			+	+		Kahverengi
Zümra F1	Kavun			+				+	+			+		+	Kahverengi
Konak F1	Kavun				+		+		+			+		+	Kahverengi
Melita F1	Kavun				+			+	+			+	+		Kahverengi
Napolyon F1	Kavun				+			+	+			+		+	Kahverengi
Kırkağaç	Kavun				+			+	+			+	+		Kahverengi
Ankara	Kavun			+				+	+			+		+	Kahverengi
Adana	Kavun				+			+	+			+	+		Kahverengi
Gazipaşa- dilimli	Kavun				+			+	+			+		+	Kahverengi

Çizelge 4.3.'nin Devamı

Çeşit	Karpuz/ Kavun	Kotiledon-Nekrotik Lezyonlar				Kloroz Oluşumu				Gerçek Yapraklar-Nekrotik Lezyonlar					Nekrotik Lezyon Rengi
		Az	Orta	Yoğun	Yaprağın Tamamı	Az	Orta	Yoğun	Yeni Yapraklarda Oluşum	Az	Orta	Yoğun	Yaprağın Tamamı	Yeni Yapraklarda Oluşum	
Çamlıca	Kavun				+			+	+				+	+	Kahverengi
Gladron- Gazipaşa	Kavun	+						+	+				+	+	Kahverengi
Eskişehir	Kavun			+				+	+			+		+	Kahverengi
Zorbey	Kavun		+				+		+			+		+	Kahverengi
Buğra F1	Kavun	+						+	+				+	+	Kahverengi
Şükrübey F1	Kavun	+						+	+			+		+	Kahverengi
Çitirex	Kavun	+				+			+		+			+	Kahverengi
Baldo F1	Kavun	+					+		+		+			+	Kahverengi
Özbey	Kavun		+					+	+				+	+	Kahverengi
İshakbey F1	Kavun			+				+	+				+	+	Kahverengi
Payam F1	Kavun			+				+	+				+	+	Kahverengi

**Çizelge 4.4.** Çalışmada yer alan karpuz çeşitlerinin *Acidovorax citrulli*'ye karşı duyarlılıkları (Sprey uygulama)

Çeşit	<sup>a</sup> Skala Ölçeği (1-9)	<sup>b</sup> Tukey Önem Seviyesi	<sup>c</sup> Duncan Önem Seviyesi	Hastalıklı/Dayanıklı
Lena	9.00a	<b>1.00</b>	<b>0,762</b>	Hastalıklı
Gazipaşa-karakarpuz	9.00a			Hastalıklı
Adana	9.00a			Hastalıklı
Şahmaran F1	9.00a			Hastalıklı
Style F1	9.00a			Hastalıklı
Ala F1(Crimson Glory F1)	9.00a			Hastalıklı
Crimstil F1	9.00a			Hastalıklı
Leanca F1	9.00a			Hastalıklı
Karaoğlan F1	9.00a			Hastalıklı
Starburst F1	9.00a			Hastalıklı
Crimstar F1	9.00a			Hastalıklı
Ohman F1	9.00a			Hastalıklı
Usta F1	9.00a			Hastalıklı
Bozbey	8.95a			Hastalıklı
Crisbye F1	8.95a			Hastalıklı
Carayan F1	8.95a			Hastalıklı
Odipus F1	8.95a			Hastalıklı
Crimsontide	8.95a			Hastalıklı
501 F1	8.95a			Hastalıklı
Elize F1	8.85a			Hastalıklı
Celine F1	8.85a	Hastalıklı		
Joker F1	8.85a	Hastalıklı		
Karain F1	8.80a	Hastalıklı		
Starbus F1	8.80a	Hastalıklı		
Empreror F1	8.70a	Hastalıklı		
Üstün F1	8.70a	Hastalıklı		
Nostalji F1	7.90b	<b>0,978</b>	<b>0,132</b>	Hastalıklı
Crimsonsweet	7.85b			Hastalıklı

<sup>a</sup> Skala ölçeği (1-9)'deki derecelendirme materyal-metot kısmında detaylı verilmiştir.

<sup>b,c</sup>Sig. değeri >0.05

**Çizelge 4.5.** Çalışmada yer alan kavun çeşitlerinin *Acidovorax citrulli*'ye karşı duyarlılıkları (Sprey uygulama)

Çeşit	<sup>a</sup> Skala Değeri (1-9)	<sup>b</sup> Tukey Önem seviyesi	<sup>c</sup> Duncan Önem seviyesi	Hastalıklı/Dayanıklı
Sinem F1	9.00a	<b>1.00</b>	<b>0,400</b>	Hastalıklı
Napolyon F1	9.00a			Hastalıklı
Kırkağaç	9.00a			Hastalıklı
Çamlıca	9.00a			Hastalıklı
Gladron-Gazipaşa	9.00a			Hastalıklı
Buğra F1	9.00a			Hastalıklı
Zorbey	8.95a			Hastalıklı
Hacıbey F1	8.95a			Hastalıklı
Özbey	8.95a			Hastalıklı
İshakbey F1	8.90a			Hastalıklı
Payam F1	8.90a			Hastalıklı
Alibey F1	8.85a			Hastalıklı
Dardanos F1	8.85a			Hastalıklı
MGH78	8.85a			Hastalıklı
Melita F1	8.85a			Hastalıklı
Ankara	8.80a			Hastalıklı
Adana	8.80a			Hastalıklı
Şükrübey F1	7.95b	<b>1.00</b>	<b>0,399</b>	Hastalıklı
Davutbey F1	7.95b			Hastalıklı
Sigal F1	7.90b			Hastalıklı
Eskişehir	7.90b			Hastalıklı
Balhan F1	7.85b			Hastalıklı
Konak F1	7.80b			Hastalıklı
Balözü F1	7.80b			Hastalıklı
Karna F1	7.80b			Hastalıklı
Gazipaşa-dilimli	7.80b			Hastalıklı
Anka F1	7.75b			Hastalıklı
Zümra F1	7.75b			Hastalıklı
Çıtirex	6.90c			<b>1.00</b>
Adahan F1	6.85c	Hastalıklı		
Baldo F1	6.75c	Hastalıklı		

<sup>a</sup> Skala değeri (1-9)'deki derecelendirme materyal-metot kısmında detaylı verilmiştir.

<sup>b,c</sup> Sig. değeri >0.05



## 5. TARTIŞMA

ABD'de 1980'lerin sonlarında karpuz bakteriyel leke hastalığının yıkıcı etkisinden sonra hastalık, Brezilya, Kosta Rika, Nikaragua, Avustralya, Tayvan, Çin, İsrail, Japonya ve Türkiye de dahil olmak üzere dünyanın farklı bölgelerinde ekonomik açıdan sorun olabilecek düzeyde etki ederek yayılmıştır (Isakeit vd. 1997; Langston vd. 1999; Martin ve O'Brien, 1999; O'Brien ve Martin, 1999; Schaad vd. 2003; Walcott vd. 2003; Burdman vd. 2005). *Acidovorax citrulli*, dünya çapında ekonomik olarak önemli olan bir fidelik ürünüdür. Son yıllarda sağlanan ilerlemelere rağmen, tohum sağlık testi ile tohum tedavilerinde patojene karşı etkin yöntemlerin olmamasından kaynaklanan kayıpları minimize etmekte sınırlı kalmaktadır. Ekonomik açıdan önemli olmasına rağmen, *A. citrulli* ekolojisinin temel yönleri yeterince anlaşılmamıştır. Çok spesifik tohum kökenli bir bakteri olan *A. citrulli* depolama koşulları (4 °C ve % 50 bağıl nem) süresince en az 7 yıl boyunca kavun (*Citrullus lanatus* var. *citroides*) tohumlarıyla ilişkili olarak hayatta kalabildiği saptanmıştır (Dutta vd. 2014). Karpuz ve kavun tohumlarının düşük sıcaklıkta (5 °C veya altı) saklanması da, *A. citrulli*'nin tohumda canlı kalmasına neden olmuştur (Block ve Shepherd, 2015). *A. citrulli*'nin tarlada hayatta kalması için bir başka strateji de mevsimler arasında konakçı olmayan veya gönüllü bitkilerle olduğu çeşitli çalışmalarda potansiyel alternatif konakçıları araştırmalarda kullanılarak saptanmıştır (Nascimento vd. 2004). Bu nedenlerle etmenler ile mücadelede başarılı olabilmek için hastalık etmenlerinin hızlı, güvenilir ve erken dönemde tanı ve tespitlerinin yapılması gereklidir. Günümüze kadar patojenlerin tanısı ve tespiti için pek çok yöntem geliştirilmiştir. Bunlar arasında seçici ve yarı seçici besi ortamı kullanımı, çeşitli serolojik testler geliştirilmiştir. Ancak bu testlerin oldukça uzun zaman alması ve bazı durumlarda kesin sonuç vermemesi sebebiyle nükleik asit temelli yöntemler daha hızlı ve güvenilir olmasından dolayı tercih edilmektedir.

Son yıllarda, birçok PCR bazlı tohum sağlığı tahlili geliştirilmiştir (Feng vd. 2013). Tohum bileşiklerinin içeriği, yanlış negatif sonuçlara yol açabildiğinden ve PCR'ı inhibe edebildiğinden, DNA saflaştırma ve hedef organizmaların (BIO-PCR) seçici olarak zenginleştirilmesi (Schaad vd. 1995) ve immünomagnetik ayrılma ve PCR (IMS-PCR) (Walcott ve Gitaitis, 2000) dahil olmak üzere birçok PCR öncesi yöntem geliştirilmiştir. Duyarlılık, zaman ve harcama bu yöntemler arasında değişir ve hedef bir patojenin saptanması için başarılı bir PCR stratejisi geliştirilirken dikkate alınması gereken önemli faktörlerdir. Organizmalar ile ilgili en kesin ve doğru bilgiler nükleik asitlerde yer almaktadır. Bu nedenle hastalık etmenlerinin tanı ve tespitleri için kullanılan diğer metotlara oranla nükleik asit temelli yöntemlerin kullanımı daha güvenilir ve kesin sonuçlar vermektedir. Real-Time PCR (RT-PCR) yöntemi, nükleik asit amplifikasyonu ile eş zamanlı artış gösteren floresan sinyalin ölçülmesine dayanan ve oldukça kısa sürede sonuç veren bir PCR yöntemidir. Real-Time PCR yönteminde sonuçlar klasik PCR yöntemlerine oranla oldukça kısa sürelerde (20-30 dakika) ve kantitatif olarak elde edilebilmektedir. Real-Time PCR yönteminde klasik PCR metoduna nazaran daha az miktarda (1-2 µl) DNA kullanılarak daha hassas ve doğru sonuçlar elde edilebilmektedir. Real-Time PCR yönteminde tüm işlem kapalı bir PCR tüpü içerisinde ve tek seferde gerçekleştiği için bulaşma riski, klasik PCR metoduna göre çok daha düşüktür. Ayrıca Real-Time PCR sisteminde tüm PCR aşamaları bir bilgisayar ekranı aracılığı ile kontrol edilebilmekte ve işlem istenildiğinde durdurulabilmektedir. Real-Time PCR yönteminin

klasik PCR yöntemine göre bir diğer üstünlüğü de kantitatif sonuçların daha güvenilir şekilde elde edilmesine imkan vermesidir.

PCR tabanlı teşhis yöntemleri, türe özgü primerler gerektirir ve *A. citrulli* için, alt-maddelere özgü primerler gereklidir. Özel oligonükleotid primerleri, farklı DNA sekanslarına dayalı olarak tasarlanabilmektedir. Bu amaç için kullanılan en yaygın diziler arasında 16S rDNA ve 16S-23S dahili transkripsiyonlu aralayıcı bölge (ITS) bulunmaktadır (Louws vd. 1999). Bu çalışmada ITS bölgesi ile birlikte hastalık oluşturma ve aşırı duyarlılık oluşturmada sorumlu olan *hrp* gen salkımında *hrpB2* geni kullanılarak çift tekerrür sağlayan tanılama ve tespit yapılmıştır.

*A. citrulli* etmeninin tanı ve tespitinde kullanılan 30-35 döngülük klasik PCR yöntemleri ortalama 2-4 saat arasında ve birkaç gün süre alırken Real-Time PCR yöntemi ile minimum 14 dakika ve maksimum 25 dakikada (solüsyon yoğunluğundan ve bitki materyalindeki bileşiklerden dolayı tanı ve tespit süresi farklılık gösterebilmekte) tamamlanmaktadır. Ayrıca Real-Time PCR sistemi bilgisayar ile beraber kontrol edilerek işlemin istenildiğinde sonlandırılmasına ve sonuçların eş zamanlı saptanmasına olanak vermektedir.

Çalışmada Real-Time PCR analizlerinde kullanılan Smart Cycler II cihazı diğer Real-Time PCR cihazlarından farklı olarak analizlerin hem laboratuvar hem de arazi koşullarında yapılabilmesine olanak sunmaktadır. Ayrıca, her örnek için ayrı PCR programında örnekleri analiz etme ve sonuçlanan örneğin yerine tekrar başka bir örneğin test edilebilmesi gibi oldukça önemli özellikler taşımaktadır. Bu özellikler bakteriyel patojenlerin, tohumdan, sağlıklı ve hastalıklı bitki materyalinden ve saf bakteriyel hücreden direkt tanı ve tespit analizlerinin hem laboratuvar hem de arazi koşullarında yapılabilmesine ve kısa sürede kesin, güvenilir ve tekrarlanabilir sonuçlar vermesine olanak sağlamaktadır.

Real-Time PCR metoduyla patojenlerin tanı ve tespitleri iki şekilde yapılmaktadır. Bunlardan birincisi; DNA'ya spesifik olmayan ve DNA sarmalı arasına bağlanarak ışığa veren Syber Green adı verilen boyalarla yapılmaktadır. İkinci yöntem ise; DNA'ya spesifik olan prolarla (Taqman, Moleküler Beacon, Scorpion vb.) yapılmaktadır. Bu çalışmada patojenlerin tanı ve tespitleri için hedef DNA dizisine spesifik LNA prob sistemi kullanılmıştır. Real-Time PCR işlemi için DNA'ya spesifik olmayan floresan boyaların kullanılması durumunda yanlış bağlanmalardan dolayı bazen tutarsız sonuçlar elde edilmesi, yeterli teknik bilgi ve iyi yetişmiş eleman ihtiyacı duyması dezavantajları arasında sayılabilir. Real-Time PCR yönteminin kolaylığı, tanı ve tespitlerin hızlı, güvenilir ve hassas şekilde gerçekleştirilebilmesi, direkt bitkisel materyallerden tespit yapılabilmesi, bitki patojeni bakterilerin tanı ve tespitlerini gerçekleştirmek amacıyla son yıllarda yöntemin kullanımının yaygınlaşmasında önemli rol oynamaktadır. Real-Time PCR ile günümüze kadar farklı bitki patojeni bakterilerin tanı ve tespitleriyle ilgili çalışmalar tamamlanmıştır (Freeman vd. 1999; Weller vd. 2000; Basım ve Basım 2004; Basım ve Yılmaz 2005; Basım ve Basım 2007; Benlioğlu ve Özyılmaz 2007; Bellis vd. 2007; Luo vd. 2008 Basım ve Basım 2009, Çaplık ve Basım 2009; Gottsberger 2010, Bozan ve Basım 2011, Öztürk ve Basım 2011, Licciardello vd 2011, Cottyn vd 2011, Johnson ve Walcott 2012, Gallelli vd 2014; Aktaş ve Basım 2017; Abdullahi vd. 2017).

Patojenlerle mücadelede erken dönemde yapılan doğru, güvenilir ve hassas tanı ve tespit büyük önem arz etmektedir. Bu nedenle, bu çalışmada *A. citrulli*'nin tohumdan, bakteriyel hücreden, hastalıklı bitki dokularından direkt tanı ve tespitlerini gerçekleştirmek için Real-Time PCR yöntemi geliştirilmiştir. Kantitatif Real-Time PCR ile standart regresyon eğrisi elde edilerek bitki materyallerindeki popülasyon yoğunluğu belirlenmiştir. Kantitatif Real-Time PCR yönteminin PCR etkinliği hesaplanmış ve yüksek oranda etkin olduğu saptanmıştır. Çalışmada hastalık etmenine karşı duyarlılık reaksiyonunun belirlenmesi için en popüler karpuz ve kavun çeşitleri ayrıca bazı yerli çeşitler test edilmiştir.

*A.avenae* türleri ile *A.avenae* subsp. *citrulli*'nin tespiti için yapılan çalışmada 16S-23S rDNA'nın intergenik aralayıcı bölgesinin dizisi kullanılmıştır. Bu bölgeye spesifik klasik primerleri ve Real-Time PCR primerleri ve problemleri tasarlanmıştır. Real-Time PCR primerleri Aacf3/Aacr2 ve prob AaP2 sadece *A.avenae* subsp. *citrulli*'de spesifik olduğu diğer türlerde amplifikasyon gerçekleştirmediği saptanmıştır (Song vd. 2003). *A.citrulli*'nin tohumdan tespiti için magnetik çekim-hibridizasyon PCR (MCH-PCR) yönteminde biyotinlenmiş hibritleşme yakalama sistemi bir streptavidin bağlantısı bir manyetik boncuk ile hibridizasyon gerçekleştirilmiştir. MCH Real-Time PCR yöntemi için BOX fragmentine göre 480 bp bölgeyi çoğaltan BOXAACF/BOXAACR2 primer seti ve 26 bazdan oluşan AACPROBE probe geliştirilmiştir. En düşük hücre konsantrasyonu  $10^5$  cfu/ml<sup>-1</sup> belirlenmiştir (Feng vd. 2006; Amagliani vd. 2006; Zhao vd. 2009). Benzer bir çalışmada ITS bölgesine göre 448 bp bölgeyi çoğaltan HuiF/HuiR primerleri ve 26 bazdan oluşan HuiP probe (TAMRA) geliştirilmiştir (Hui vd. 2007). *A.avenae* subsp. *citrulli*'nin YD-tekrarlı protein genine dayalı Real-Time PCR yöntemde SYBR Green kullanılmış ve reaksiyon başına 5x100 fg/μl'lik saflaştırılmış genomik DNA veya reaksiyon başına 6.5 koloni oluşturan birim kullanılmıştır (Cho vd. 2015). *A.citrulli*'nin tespiti için yapılan bir diğer çalışmada, primerler ve TaqMan probu *A.citrulli* genomu (Aave\_1909, Gene ID: 4669443) kullanmışlardır. Bu testin tespit eşliğini, ml (cfu/ml) başına  $10^3$  koloni olarak saptamışlardır (Tian vd. 2016). *A.citrulli* için TaqMan probu temelli izotermal PCR (TiiPCR) testinde spesifik primerler ve problemleri, her reaksiyon tüpünde 10 bakteri hücresi kullanılmıştır (Wu vd. 2016). *A.citrulli*'nin kabakgıl tohumları üzerinde rutin olarak tespit edilmesinde kullanılacak bir qPCR analizinde kullanılmak üzere uygun olan 98 bp'lik bir fragmanı çevreleyen bir primer seti tasarlanmıştır (Silva 2016). Bu çalışmada ise 8 bp uzunluğunda daha kısa ve daha spesifik olan LNA prob kullanılmıştır. Çalışmamızda geliştirilen Real-Time PCR yöntemi ile *A.citrulli*'nin minimum 14 dakika gibi kısa sürede tespit ve tanısı yapılmıştır. Real-Time PCR yöntemi ile *A.citrulli*'nin tanısında kullanılan her iki primer-prob setlerinde 88 bp'lik bölge çoğaltılmıştır. Bu da daha kısa sürede sonuç elde etmemizi sağlamakta yani çoğaltılan DNA bölgesi daha kısa sürede amplifiye olarak döngü süresi kısalmaktadır. Bu da patojenin daha erken dönemde teşhisi ve daha erken mücadele yöntemlerinin uygulanması bakımından önem taşımaktadır. Patojenlerin tespiti ve tanısında kullanılan diğer yöntemler ele alındığında, çalışmada kullanılan Real-Time PCR yöntemi daha hassastır ve zamandan tasarruf sağlamaktadır. Diğer tanı ve tespit yöntemlerinde kullanılan bakteri yoğunluğu genellikle daha yüksek olmasına rağmen bu çalışmada, geliştirmiş olduğumuz Real-Time PCR yönteminde primer-prob setlerinin hassasiyet sınırı direkt bakteri yoğunluğunda 2 cfu/ml, bakteri DNA'sında 12 fg olarak bulunmuştur. Böylece patojenin tanısı başarılı bir şekilde gerçekleşmiştir. *A.citrulli*'nin tanı ve tespitleri için elde edilen Real-Time PCR sonuçlarıyla, daha önce farklı bitki

patojeni bakterilerin tanı ve tespitleri için elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında, bu çalışmada geliştirilen yöntem ile patojenlerin tespitindeki primer-prob setlerinin hassasiyet limitlerinin oldukça düşük olduğu belirlenmiş ve sonuçların hem çok hızlı hem de güvenilir ve yüksek etkinlikte olduğu ortaya konulmuştur. Çalışmada kullanılan bir diğer yöntem Kantitatif Real-Time PCR'dır. Bu yöntemle *A. citrulli*'nin karpuz ve kavun tohumu üzerinde bulunan ve yeni enfeksiyonlar için inokulum kaynağı olan popülasyon yoyunluğunun sayısal verilerinin elde edilmesi üzerinde çalışılmıştır. Real-Time PCR'a kantitatif değerler eklenerek oluşturulan standart eğri sonucunda bakteriyel popülasyon miktarını sayısal olarak ortaya koymamızı sağlayabilmektedir. Bu doğrultuda geliştirilen Kantitatif Real-Time PCR yöntemi (Licciardello vd. 2011; Gallelli vd. 2014; Forootana vd. 2017) ile yetiştiricilik alanına aktarılmadan önce üretim materyallerinde çoklu tarama sonucunda bakteriyel popülasyonun sayısal miktarının belirlenmesi ile hastalık etmenlerinin oluşturacağı ekonomik kayıpların azaltılmasına ve hastalık etmenlerinin bitki materyaliyle bir sonraki dönemlere aktarılmasının önüne geçilebilecektir.

*A. citrulli*, enfekteli tohumlar yoluyla belirli bir bölgeye yayılabilmekte (Assis vd. 1999) ve sağlıklı tohum ekimi hastalığın kontrolü için önerilen birincil önlem olmaktadır (Latin ve Hopkins 1995). Karpuz Bakteriyel Meyve Lekesi mücadelesinde, gerekmedikçe, tohumluk üretim alanlarının tohum tarla denetimi ve sertifikasyonu, tohum sağlığı testi, fide denetimi ve profilaktik bakır bazlı yönetim yoluyla izole edilen tohumların üretimi yoluyla birincil inokulumu hariç tutmayı amaçlayan entegre bir yaklaşımı mevcuttur. *A. citrulli*'ye karşı mücadelede, Karpuz Bakteriyel Meyve Lekesi salgınları dünya çapında periyodik olarak devam etmektedir. Daha etkin bir entegre hastalık yönetimi stratejisi geliştirmek için, meyve ve tohum üretim ortamlarında Karpuz Bakteriyel Meyve Lekesi epidemiyolojisi ve patogenezinin daha iyi anlaşılması gerekmektedir. (Walcott 2008). Hastalıkla mücadelede şimdiye kadar birçok yöntem geliştirilmiş ve denenmiştir. Mücadele farklı kimyasal bileşikler, dayanıklı çeşit araştırması ve tohum uygulaması yapılmıştır. Çalışmalar sonucunda yeni yaklaşımlar ortaya çıkartılarak hastalığın gelişiminin sınırlandırılmasına ve hastalıkla mücadelesine katkı sağlamıştır.

*A. avenae* subsp. *citrulli*'nin alternatif konukçularıyla ilgili yapılan çalışmada, hastalık etmeni çeşitli türlerin/çeşitlerin, kabakgiller, soya fasulyesi, otsu bitkiler, baklagiller dahil olmak üzere ilk gerçek yaprak aşamasında bitkilerde belirlenmiştir. Kavun ve karpuzdan izole edilen *Aac* 1.49 ve *Aac* 12.13 strainleri içeren bakteriyel süspansiyonlar yapraklara püskürtülerek inoküle edilmiştir. Bitkilerin duyarlılığı, inkübasyon süresi (PI) ve hastalık insidansı (INC) esas alınarak değerlendirilmiştir (Nascimento vd. 2004). 22 farklı çeşit karpuz fidesinin hastalık etmenine karşı dayanıklılığı test edilmiş ve nispeten dayanıklı meyvelere sahip olan "Şeker Bebek", "Jubilation", "Mirage", "Calsweet", "Crimson Sweet", "Royal Sweet" ve "Sangria" çeşitleri saptamışlardır. Daha duyarlı kültürlerin genellikle açık renkli bir kabuğu olduğu gözlemlenmişlerdir (Hopkins vd. 1993). *A. avenae* subsp. *citrulli*'ye karşı dayanıklılıkta 1.344 *Citrullus* spp. ve *Praecitrullus fistulosus* çeşitleri kullanılmıştır. Çalışmada her bitki çeşidinden 16 tekerrür kullanılmış ve PI 532811 (Çin), PI482279 (Zimbabve), ve PI 385964 (Kenya) elde edilen çeşitler hastalık etmenine karşı daha dayanıklı olduğu tespit edilmiştir (Hopkins ve Thompson 2002b). Zimbabve ve Zambiya'dan elde edilen karpuz geçişlerinden oluşan beş popülasyonun Karpuz Bakteriyel Leke hastalığına yüksek düzeyde direnç gösterdiklerini bildirilmiştir (Hopkins

ve Thompson 2002b). Crimson Sweet özellikteki karpuz çeşidi ile yapılan ıslah çalışmasında PI 482279 ve PI 494817 çeşitlerinde *A. avenae subsp. citrulli* karşı dayanıklılık belirtileri gözlenmiştir (Hopkins ve Levi 2008). Daha yakın zamanlarda yapılan çalışmada toplanan bitkilerden 332 *Cucumis* sp. ve dört *C. melo* ve bir *C. ficifolius* bitkisinin yüksek düzeyde *A. citrulli*'ye direnç gösterdiğini bildirmişlerdir (Wechter vd. 2011). MH21 olarak isimlendirdikleri izolatu, hastalıklı kavun meyvesinden izole etmişler ve *A. avenae subsp. citrulli* olarak tanımlamıştır. MH21 izolatu, kavun fidesi üzerinde patojenikliklerinde kusurlu olan mutantları seçmek için transpozon Mini-Tn5 kullanılarak mutasyona uğratılmıştır. Southern blot analizi, transpozon *TnS*'nin, MH21 izolatu kromozomundaki rastgele ve tek kopya eklemeleri oluşturduğunu ortaya çıkarmıştır. Bir mutant M543, kavun fidesi üzerinde patojenisitesini kaybettiği belirlenmiştir (Zhengguang vd. 2009). Farklı konsantrasyonlarda bakteri ile enfekte olmuş bir tohumda *A. citrulli*'nin bulaşma seviyeleri % 16.7 ila % 100 arasında değişmektedir (Dutta vd. 2012a). Mücadelede farklı tohum muamele yöntemleri kullanılmıştır. Melo vd. 2015 yılında tohum muamelesinde, LMA1 ve CC-2 mayalarının kullanarak, hastalıkla mücadelede etkinliklerini teyit etmişlerdir, ancak tohumda hastalığı azaltmamışlardır. Wang vd. 2009 yılında ayrıca *A. citrulli* ile enfekte edilen Hami kavun tohumlarını *P. anomala* 0732-1 hücre süzuntüsü ile muamele farklı ettiklerinde hastalık şiddetinde önemli bir azalma olmadığını gözlemlemişlerdir. Yaptığımız çalışmada hastalığa karşı dayanıklı çeşitlerin varlığının araştırılması için test edilen bitkilerde duyarlılık reaksiyonları sprey ve kontrol amaçlı yapılan enjeksiyon yöntemiyle test edilmiştir. Kullanılan 59 popüler ticari çeşit ve bazı yerel karpuz-kavun çeşitlerinde hastalık belirtileri yüksek oranda gözlenmiştir. Bitkilerde oluşan belirtilerin ileri zamanlarda bitkinin yeni gelişen yapraklarına doğru ilerlediği gözlenmiştir. Bu sonuçlar sonucunda 28 karpuz çeşidinde skala 8 ve 9 gözlenirken 31 kavun çeşidinde skala 7, 8 ve 9 gözlenmiştir. Çalışmada test edilen 59 bitkide kullanılan skala değerlerinin 7,8 ve 9 dışında kalanı hariç hiçbir çeşitte bakteriye karşı kısmen veya yarı duyarlılık saptanmamıştır. Veriler SPSS (Version 16.0) paket programları kullanılarak birden fazla çoklu karşılaştırma testleri ile gösterdiği duyarlılık reaksiyonları istatistiksel olarak da değerlendirilmiştir.

## 6. SONUÇLAR

Karpuz ve kavun yetiştiriciliği birçok ülkede ve ülkemizde de sıcak ve ılıman iklime sahip alanlarda yetiştiriciliği yapılmaktadır. Yetiştiricilik sırasında verimi etkileyecek canlı ve cansız hastalık etmenlerinden kaynaklı kayıplar oluşabilmektedir. Bitkideki fizyolojik değişikliğe neden olan etmenin varlığının tespit edilmesi ve tanısının yapılması yetiştiricilik için önemli faktördür. Bu nedenle özellikle Cucurbitaceae familyası içinde yer alan karpuz ve kavun yetiştiricilik alanlarında önemli meyve kayıplarına neden olan Karpuz Bakteriye Meyve Lekesi hastalığının kontrol altına alınması ve alternatif yöntemlerin geliştirilerek üretimde oluşan sorunları en aza indirilmesi hedeflenen amaçların başında gelmektedir.

Çalışmada geliştirilen LNA prob ile Real-Time PCR yöntemi; *Acidovorax citrulli*'nin karantina listesinde yer almasından ve bir tohumun bile bulaşık olması taşınmada yeterli inokülasyonu sağladığından dolayı kısa ve etkili bir şekilde yurtiçi ve yurt dışı tohum stoklarının kısa sürede (14 dk) taranmasına olanak sağlayacaktır. Bu geliştirilen Real-Time PCR yöntemi ile çok kısa sürede (14-25 dk) herhangi bir DNA izolasyonuna gerek duyulmadan direkt bakteriyel hücreden (bir *A. citrulli* hücresi) ve *A. citrulli* DNA'sından (12 fg) çok hassas ve güvenilir bir şekilde patojenin tanısı başarıyla sonuçlanmıştır. Çalışmada geliştirilen Kantitatif Real-Time Bio-PCR ile bakterinin karpuz ve kavun tohumundan direkt canlı patojen bakterinin tespiti başarılmıştır. Bu sayede birincil inokulum kaynağı olan tohumla taşınmaya engel olunabilecektir. Karantina uygulamalarında kullanılarak yeni *A. citrulli* strainlerinin ülkemize tohumla taşınması engellenebilecektir.

Bu geliştirilen Real-Time PCR yöntemi ile herhangi bir DNA izolasyonu yapılmadan hastalıklı bitki materyalinden (kotiledon ve gerçek yaprak dokularından) patojenin çok hassas ve güvenilir bir şekilde tespiti gerçekleştirilebilmiştir. Karpuz materyallerinden *A. citrulli*'nin kısa ve etkin bir şekilde belirlenmesi ve bitki materyallerinde patojenin popülasyon oranının belirlenmesi için uygulanan kantitatif Real-Time PCR yöntemi ile oluşturulan regresyon eğrileri sayesinde etmenin tohum veya fidedeki bulaşıklılık oranlarını belirlenmesini sağlayan standart eğri elde edilmiştir. Bu sayede test edilmesi gereken materyallerdeki canlı ve ölü bakteri hücrelerinin popülasyon miktarları belirlenerek mücadele yöntemlerinin tercihine ve zamanına klavuzluk sağlayabilecektir.

Ayrıca çalışmada kantitatif Real-Time PCR ile elde edilen standart eğri sonucunda PCR etkinlik oranı belirlenmiştir. Standart eğri tüm konsantrasyon aralığında doğrusal olarak elde edilmiştir. Doğrusal bir standart eğri, aynı zamanda, büyütme verimliliğinin değişen şablon konsantrasyonlarında tutarlı olduğunu ifade etmektedir. İdeal olarak, standart eğri ve numune reaksiyonlarının verimliliği % 90 ile 110 arasında olması istenmektedir. Çalışmada her iki primer-prob seti için elde edilen PCR etkinliği % 97.941 ve % 98.215 oranlarında elde edilerek yüksek verimlilik sağlamıştır.

Bu çalışmada bölgemizde tercih edilen popüler ve bazı yerel karpuz-kavun çeşitlerinin patojen bakteriye karşı ön bir değerlendirilmesi yapılmıştır ve *A. citrulli*'ye karşı duyarlılık reaksiyonlarının araştırılmasında 28 karpuz-31 kavun çeşidi test edilmiş ve test edilen hiçbir çeşidin patojen bakteriye karşı dayanıklı olmadığı saptanmıştır.

Sonuç olarak, Karpuz Bakteriyel Meyve Lekesi hastalığına neden olan *A. citrulli* bakteriyel etmenin tanısı, tespiti ve duyarlılık reaksiyonu için çok yönlü moleküler araştırma yapılmıştır. Çalışmada geliştirilen Kantitatif Real-Time PCR yöntemi ile birçok farklı kombinasyon testlemeler ile spesifikliği, seçiciliği, etkinliği ve pratikte kullanılabilirliği güvenilir PCR sonuçları ile ortaya konulmuştur. Ayrıca arazi çalışmaları ile farklı bitki çeşitleri yetiştirilerek hastalığın simptomatolojik gelişmeleri incelenerek bitkilerin duyarlılık reaksiyon oranları belirlenmiştir. Bu çalışma ile elde edilen araştırma sonuçları teorik ve pratik olarak bilimsel araştırmalara ve yetiştiricilik alanlarına uygulanabilmesi ile de mücadele yöntemlerine büyük katkı sağlayacaktır.

## 7. KAYNAKLAR

- Abdullai, M. ve Basım, H. 2017. Kasava (*Manihot esculenta* C.) bakteriyel yanıklık hastalık etmeni *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*'in Real-Time PCR ile tanısı, tespiti ve pulsed-field jel elektroforezis ile moleküler karakterizasyonunun yapılması. Doktora tezi, Akdeniz Üniversitesi, Antalya, 92.
- Abdullai, M., Basım, H., Basım, E. Baki, D. and Öztürk, N. 2018. Detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*, the causal agent of cassava bacterial blight diseases in cassava (*Manihot esculenta*) in Ghana by polymerase chain reaction. *Eur. J. Plant Pathol.* 150: 471-484.
- Aktaş, D. ve Basım, H. 2017. Zeytin (*Olea europaea* L.) dal kanseri hastalık etmeni *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'nin kantitatif real-time membran Bio-PCR ile tanısı ve epifitik popülasyonun tespiti. Yüksek Lisans Tezi, 93, Antalya.
- Alfano, J.R. and Collmer, A. 2004. Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense. *Annu Rev Phytopathol.* 42: 385-414.
- Amadi, J.E., Adebola, M.O. and Eze, C.S. 2009. Isolation and identification of a bacterial blotch organism from watermelon (*Citrullis lanatus* (Thunb.) Matsum. and Nakai). *Afr. J. Agric. Res.* 4: 1291-1294.
- Amagliani, G., Omiccioli, E., del Campo, A., Bruce, I.J., Brandi, G. and Magnani, M. 2006. Development of a magnetic capture hybridization-PCR assay for *Listeria monocytogenes* direct detection in milk samples. *J. Appl. Microbiol.* 100: 375-383.
- Anonim 1990. Karpuz yetiştiriciliği, T.K.Bakanlığı, Ankara.
- Anonim 2003. Lycopene. Retrieved 22 May 2003 from <http://www.lycopene.org>.
- Anonim 2005. Karpuz yetiştiriciliği, T.K.Bakanlığı, Samsun.
- Anonim 2009. [www.eppo.int/EPPO](http://www.eppo.int/EPPO).
- Anonim 2014 <http://www.exiqon.com>.
- Anonim 2016. Bitkisel Üretim İstatistikleri. <https://biruni.tuik.gov.tr> (Erişim Tarihi: 01.02.2016)
- Assis, S.M.P., Mariano, R.L.R., Silva-Hanlin, D.M.W. and Duarte, V. 1999. Bacterial fruit blotch caused by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in melon in the state of Rio Grande do Norte, Brazil. *Fitopatologia Brasileira.* 24: 191.
- Assouline, I., Milshtein, H., Mizrachi, M., Levy, E. and Ben-Ze'ev, I.S. 1997. *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* transmitted by Solanaceous seeds. *Phytoparasitica.* 25: 2.



- Back, C., Lee, S., Park, M., Han, K., Kim, H., Lee, Y. and Park, J. 2016. Analysis of control efficacy of bacterial fruit blotch caused by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in Recent Issues. *Korean Journal of Pesticide Science*. 20 (1): 41-46.
- Bahar, O. and Burdman, S. 2010. Bacterial fruit blotch: a threat to the cucurbit industry. *Isr. J. Plant Sci.* 58: 19-31.
- Bahar, O., De La Fuente, L. and Burdman, S. 2010. Assessing adhesion, biofilm formation and motility of *Acidovorax citrulli* using microfluidic flow chambers. *FEMS Microbiol. Lett.* 312: 33-39.
- Bahar, O., Efrat, M., Hadar, E., Dutta, B., Walcott, R.R. and Burdman, S. 2008. New subspecies-specific polymerase chain reaction-based assay for the detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. *Plant Pathol.* 57: 754-763.
- Bahar, O., Goffer, T. and Burdman, S. 2009a. Type IV pili are required for virulence, twitching motility, and biofilm formation of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 22: 909-920.
- Bahar, O., Kritzman, G. and Burdman, S. 2009b. Bacterial fruit blotch of melon: screens for disease tolerance and role of seed transmission in pathogenicity. *Eur. J. Plant Pathol.* 123: 71-83.
- Baki D. ve Basım H. 2014. Domates (*Solanum lycopersicum* L.) bakteriyel öz nekrozu hastalık etmenleri *Dickeya chrysanthemi*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pseudomonas cichorii*, *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mediterranea* ve *Pseudomonas viridiflava*'nın LNA probe kullanılarak Real-Time PCR ile tanısı ve hastalıklı bitki dokularından tespiti. Yüksek lisans tezi, Akdeniz Üniversitesi, Antalya, 155.
- Basım, E. ve Basım, H. 2004. Multiplex-Bio PCR ile domates bakteriyel patojenlerinin moleküler tanısı. Türkiye I Bitki Koruma Kongresi Bildirileri, 144: 8-10 Eylül, Samsun.
- Basım, E. ve Basım, H. 2009. Batı Akdeniz Bölgesi'ndeki bağ alanlarında Pierce hastalığı etmeni *Xylella fastidiosa*'nın tanısı, tespiti ve moleküler karakterizasyonu. Türkiye III. Bitki Koruma Kongresi, 156: 15-18 Temmuz, Van.
- Basım, H. and Yılmaz, S. 2005. Identification and detection of *Pseudomonas corrugata* and *Pseudomonas mediterranea* by Multiplex-PCR and Real-Time PCR. *Phytopath.* 96: 128.
- Basım, H. ve Basım, E. 2007. TaqMan Real-Time PCR ile *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*'nun tanısı ve tespiti, II. Bitki Koruma Kongresi, ss. 104: 27-29 Ağustos, Isparta.
- Bellis, P.D., Schena, L. and Cariddi, C. 2007. Real-Time Scorpion-PCR detection and quantification of *Erwinia amylovora* on pear leaves and flowers. *Eur. J. Plant. Pathol.* 118: 11-22.

- Benlioğlu, K. ve Özyılmaz, Ü. 2007. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in moleküler beacon probe ve floresan PCR testi ile saptanması, Türkiye II. Bitki Koruma Kongresi. 103, 27-29 Ağustos, Isparta.
- Black, M.C., Isakeit, T. and Barnes, L.W. 1994. First report of bacterial fruit blotch of watermelon in Texas. *Plant Dis.* 78: 831.
- Block, C.C. and Shepherd, L.M. 2015. Long-term survival and seed transmission of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in melon and watermelon seed. *Plant Health* Available from: [www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/brief/2008](http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/brief/2008), Accessed: Sept. 15.
- Bogdanove, A.J., Beer S.V., Bonas U., Boucher C.A., Collmer A., Coplin D.L., Cornelis G.R., Huang H.C., Hutcheson S.W., Panopoulos N.J. and van Gijsegem F. 1996. Unified nomenclature for broadly conserved *hrp* genes of phytopathogenic bacteria. *Mol. Microbiol.* 20: 681-683.
- Bozan, G. ve Basım, H. 2011. Ateş yanıklığı hastalık etmeni *Erwinia amylovora*'nın LNA probe kullanılarak Kantitatif Real-Time PCR ile tanısı ve tespiti. Yüksek lisans tezi, Akdeniz Üniversitesi, Antalya, 92.
- Burdman, S. and Walcott, R. 2012. *Acidovorax citrulli*: generating basic and applied knowledge to tackle a global threat to the cucurbit industry. *Mol. Plant Pathol.* 2;13(8): 805-15.
- Burdman, S., Kots, N., Kritzman, G., and Kopelowitz, J. 2005. Molecular, physiological, and host-range characterization of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* isolates from watermelon and melon in Israel. *Plant Dis.* 89: 1339-1347.
- Candan, F. ve Kesercioğlu, T. 2012. Kavun (*Cucumis melo* L.) Türünün Kökeni, Yayılışı ile Batı Anadolu'da bulunan doğal form ve kültür varyeteleri. Kırkağaç Araştırmaları Sempozyumu. Manisa.
- Carvalho, F.C.Q., Santos, L.A, Dias, R.C.S., Mariano, R.L.R. and Souza, E.B. 2013. Selection of watermelon genotypes for resistance to bacterial fruit blotch. *Euphytica.* 190: 169-180
- Chalupowicz, L., Dror, O., Reuven, M., Burdman, S. and Manulis-Sasson, S. 2015. Cotyledons are the main source of secondary spread of *Acidovorax citrulli* in melon nurseries. *Plant Pathol.* 64: 528-536.
- Cheng, A.H., Hsu, Y.L., Huang, T.C. and Wang, H.L., 2000. Susceptibility of cucurbits to *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* and control of fruit blotch on melon. *Plant Pathology Bulletin.* 9: 151-156.
- Cho, M.S., Park D.H., Ahn, T.Y. and Park, D.S. 2015. Rapid and specific detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* using SYBR green-based Real-Time PCR amplification of the YD-repeat protein gene. *J. Microbiol. Biotechnol.* 25: 1401-1409.

- Cottyn, B., Baeyen, S., Pauwelyn, E., Verbaendert, I., Vos, P.De., Bleyaert, P., Höfte, M. and Maes, M. 2011. Development of a Real-Time PCR assay for *Pseudomonas cichorii*, the causal agent of midrib rot in greenhouse grown lettuce, and its detection in irrigating water. *Plant Pathol.* 60: 453-461.
- Craig, L., Pique, M.E. and Tainer, J.A. 2004. Type IV pilus structure and bacterial pathogenicity. *Nat. Rev. Microbiol.* 2: 363-378.
- Crall, J.M. and Schenck, N.C. 1969. Bacterial fruit rot of watermelon in Florida. *Plant Dis. Rep.* 53: 74-75.
- Çaplık, D. ve Basım, H. 2009. Domates bakteriyel kanser etmeni *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* ve domates bakteriyel yaprak lekesi etmeni *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*'nın LNA probe'a dayalı Real-Time PCR ile tanısı ve saptanması. Türkiye III. Fitopatoloji Kongresi, 138, 15-18 Temmuz, Van.
- De Candolle, A. 1882. Origine des plantes cultivées. Paris: Germer Baillière.
- Demir G., 1996. A new bacterial disease of watermelon in Türkiye: Bacterial fruit blotch of watermelon (*Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (Schaad et al.) Williams et al.). *J. Turkish Phytopathol.* 25: 43-49.
- Douzi, B., Filloux, A. and Voulhoux, R. 2012. On the path to uncover the bacterial type II secretion system. *Philos. Trans. R. Soc. London B: Biol. Sci.* 367: 1059-1072.
- Dutta, B., Sanders, H., Langston, D.B, Booth, C., Smith, S. and Gitaitis, R.D. 2014. Long-term survival of *Acidovorax citrulli* in citron melon (*Citrullus lanatus* var. *citroides*) seeds. *Plant Pathol.* 63: 1130-1137.
- Dutta, B., Scherm, H., Gitaitis, R.D. and Walcott, R.R. 2012a. *Acidovorax citrulli* seed inoculum load affects seedling transmission and spread of bacterial fruit blotch of watermelon under greenhouse conditions. *Plant Dis.* 96: 705-711.
- Dutta, B., Avci, U., Hahn, M.G., and Walcott, R.R. 2012b. Location of *Acidovorax citrulli* in infested watermelon seeds is influenced by the pathway of bacterial invasion. *Phytopathol.* 102: 461-468.
- Elizalde, J.N.A., Hernández, M.J., Leyva, M.S.G., Nava, D.C., Sequeira, R.A., Fowler, G. and Magarey, R. 2011. Evaluación del riesgo de asociada a semilla de sandía de importación a México. *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, *Revista Mexicana de Fitopatología.* 29: 133-145.
- EPPO 2018. PM 7/127 (1) *Acidovorax citrulli*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 46 (3): 444-462.
- Evans, T.A. and Mulrooney, R.P. 1991. First report of watermelon fruit blotch in Delaware. *Plant Dis.* 75: 1074.

- FAOSTAT 2016, Food and agriculture organization of the United Nations [online], www.fao.org [Ziyaret Tarihi: 03.05.2016].
- Feng, J., Xu, Y., Li, J. and Schaad, N.W. 2006. Comparison of immunostrip and real-time fluorescent PCR (TaqMan) for detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, the causal agent of bacterial fruit blotch of watermelon. *Acta Phytopathologica Sinica*. 36: 102-108.
- Feng, J.J., Li J.Q., Walcott, R. , Zhang, G.M., Luo, L.X., Kang, L. and Schaad, N.W. 2013. Advances in detection of *Acidovorax citrulli*, the causal agent of bacterial fruit blotch of cucurbits. *Seed Science and Techn.* 41(1): 1-15.
- Fessehaie, A., Walcott, R. and Keinath, A. 2005. Simultaneous detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* and *Didymella bryoniae* using multiplex Real-Time PCR. *Phytopathol.* 95: 29.
- Forootana, A., Sjöback, R., Björkman, J., Sjögreen, B., Linz, L. and Kubista, M. 2017. Methods to determine limit of detection and limit of quantification in Quantitative Real-Time PCR (qPCR). *Biomol. Detect. Quantif.* 12: 1-6.
- Frankle, W.G., Hopkins, D.L. and Stall, R.E. 1993. Ingress of the watermelon fruit blotch bacterium into fruit. *Plant Dis.* 77: 1090-1092.
- Freeman, W.M., Walker, S.J. and Vrana, K.E. 1999. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *Biotechniques.* 26: 112-122.
- Furong L., Shiming, L., Zhipeng, F., Pengying, H., Hongyun, C., Qing, C. and Yuan, W. 2010. Detection and identification of *Acidovorax citrulli* from imported watermelon seeds, *Plant Protection.* 36(6): 135-138.
- Gallelli, A., Talocci, S., Pilotti, M. and Loreti, S. 2014. Real-Time and qualitative PCR for detecting *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* isolates causing recent outbreaks of kiwi fruit bacterial canker. *Plant Pathol.* 63: 264-276.
- Garster, H., 1997. The Potential role of lycopene for human health. *J. Am. Coll.Nutr.* 16: 109-126.
- Giovanardi D., Ferrari, M. and Stefani, E. 2015. Seed transmission of *Acidovorax citrulli*: Implementation of detection in watermelon seeds and development of disinfection methods. *Plant Protection Society of Serbia, IOBC-EPRS, IOBC-WPRS, Belgrade, 71-75.*
- Gottsberger, R.A. 2010. Development and evaluation of a Real-Time PCR assay targeting chromosomal DNA of *Erwinia amylovora*. *Lett. Appl. Microbiol.* 51 (3): 285-292.
- Güner, N. and Wehner, T.C. 2004. The genes of watermelon. *Hortscience,* 39(6): 1175-1182.
- Güneş, R and Aşkın, B. 2016. Karpuz çekirdeği yağının kimyasal özellikleri ve besin içeriği. *Gıda,* 41(1): 37-44.

- Ha, Y., Fessehaie, A., Ling, K.S., Wechter, W.P., Keinath, A.P. and Walcott, R.R. 2009. Simultaneous detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* and *Didymella bryoniae* in cucurbit seedlots using magnetic capture hybridization and real-time polymerase chain reaction. *Phytopathol.* 99: 666-678.
- Hall, R. 1999. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41: 95–98
- Himananto, O., Thummabenjapone, P., Luxananil, P., Kumposiri, M., Hongprayoon, R., Kositratana, W., and Gajanandana, O. 2011. Novel and highly specific monoclonal antibody to *Acidovorax citrulli* and development of ELISA-based detection in cucurbit leaves and seed. *Plant Dis.* 95: 1172-1178.
- Holeva, M.C., Karafla, C.D., Glynos, P.E. and Alivizatos, A.S. 2010. *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* newly reported to cause bacterial fruit blotch of watermelon in Greece. *Plant Pathol.* 59: 797.
- Hooker, J. 1897. *The flora of British India Vol. VII.* London, UK: Reeve.
- Hopkins, D.L. ve Levi, A., 2008. Progress in the development of Crimson Sweet-type watermelon breeding lines with resistance to *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. Cucurbitaceae 2008, Proceedings of the IXth EUCARPIA meeting on genetics and breeding of Cucurbitaceae, Avignon (France). 157-162.
- Hopkins, D.L. and Thompson C.M. 2002b. Evaluation of *Citrullus* sp. germplasm for resistance to *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. *Plant Dis.* 86: 61-64.
- Hopkins, D.L. and Thompson, C.M. 2002a. Seed transmission of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in cucurbits. *Hortscience*, 37: 924-926.
- Hopkins, D.L., Thompson, C.M. and Elmstrom, G.W. 1993. Resistance of watermelon seedlings and fruit to the fruit blotch bacterium. *HortScience*, 28: 122-123.
- Horuz, S., Cetinkaya-Yildiz, R., Mirik, M. and Aysan, Y. 2014. Occurrence, isolation, and identification of *Acidovorax citrulli* from Melon in Turkey. *Plant Protect. Sci.* 50: 179-183.
- Hui, W., Zhao, T., Schaad, N.W., Sun, F. and Wang, J. 2007. Establishment of rapid detection method for the pathogen of hami melon fruit blotch (in Chinese). *Scientia Agricultura Sinica*, 40: 2495-2501.
- Isakeit, T., Black, M.C., Barnes, L.W. and Jones, J.B. 1997. First report of infection of honeydew with *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. *Plant Dis.* 81: 694.
- Isakeit, T., Black, M.C., and Jones, J.B. 1998. Natural infection of citronmelon with *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. *Plant Dis.* 83: 351.
- Jeffrey, C. 1975. Further Notes on Cucurbitaceae: III. Some African taxa. *Kew Bul.* 30: 475-493.
- Jeffrey, C. 2005. A New System of Cucurbitaceae. *Bot. Zhur*, 90: 332-335.

- Jiang, C., Wu, F., Yu, Z., Xie, P., Ke, H., Li, H., Yu, Y. and Guo, J. 2015. Study on screening and antagonistic mechanisms of *Bacillus amyloliquefaciens* 54 against bacterial fruit blotch (BFB) caused by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. *Microbiol. Res.* 170: 95-104.
- Johnson, K.L. 2010. Elucidation of the host–pathogen interactions that influence seed-to-seedling transmission of *Acidovorax citrulli*. PhD Dissertation. Athens, GA: The University of Georgia.
- Johnson, K.L. and Walcott, R.R. 2012. Progress towards a Real-time PCR assay for the simultaneous detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* and *Pepino mosaic virus* in tomato seed. *J. Phytopathol.* 160 (7-8): 353-363.
- Johnson, K.L., Minsavage, G.V., Le, T., Jones, J.B., and Walcott, R.R. 2011. Efficacy of a nonpathogenic *Acidovorax citrulli* strain as a biocontrol seed treatment for bacterial fruit blotch of cucurbits. *Plant Dis.* 95: 697-704.
- Jones, J.B., Gitaitis, R.D. and Schaad, N.W. 2001. Gram-negative bacteria: *Acidovorax* and *Xylophilus*. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria (3rd edition). Schaad, N.W., Jones, J.B. and Chen, W. (eds). APS Press, St. Paul, Minnesota. 121-138.
- Kajiwara, H, Sato, M. and Suzuki, A. 2012. Detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* using PCR and MALDI-TOF MS. *J. Electrophoresis.* 56(1): 13-17.
- King, E.O., Ward, M.K., and Raney, D.E. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *J. Lab. Clin. Med.* 44: 301.
- Kubilay, Z. 2014. Karpuz (*Citrullus vulgaris*) ve Kavun (*Cucumis melo*) meyve sularının kombucha mantarı ile fermantasyon ürünlerinin antioksidan aktivitelerinin araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Gaziantep Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Gaziantep, 42.
- Kubota, M., Hagiwara, N. and Shirakawa, T. 2011. A method to evaluate percentage of cucurbit seeds infested with *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, pathogen of bacterial fruit blotch. *J. Gen. Plant Pathol.* 77: 112-115.
- Kumagai, L.B., Woods, P.W., Walcott, R. and Moua, X. 2014. First report of bacterial fruit blotch on melon caused by *Acidovorax citrulli* in California. *Plant Dis.* Vol. 98 (1): 1423
- Langston, Jr., D.B., Walcott, R.R., Gitaitis, R.D. and Sanders, Jr., F.H. 1999. First report of a fruit rot of pumpkin caused by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in Georgia. *Plant Dis.* 83: 199.
- Latin, R.X. and Rane, K.K. 1990. Bacterial fruit blotch of watermelon in Indiana. *Plant Dis.* 74: 331.
- Latin, R.X., and Hopkins, D.L. 1995. Bacterial fruit blotch of watermelon-The hypothetical exam question becomes reality. *Plant Dis.* 79: 761-765.

- Lee, H., Kim, M. S., Qin, J., Park, E., Song, Y., Oh, C. and Cho, B. 2017. Raman Hyperspectral Imaging for Detection of Watermelon Seeds Infected with *Acidovorax citrulli*. *Sensors* 17(10): 2188.
- Li, B., Shi, Y., Shan, C., Zhou, Q., Ibrahim, M., Wang, Y., Wu, G., Li, H., Xie, G. and Sun, G. 2013. Effect of chitosan solution on the inhibition of *Acidovorax citrulli* causing bacterial fruit blotch of watermelon. *J. Sci. Food Agric.* 93: 1010-1015.
- Licciardello, G., Bella, P. and Catara, V. 2011. Quantitative detection of *Pseudomonas corrugata* and *Pseudomonas mediterranea* in tomato plants by duplex Real-Time PCR. *J. Plant Pathol.*, 93 (3): 595-602.
- Louws, F.J, Rademaker J.L.W. and de Bruijn, F.J. 1999. The three Ds of PCR-based genomic analysis of phyto bacteria: diversity, detection, and disease diagnosis. *Annual Review of Phytopathol.* 37: 81-125.
- Luo, J., Qiu, W., Chen, L., Anjum, S.I., Yu, M., Shan, C., Ilyas, M., Li, B., Wang, Y. and Sun, G. 2015. Identification of Pathogenicity-Related Genes in Biofilm-Defective *Acidovorax citrulli* by Transposon Tn5 Mutagenesis. *Int J Mol Sci.* 16(12): 28050-62.
- Luo, L.X., Walters, C., Bolkan, H., Liu, X.L., and Li, J.Q. 2008. Quantification of viable cells of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* using a DNA binding dye and a Real-Time PCR assay. *Plant Pathol.* 57: 332-337.
- Ma, S. 2014. Studies on identifying cucurbit bacterial fruit blotch resistance resources with usda watermelon germplasm. *Horticultural Science Raleigh*, North Carolina. 55 (2): 727-736.
- Mansfield, J.W. 2009. From bacterial avirulence genes to effector functions via the hrp delivery system: an overview of 25 years of progress in our understanding of plant innate immunity. *Mol Plant Pathol.* 10: 721-734.
- Martin, H.L. and O' Brien, R.G. 1999. First report of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* as a pathogen of cucumber. *Plant Dis.* 83: 965.
- Matsuura, T. Shirakawa, T., Sato, M., Inoue, Y. and Azegami, K. 2008. Detection and isolation of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* from watermelon seeds using membrane filtration immunostaining. *Japanese J. Plant Pathol.* 74: 153-156.
- Milli Eğitim Bakanlığı 2008. Kavun yetiştiriciliği. Bahçecilik, 621EEH061. Ankara
- Melo, L.A., Tebaldi, N.D., Mehta, A. and Marques, A.S.A. 2014. Comparing *Acidovorax citrulli* strains from melon and watermelon: Phenotypic characteristics, pathogenicity and genetic diversity. *Tropical Plant Pathol.* 39: 154-162.
- Melo, E.A., Mariano, R.L.R., Laranjeira, D., Santos, L.A., Gusmão, L.O. and Souza, E.B. 2015. Efficacy of yeast in the biocontrol of bacterial fruit blotch in melon plants. *Tropical Plant Pathol.* 40: 56-64.

- Mirik, M., Aysan, Y. and Sahin, F., 2006. Occurrence of bacterial fruit blotch of watermelon caused by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in the Eastern Mediterranean Region of Turkey. *Plant Dis.* 90: 829.
- Munoz, M. and Monterroso, D. 2002. Identification of in *Acidovorax avenae citrulli* watermelon seeds in Nicaragua. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología* 66: 101-104.
- Nascimento, A.R.P., Mariano, R.L.R. and Silva, E.I. 2004. Hospedeiros alternativos de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. *Horticultura Brasileira*, Brasília, 22 (3): 511-515.
- Nudleman, E. and Kaiser, D. 2004. Pulling together with type IV pili. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 7: 52-62.
- O'Brien, R.G. and Martin, H.L. 1999. Bacterial blotch of melons caused by strains of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. *Aust. J. Exp. Agric.* 3: 479-485.
- Oya, H., Nakagawa, H., Saito, N., Uematsu, H. and Ohara, T. 2008. Detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* from seed using LAMP method. *Japanese J. Plant Pathol.* 74: 304-310.
- Özgür, M. 1995. Kavun ve karpuz yetiştiriciliği. Sebzeçilik, T.C. Anadolu Üniversitesi Yay. No: 864: 218-232.
- Öztürk, N. ve Basım, H. 2011. Fasulye bakteriyel yaprak yanıklık (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*) ve bakteriyel hale lekesi (*Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*) etmenlerinin LNA probu kullanılarak Real-Time PCR ile tespiti ve tanılanması. Yüksek lisans tezi, Akdeniz Üniversitesi, Antalya, 84.
- Palkovics, L., Petróczy, M., Kertész, B., Németh, J., Bársony, C., Mike, Z. and Hevesi, M. 2008. First report of bacterial fruit blotch of watermelon caused by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in Hungary. *Plant Dis.* 92: 834-835.
- Park, M.R., Choi, W.S., Yadav, D.R., Kim, S.W., Kim, J.I. and Lee, Y.S. 2015. Antibacterial Effect of Nickel Nanoparticles on *Acidovorax citrulli*, the Causal Agent of Bacterial Fruit Blotch of Cucurbits. *J. Agric. Life and Environ. Sci.* 27 (3): 43-50.
- Park, Y.H., Lee, Y.J., Choi, Y.W., Son, B.G. and Kang, J.S. 2008. Evaluations of PCR primers used in the detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* causing bacterial fruit blotch (BFB) in cucurbits. *Hort. Environ. Biotechnol.* 49: 325-331.
- Perkins, V.P. 2005. Watermelon and Human Health. 3rd International Cucurbit Symposium, Townsville-Australia, 66.
- Petersen, M., and Wengel, J. 2003 LNA: a versatile tool for therapeutics and genomics. *Trends Biotechnol* 21: 74-81.



- Puttharugsa, C., Wangkam, T., Huangkamhang, N., Gajanandana, O., Himananto, O., Sutapun, B., Amarit, R., Somboonkaew, A. and Sriksirin, T. 2011. Development of surface plasmon resonance imaging for detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (Aac) using specific monoclonal antibody. *Biosensors and Bioelectronics*. 26: 2341-2346.
- Raeymaekers, L. 2000. Basic principles of quantitative PCR. *Mol. Biotechnol.* 15: 115-122.
- Rane, K.K., and Latin, R.X. 1992. Bacterial fruit blotch of watermelon: association of the pathogen with seed. *Plant Dis.* 76: 509-512.
- Rasmussen, R. 2001. Quantification on the LightCycler instrument. In Meuer, S., Wittwer, C. and Nakagawara, K. (eds), *Rapid Cycle Real-time PCR: Methods and Applications*. Springer, Heidelberg. 21±34.
- Ren, Y.Z., Li, H., Li, G.Y. and Wang, Q.Y. 2006. First report of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* infecting edible seed watermelon (*Citrullus lanatus* var. *lanatus*) in China. *Plant Dis.* 90: 1112.
- Robinson, R.W. and Decker-Walters, D.S. 1997. Cucurbits. CABI., Wallingford, UK. ISBN: 0 85199 1335.
- Sarı, N. 2006. Yazlık Sebzeler Ders Notları, Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü, Adana.
- Sarı, N., Kaçar, Y.A., Mendi, Y.Y., Solmaz, G. and Aktaş, H. 2007. Karpuz genetik kaynaklarının morfolojik ve genetik karakterizasyonu. Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu. Proje numarası: 104O073.
- Sarijlu, E.M.T 2011. Kabak (*Cucurbita pepo*) Bitkisinde *Agrobacterium rhizogenes* aracılıyla rol genlerin aktarılması, Yüksek lisans tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Konya.
- Saygılı, S. 2005. Kavun yetiştiriciliği. Samsun Valiliği, İl Tarım Müdürlüğü. S/9.
- Schaad, N.W. and Sechler, A., 1999. An improved semiselective agar medium for *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. (Abstr.) *Phytopathol.* 89: S68.
- Schaad, N.W., Cheong, S.S., Tamaki, S., Hatziloukas, E., and Panopoulos, N.J. 1995. A combined biological and enzymatic amplification (BIO-PCR) technique to detect *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in bean seed extracts. *Phytopathol.* 85: 243-246.
- Schaad, N.W., Postnikova, E. and Randhawa, P.S. 2003. Emergence of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* as a crop threatening disease of watermelon and melon. In: *Pseudomonas syringae* and related pathogens (Iacobellis, N.S., Collmer, A., Hutcheson, S.W., Mansfield, J.W., Morris, C.E., Murillo, J., Schaad, N.W., Stead, D.E., Surico, G. and Ullrich, M.S., eds), 573-581. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.

- Schaad, N.W., Postnikova, E., Sechler, A., Claflin, L.E., Vidaver, A.K., Jones, J.B., Agarkova, I., Ignatov, A., Dickstein, E. and Ramundo, B.A. 2008. Reclassification of subspecies of *Acidovorax avenae* as *A. avenae* (Manns 1905) emend., *A. cattleyae* (Pavarino 1911) comb. nov., *A. citrulli* (Schaad et al., 1978) comb. nov., and proposal of *A. oryzae* sp. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* 31: 434-446.
- Schaad, N.W., Song, W.Y. and Hatziloukas, E. 2000. PCR primers for detection of plant pathogenic species and subspecies of *Acidovorax*. US Patent no. 6146834.
- Schaad, N.W., Sowell, G., Goth, R.W., Colwell, R.R. and Webb, R.E. 1978. *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli* subsp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 28: 117-125.
- Shi, Y., Yang, L., Wang, X., Gao, Y., Liu, W. and Lou, K. 2012. Biocontrol of bacterial spot diseases of muskmelon using *Paenibacillus polymyxa* G-14. *African J. Biotechnol.* 11(104): 16845-16851.
- Shirakawa, T., Kikuchi, S., Kato, T., Abiko, A. and Kaiwa, A. 2000. Occurrence of watermelon bacterial fruit blotch in Japan. *Japanese J. Plant Pathol.* 6: 223-231.
- Shirakawa, T., Komiya, Y. and Kazuo, A. 2003. Population dynamics of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 69 (2): 102-106.
- Silva, G.M. 2016. *Acidovorax citrulli*: Genetic analyses and protocol for its detection in seeds. Tese (doutorado)–Universidade Federal de Lavras.
- Solval, K.M., Sundararajan, S., Alfaro, L. and Sathivel, S. 2012. Development of Cantaloupe (*Cucumis melo*) Juice Powders Using Spray Drying Technology. *LWT -Food Sci. Technol.* 46: 287-293.
- Somodi, G.C., Jones, J.B., Hopkins, D.L., Stall, R.E., Kucharek, T.A., Hodge, N.C. and Watterson, J.C. 1991. Occurrence of a bacterial watermelon fruit blotch in Florida. *Plant Dis.* 75: 1053-1056.
- Song, W.Y., Sechler, A.J., Hatziloukas, E., Kim, H.M. and Schaad, N.W. 2003. Use of PCR for rapid identification of *Acidovorax avenae* and *A. avenae* subsp. *citrulli*. In: *Pseudomonas syringae* and Related Pathogens (Iacobellis, N.S., Collmer, A., Hutcheson, S.W., Mansfield, J.W., Morris, C.E., Murillo, J., Schaad, N.W., Stead, D.E., Surico, G. and Ullrich, M.S., eds), 531–543. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Sowell, G. and Schaad, N.W. 1979. *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli* on watermelon-seed transmission and resistance of plant introductions. *Plant Dis.* 63: 437-441.
- Tao, C., Guo-Liang, Q., Xiao-Li, Y., Jun-Yi, M., Bai-Shi, H. and Feng-Quan, L. 2009. Detection of a quorum sensing signal molecule of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* and its regulation of pathogenicity. *Chin. J. Agric. Biotechnol.* 6: 49-53.

- Taşkaya, B. and Keskin, G. 2004. Kavun-Karpuz. Tarımsal Ekonomi Araştırma Enstitüsü, TEAE Bakış, Sayı: 6, Nüsha: 9. <http://www.tepge.gov.tr/dosyalar/yayinlar/99207d99210e43499096dac3ce74886c.pdf>.
- Tian, Q., Feng, J., Hu, J. and Zhao, W. 2016. Selective detection of viable seed-borne *Acidovorax citrulli* by Real-Time PCR with propidium monoazide. *Scientific Reports*, 6: 35457.
- Tian, Y., Xu, J., Zhao, Y., Li, X., Hu, B. and Liu, F. 2010. Specific detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* by PCR (in Chinese). *Jiangsu J. Agricul. Sci.* 26: 512-516.
- TÜİK 2016. Türkiye istatistik kurumu, [www.tuik.gov.tr](http://www.tuik.gov.tr) [Ziyaret Tarihi: 03.05.2016].
- Turgut A. ve Basım H. 2014. Asmada (*Vitis vinifera*) Taç Gali hastalık etmeni *Rhizobium vitis*'in LNA Probe Kullanılarak Real-Time PCR ile Tanısı ve Tespiti. Doktora tezi, Akdeniz Üniversitesi, Antalya, 155.
- Van Kappel, A.L., Steghens, J.P., Zeleniuch-Jacquotte, A., Chajes, V., Toniolo, P. and Riboli, E. 2001. Serum carotenoids as biomarkers of fruit and vegetable consumption in the New York Women's health study. *Public Health Nutrition*, 4(3): 829-835.
- Vouldoukis, I., Lacan, D., Kamate, C., Coste, P., Calenda, A. and Mazier, D. 2004. Antioxidant and anti-inflammatory properties of a *Cucumis melo* LC. Extract rich in superoxide dismutase activity. *J.Ethnopharmacol.* 94(1): 67-75.
- Walcott, R.R. 2005. Bacterial fruit blotch of cucurbits. *The Plant Health Instructor*. DOI: 10.1094/PHI-I-2005-1025-02
- Walcott, R.R. 2008. Integrated pest management of bacterial fruit blotch in cucurbits. Integrated management of diseases caused by fungi, phytoplasma and bacteria. A. Ciancio and K. G. Mukerji, eds. *Springer*, New York. 191-209.
- Walcott, R.R. and Gitaitis, R.D., 2000. Detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in watermelon seed using immunomagnetic separation and the polymerase chain reaction. *Plant Dis.* 84: 470-474.
- Walcott, R.R., Castro, A.C., Fessehaie, A. and Ling, K. 2006. Progress towards a commercial PCR-based seed assay for *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. *Seed Sci. Technol.* 34: 101-116.
- Walcott, R.R., Fessehaie, A. and Castro, A.C. 2004. Differences in pathogenicity between two genetically distinct groups of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* on cucurbit hosts. *J. Phytopathol.* 152: 277-285.
- Walcott, R.R., Gitaitis R.D. and Castro A.C. 2003. Role of blossoms in watermelon seed infestation by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. *Phytopathol.* 93: 528-534.

- Walcott, R.R., Langston, Jr., D.B., Sanders, Jr., F.H. and Gitaitis, R.D. 2000. Investigating intraspecific variation of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* using DNA fingerprinting and whole cell fatty acid analysis. *Phytopathol.* 90: 191-196.
- Wall, G.C. and Santos, V.M. 1988. A new bacterial disease on watermelon in the Mariana Islands. *Phytopathol.* 78: 1605.
- Wang, J., Bi, Y., Zhu, Y., Han, S.Y., Zhu, X., Sheng, W.J. and Li, M. 2014. Nested-PCR rapidly detecte *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* from watermelon seeds. *Scientia Agricultura Sinica.* 47(2): 284-291.
- Wang, X., Doddapaneni, H., Chen, J., and Yokomi, R.K. 2015. Improved Real-Time PCR diagnosis of citrus stubborn disease by targeting prophage genes of *Spiroplasma citri*. *Plant Dis.* 99:149-154.
- Wang, X., Li, G., Jiang, D., and Huang, H. 2009. Screening of plant epiphytic yeasts for biocontrol of bacterial fruit blotch (*Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*) of hami melon. *Biol. Control* 50: 164-171.
- Wang, X., Wang, W, Qian, G L, et al. 2011. Cloning and functional analysis of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* partial hypersensitive response and pathogenicity(*hrp*) gene cluster[J]. *J.Agricul. Biotechnol.* 19(1): 36-44.
- Webb, R.E. and Goth, R.W. 1965. A seedborne bacterium isolated from watermelon. *Plant Dis. Rep.* 49: 818-821.
- Wechter, W.P., Levi, A., Ling, K.S., Kousik, C. and Block, C.C. 2011. Identification of resistance to *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* among melon (*Cucumis* spp.) plant introductions. *Hortscience.* 46: 207-212.
- Wehner, T.C. 2008. Watermelon In: Prohens J. and Nuez F. (eds.) Handbook of Plant Breeding; Vegetables I: Asteraceae, Brassicaceae, Chenopodiaceae, and Cucurbitaceae. Springer Science+Business LLC, New York, NY, 381- 418.
- Weller, S.A., Elphinstone, J.G., Smith, N.C., Boonham, N. and Stead, D.E. 2000. Detection of *Ralstonia solanacearum* strains with a quantitative, multiplex, Real-Time, fluorogenic PCR (TaqMan) assay. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (7): 2853-2858.
- Whitaker, T.W. and Davis, G.N. 1962. Cucurbits: Botany, Cultivation and Utilization, Leonard Hill, London, UK.
- Willems, A., Goor, M., Thielemans, S., Gillis, M., Kersters, K. and Ley, J.D. 1992. Transfer of several phytopathogenic *Pseudomonas* species to *Acidovorax* as *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* subsp. nov., comb. nov., *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae*, and *Acidovorax konjaci*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42: 107-119.
- Woese, C.R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiological Reviews.* 51: 221-271.

- Woudt, B., Beerepoot, A.J.b and Carter, L.L. 2009. A new PCR method for detection of *Acidovorax citrulli* on seed. *Phytopathol.* 99(6): S143.
- Wu, P., Ho, L., Chang, J., Tzeng, K., Deng, W. and Lin, Y. 2016. Development of a TaqMan probe-based insulated isothermal PCR (TiiPCR) for the detection of *Acidovorax citrulli*, the bacterial pathogen of watermelon fruit blotch. *Eur J Plant Pathol.* 147: 869-875.
- Xiao, W., Le, Z., Fu-Shou, X., Li-Han, Z. and Guan-Lin, X. 2007. Immuno-capture PCR method for detecting *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* from watermelon. *Chinese J.Agricul. Biotechnol.* 4-(02):173-179.
- Xiong, L.B., Liu, Q, Wang, T.C., Gao, L.P., Wang, J., Liu, S.T., Song, R., Shi, Y.B., Wang, J.P. and Wen, Z.H. 2010. An improved DAS Dot ELISA method for detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. *Microbiology China*, 37(10): 1551-1556.
- Zeng, H., Zhai, X., Xie, M. and Liu, Q. 2018. Fluorescein isothiocyanate labeling antigen based immunoassay strip for rapid detection of *Acidovorax citrulli*. *Plant Dis.* 102 (3): 527-532.
- Zhang, J., Tian, Q., Zhu, S.F., Zhao, W.J. and Liu, F.Q. 2012. Rapid on-site detection of *Acidovorax citrulli* bycross-priming amplification. *Mol. Cell Probes* 26: 175-176.
- Zhang, X.,Wu Ym., Wang, C., and Li, B. 2007. Sequence analysis of 16S rDNA and specified primers design of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*[J]. *Acta Phytopathologica Sin.* 37(3): 225-231.
- Zhao, L.H., Wang, X., Xie, G.L., Xu, F.S. and Xie, G.X. 2006. Detection for pathogen of bacterial fruit blotch of watermelon by immuno-capture PCR. *J. Agr. Biotechnol.* 14: 946-951.
- Zhao, T., Feng, J., Sechler, A., Randhawa, P., Li, J. and Schaad, N.W. 2009. An improved assay for detection of *Acidovorax citrulli* in watermelon and melon seed. *Seed Sci. and Technol.* 37: 337-349.
- Zhao, T., Sun, F., Wang, B. and Hui, W. 2001. Pathogen identification of Hami melon bacterial fruit blotch. *Acta Phytopathol. Sin.* 31: 357-364.
- Zhao, W.J., Lu, J., Ma, W.W., Xu, C.L., Kuang, H. and Zhu, S.F. 2011. Rapid on-site detection of *Acidovorax avenae* subsp *citrulli* by gold-labeled DNA strip sensor. *Biosensors and Bioelectronics.* 26: 4241-4244. doi:10.1016/j.bios.2011.04.004.
- Zhengguang, R., Lei, H., Zhiguo, S., and Liqun, Z. 2009. Screening of the pathogenicity mutants of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* and cloning of the hrcR gene. *Acta Phytopathologica Sin.* 39: 501-506.
- Zhong, J., Lin, Z.Y., Ma, Y.M., Gao, B.D., Liu, H.Q., Zhao, T.C., and Schaad, N.W. 2016. Rapid discrimination between groups I and II of *Acidovorax citrulli* using a primer pair specific to a pilL gene. *J. Phytopathol.* 164: 558-562.

## ÖZGEÇMİŞ

**NURHAN ÖZTÜRK**

**ozturkn@akdeniz.edu.tr**



### ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Doktora	Akdeniz Üniversitesi	Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma (Fitopatoloji)	2011-Halen Devam Ediyor
Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi	Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma (Fitopatoloji)	2008-2010
Lisans	Akdeniz Üniversitesi	Ziraat Fakültesi, Ziraat Mühendisliği Programı (Bitki Koruma)	2003-2007

### MESLEKİ VE İDARİ GÖREVLER

Öğr.Gör.	Akdeniz Üniversitesi, Korkuteli Meslek Yüksekokulu	2010-Halen Devam Ediyor
Program Koordinatörü	Akdeniz Üniversitesi, Korkuteli Meslek Yüksekokulu-Mantarçılık Programı	2012- Halen Devam Ediyor

## ESERLER

### Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

1. Abdulai M., Basim H., Basim E., Baki D., Öztürk N. , "Detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*, the causal agent of cassava bacterial blight diseases in cassava (*Manihot esculenta*) in Ghana by polymerase chain reaction", EUROPEAN JOURNAL OF PLANT PATHOLOGY, vol.150, pp.471-484, 2018
2. Basim H., Basim E., Baki D., Abdulai M., Öztürk N. , Balkiç R. , "Identification and characterization of *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler causing Ceratonia Blight disease of carob (*Ceratonia siliqua* L.) in Turkey", EUROPEAN JOURNAL OF PLANT PATHOLOGY, vol.151, pp.73-86, 2018
3. Basim E., Basim H., Abdulai M., Baki D., Öztürk N. , "Identification and characterization of *Alternaria alternata* causing leaf spot of olive tree (*Olea europaea*) in Turkey", CROP PROTECTION, vol.92, pp.79-88, 2017
4. Basim E., Basim H., Abdulai M., Baki D., Öztürk N. , "Identification and characterization of *Didymella bryoniae* causing gummy stem blight disease of watermelon (*Citrullus lanatus*) in Turkey", CROP PROTECTION, vol.90, pp.150-156, 2016.

### Diğer Dergilerde Yayımlanan Makaleler

1. Öztürk N. , Basim E., Basim H. 2017."Tarımda Mikorizal Fungusların Etkinliği", *Mantar Dergisi-The Journal of Fungus*, 8: 20-34.
2. Öztürk N. , Basim E., Mamay M. 2017. "Yemeklik Kültür Mantarı Üretim Alanlarında Görülen Genel Mantar Zararlıları ve Mücadelesi", *Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 21: 507-523.
3. Öztürk N. , Basim E., Basim H. 2017. "Yemeklik Kültür Mantarında (*Agaricus bisporus* (J. Lge) Imbach) YaygınGörülen Mikrobiyal Hastalıklar", *Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 21:112-125.
4. Öztürk N. , Basim H. 2015. "Karpuz yetiştiriciliğinde karpuz bakteriyel meyve lekesi hastalığı", *Agrotime*, 3: 66-67.

### Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler

1. Öztürk N. , Basim H. 2011. "Doğal enfekteli fasulye tohumlarından fasulye bakteriyel yaprak yanıklık (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*) ve bakteriyel hale lekesi (*Pseudomonas syringae* pv.*phaseolicola*) etmenlerinin Real-Time PCR ile tespiti", Türkiye IV. Tohumculuk Kongresi, SAMSUN, TÜRKİYE, 294

2. Öztürk N. , Basim H. 2014. "*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Smith 1897) Vauterin et al. 1995 ve *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* Vauterin et al. 1995'in Real-time PCR ile tanısı ve bitki dokularından tespiti.", Türkiye V. Bitki Koruma Kongresi, ANTALYA, TÜRKİYE, ss.187
3. Öztürk N. , Basim H. 2011. "Fasulye bakteriyel yaprak yanıklık (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*) ve bakteriyel hale lekesi (*Pseudomonas syringae* pv.*phaseolicola*) etmenlerinin LNA probu kullanılarak Real-Time PCR ile tespiti ve tanılanması. ", Türkiye IV. Bitki Koruma Kongresi, KAHRAMANMARAŞ, TÜRKİYE, 59.
4. Basim E., Basim H., Öztürk N. 2018. "Basal Plate Rot And Root Rot Disease Of Onion ", Uluslararası Tarım Bilimleri Kongresi, VAN, TÜRKİYE, 9-12 Mayıs, 457.
5. Basim E., Basim H., Öztürk N. , "Root and Crown rot disease caused by *Fusarium* sp. of *Azalea* (*Rhododendron* sp.)", ICAFOF 2018-2 nd International Conference on Agriculture,Forest, Food Sciences and Technologies, İZMİR, TÜRKİYE, 2- 5 Nisan 2018, pp.149-149
6. Basim E., Basim H., Öztürk N. , "Determination of prevalence of Mushroom (*Agaricus bisporus*) Green Mold Disease, caused by *Trichoderma* spp. in Korkuteli county of Antalya in Turkey", International Conference on Agriculture, Forest, Food Sciences and Technologies (ICAFOF 2017), NEVŞEHİR, TÜRKİYE, 15-17 Mayıs 2017, pp.662-662
7. Basim E., Basim H., Öztürk N. , "Antifungal activities of juniper berry oil (*Juniperus oxycedrus* L.) against *Trichoderma* sp. a causalagent of green mold disease on Mushroom (*Agaricus bisporus*)", International Symposium on New Horizons in Forestry (ISFOR 2017), ISPARTA, TÜRKİYE, 18-20 Ekim 2017, pp.-.
8. Öztürk N. , Basim H., "Identification and detection of *Acidovorax citrulli* (Schaad et.al., 2008) causal agent of watermelon bacterial fruit blotch disease by real-time PCR", 6th Plant Protection Congress with International Participation, KONYA, TÜRKİYE, 5-8 Eylül 2016, pp.546-546