

T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOMATES (*Solanum lycopersicum* L.) BAKTERİYEL ÖZ NEKROZU  
HASTALIK ETMENLERİ *Dickeya chrysanthemi*, *Pectobacterium carotovorum*  
subsp. *carotovorum*, *Pseudomonas cichorii*, *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas*  
*fluorescens*, *Pseudomonas mediterranea* VE *Pseudomonas viridiflava*'NİN LNA  
PROBE KULLANILARAK REAL-TIME PCR İLE TANISI VE HASTALIKLI  
BİTKİ DOKULARINDAN TESPİTİ

Derya BAKİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

2014



T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOMATES (*Solanum lycopersicum* L.) BAKTERİYEL ÖZ NEKROZU  
HASTALIK ETMENLERİ *Dickeya chrysanthemi*, *Pectobacterium carotovorum*  
subsp. *carotovorum*, *Pseudomonas cichorii*, *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas*  
*fluorescens*, *Pseudomonas mediterranea* VE *Pseudomonas viridiflava*'NİN LNA  
PROBE KULLANILARAK REAL-TIME PCR İLE TANISI VE HASTALIKLI  
BİTKİ DOKULARINDAN TESPİTİ

Derya BAKİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

Bu tez 2014.02.0121.019 no'lu proje olarak Akdeniz Üniversitesi Bilimsel  
Araştırmalar Proje Birimi tarafından desteklenmiştir.

2014



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

**DOMATES (*Solanum lycopersicum* L.) BAKTERİYEL ÖZ NEKROZU  
HASTALIK ETMENLERİ *Dickeya chrysanthemi*, *Pectobacterium carotovorum*  
subsp. *carotovorum*, *Pseudomonas cichorii*, *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas*  
*fluorescens*, *Pseudomonas mediterranea* VE *Pseudomonas viridiflava*'NİN LNA  
PROBE KULLANILARAK REAL-TIME PCR İLE TANISI VE HASTALIKLI  
BİTKİ DOKULARINDAN TESPİTİ**

**Derya BAKİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI**

Bu tez 08/12/2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği/Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Hüseyin BASIM

Prof. Dr. Kemal BENLİOĞLU

Yrd. Doç. Dr. Özer ÇALIŞ



## ÖZET

### DOMATES (*Solanum lycopersicum* L.) BAKTERİYEL ÖZ NEKROZU HASTALIK ETMENLERİ *Dickeya chrysanthemi*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pseudomonas cichorii*, *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas* *fluorescens*, *Pseudomonas mediterranea* VE *Pseudomonas viridiflava*'NİN LNA PROBE KULLANILARAK REAL-TIME PCR İLE TANISI VE HASTALIKLI BİTKİ DOKULARINDAN TESPİTİ

Derya BAKİ

Yüksek Lisans Tezi, Bitki Koruma Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Hüseyin BASIM

Aralık 2014, 155 sayfa

Bu çalışmada domates yetiştiriciliğinde önemli kalite ve ekonomik ürün kayıplarına sebep olan domates öz nekrozu hastalık etmenleri *Dickeya chrysanthemi*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pseudomonas cichorii*, *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mediterranea* ve *Pseudomonas viridiflava*'nın LNA (Locked Nucleic Acid) probu kullanılarak Real-Time PCR yöntemi ile hassas ve seçici olarak tanıları ve tespitleri yapılmıştır.

*Dickeya chrysanthemi*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pseudomonas cichorii*, *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mediterranea* ve *Pseudomonas viridiflava* etmenlerin her birine özel hassas primer ve prob setleri geliştirilmiştir. Geliştirilen primer ve prob setlerinin spesifikliğin belirlenmesi amacıyla farklı *Dickeya chrysanthemi*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pseudomonas cichorii*, *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mediterranea*, *Pseudomonas viridiflava* strainleri ve farklı bitki patojeni bakteriyel izolatlar kullanılmıştır. Farklı bitki patojeni bakterilerin genomlarından hiçbir amplifikasyon tespit edilmemesine rağmen, test edilen tüm yerli ve yabancı *Dickeya chrysanthemi* strainlerinden 65 bp, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* strainlerinden 63 bp, *Pseudomonas cichorii* strainlerinden 73 bp, *Pseudomonas corrugata* strainlerinden 70 bp, *Pseudomonas fluorescens* strainlerinden 70 bp, *Pseudomonas mediterranea* strainlerinden 73 bp ve *Pseudomonas viridiflava* strainlerinden 77 bp'lik amplifikasyonlar elde edilmiştir.

Bu çalışmada geliştirilen yöntemin bakteriyel hücre hassasiyet sınırı *Dickeya chrysanthemi* için 2 hücre, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* için 4 hücre, *Pseudomonas cichorii* için 4 hücre, *Pseudomonas corrugata* için 4 hücre, *Pseudomonas fluorescens* için 5 hücre, *Pseudomonas mediterranea* için 5 hücre, *Pseudomonas viridiflava* için 2 hücre olarak tespit edilmiştir. Geliştirilen yöntemin DNA düzeyindeki hasasiyet sınırı ise *Dickeya chrysanthemi* için 12 pg, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* için 11 pg, *Pseudomonas cichorii* için 14 pg, *Pseudomonas corrugata* için 14 pg, *Pseudomonas fluorescens* için 14 pg, *Pseudomonas mediterranea* için 13 pg, *Pseudomonas viridiflava* için 12 pg olarak tespit edilmiştir.

Sonuç olarak, Real-Time PCR yöntemini kullanarak her birine özel primer ve prob setleri geliştirilen domates bakteriyel öz nekrozu hastalığına sebep olan 7 farklı bakteriyel patojen; *Dickeya chrysanthemi*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pseudomonas cichorii*, *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mediterranea* ve *Pseudomonas viridiflava*'nın hem bakteriyel hücreden hem de hastalıklı bitki dokularından hızlı (17-27 dk) ve hassas bir düzeyde tanı ve tespitlerinin yapılabileceği ortaya çıkarılmıştır.

**ANAHTAR KELİMELER:** Domates, Domates Öz Nekrozu Hastalığı, *Dickeya chrysanthemi*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pseudomonas cichorii*, *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mediterranea*, *Pseudomonas viridiflava*, Real-Time PCR, Tespit, Tanı

**JÜRİ:** Prof. Dr. Hüseyin BASIM (Danışman)  
Prof. Dr. Kemal BENLİOĞLU  
Yrd. Doç. Dr. Özer ÇALIŞ



## ABSTRACT

### IDENTIFICATION AND DETECTION BY REAL-TIME PCR USING LNA PROBE OF *Dickeya chrysanthemi*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pseudomonas cichorii*, *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mediterranea* AND *Pseudomonas viridiflava*, CASUAL AGENTS OF TOMATO (*Solanum lycopersicum* L.) PITH NECROSIS DISEASE

Derya BAKİ

Msc Thesis in Plant Protection  
Supervisor: Prof. Dr. Hüseyin BASIM  
December 2014, 155 pages

In this study, *Dickeya chrysanthemi*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pseudomonas cichorii*, *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mediterranea* and *Pseudomonas viridiflava*, causal agents of tomato pith necrosis disease causing serious economical yield losses on tomato, were sensitively and selectively identified and detected in short time by Real-Time PCR methods using LNA (Locked Nucleic Acid) probes.

The sensitivity of primer and probe sets developed for *Dickeya chrysanthemi*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pseudomonas cichorii*, *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mediterranea* and *Pseudomonas viridiflava*. Primer and probe sets developed in this study were tested against different *Dickeya chrysanthemi*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pseudomonas cichorii*, *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mediterranea* and *Pseudomonas viridiflava* strains, other plant pathogenic bacteria from different genus and species. Although no amplification product was detected from genome of different species of plant pathogenic bacteria, 65 bp-amplification product of *Dickeya chrysanthemi*, 63 bp-amplification product of the *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, 73 bp-amplification product of *Pseudomonas cichorii*, 70 bp-amplification product were detected from different strains of *Pseudomonas corrugata*, 70 bp-amplification product of *Pseudomonas fluorescens*, 73 bp-amplification product of *Pseudomonas mediterranea* and 77 bp-amplification product of *Pseudomonas viridiflava*.

In this study, the detection of bacterial pathogen causing pith necrosis by Real-Time PCR was carried out from bacterial cell suspension, genomic DNA and plant material. The detection from cell suspension was carried out with precision limits of 2 cell for *Dickeya chrysanthemi*, 4 cell for *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, 4 cell for *Pseudomonas cichorii*, 4 cell for *Pseudomonas corrugata*, 5 cell for *Pseudomonas fluorescens*, 5 cell for *Pseudomonas mediterranea* and 2 cell for *Pseudomonas viridiflava*. The detection of genomic DNA in pg (picogram) of the bacterial genome was also found to be 12 pg for *Dickeya chrysanthemi*, 11 pg for *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, 14 pg for *Pseudomonas cichorii*, 14 pg for *Pseudomonas corrugata*, 14 pg for *Pseudomonas fluorescens* and 13 pg for *Pseudomonas mediterranea* 12 pg for *Pseudomonas viridiflava*.

In conclusion, Real-Time PCR method using primer and probe sets specific for each of 7 different tomato bacterial pith necrosis pathogens including *Dickeya chrysanthemi*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pseudomonas cichorii*, *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mediterranea* and *Pseudomonas viridiflava* were sensitive and quick (17-27 min.) for identification of the bacteria from the cells and for detection of the pathogens from the tomato diseased plant tissue.

**KEYWORDS:** Tomato, Tomato Pith Necrosis Disease, *Dickeya chrysanthemi*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pseudomonas cichorii*, *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mediterranea*, *Pseudomonas viridiflava*, Real-Time PCR, Detection, Diagnosis

**COMMITTEE:** Prof. Dr. Hüseyin BASIM (Supervisor)  
Prof. Dr. Kemal BENLİOĞLU  
Yrd. Doç. Dr. Özer ÇALIŞ

## ÖNSÖZ

Bu çalışma kapsamında domates bitkisinde kalite ve verimde önemli kayıplara neden olan domates öz nekrozu hastalık etmenleri *Dickeya chrysanthemi*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pseudomonas cichorii*, *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mediterranea* ve *Pseudomonas viridiflava*'nın LNA probolar kullanılarak Real-Time PCR ile tanı ve tespitleri yapılmıştır.

Bu tez çalışmasında araştırmalar ve laboratuvar çalışmalarının tümü Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Fitopatoloji Anabilim Dalı Bitki Bakteriyolojisi Laboratuvarları'nda gerçekleştirilmiştir. Çalışma kapsamında kullanılan tüm teknikleri ve gerekli donanımı sağlayan Sayın hocam Prof. Dr. Hüseyin BASIM'a bana karşı göstermiş olduğu sabır ve ilgiden dolayı teşekkür ederim.

Çalışmayı mali olarak destekleyen Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Proje Birimi'ne, çalışmalarım boyunca bana her yönden destek olan aileme, çalışma arkadaşlarıma ve bu süreçte her türlü desteği esirgemeyen değerli eşim Ahmet BAKI'ye tüm fedakarlıklardan dolayı teşekkürlerimi bir borç biliyorum.

## İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	i
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ .....	v
İÇİNDEKİLER .....	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ .....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xvi
1. GİRİŞ .....	1
2. KURAMSAL BİLGİLER ve KAYNAK TARAMALARI .....	8
2.1. <i>Dickeya chrysanthemi</i> İle İlgili Kuramsal Bilgiler .....	12
2.2. <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> İle İlgili Kuramsal Bilgiler .....	16
2.3. <i>Pseudomonas cichorii</i> İle İlgili Kuramsal Bilgiler .....	22
2.4. <i>Pseudomonas corrugata</i> İle İlgili Kuramsal Bilgiler .....	25
2.5. <i>Pseudomonas fluorescens</i> İle İlgili Kuramsal Bilgiler .....	33
2.6. <i>Pseudomonas mediterranea</i> İle İlgili Kuramsal Bilgiler .....	38
2.7. <i>Pseudomonas viridiflava</i> İle İlgili Kuramsal Bilgiler .....	42
3. MATERYAL ve METOT .....	52
3.1. Çalışmada Kullanılan Bakteriyel Strainler .....	52
3.2. Primerler ve Probların Tasarlanması .....	53
3.3. Real-Time PCR Optimizasyonu .....	60
3.4. Primerler ve Probların <i>Dickeya chrysanthemi</i> , <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> , <i>Pseudomonas cichorii</i> , <i>Pseudomonas corrugata</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Pseudomonas mediterranea</i> ve <i>Pseudomonas viridiflava</i> Strainlerine Spesifikliğinin Belirlenmesi .....	61
3.5. Primerler ve Probların Saf DNA'dan Hassasiyetinin Belirlenmesi .....	61
3.6. Direkt Bakteriyel Hücreden Primerler ve Probların Hassasiyetinin Belirlenmesi .....	62
3.7. Primerler ve Probların Seçiciliğinin Belirlenmesi .....	62
3.8. <i>Dickeya chrysanthemi</i> , <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> , <i>Pseudomonas cichorii</i> , <i>Pseudomonas corrugata</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Pseudomonas mediterranea</i> ve <i>Pseudomonas viridiflava</i> 'nın Hastalıklı Bitki Dokularından Tespiti .....	63
3.9. Real-Time Bio-PCR.....	64
4. BULGULAR.....	65
4.1. <i>Dickeya chrysanthemi</i> , <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> , <i>Pseudomonas cichorii</i> , <i>Pseudomonas corrugata</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Pseudomonas mediterranea</i> ve <i>Pseudomonas viridiflava</i> 'nın Klasik PCR ile Tanısı .....	65

4.2. <i>Dickeya chrysanthemi</i> , <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> , <i>Pseudomonas cichorii</i> , <i>Pseudomonas corrugata</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Pseudomonas mediterranea</i> ve <i>Pseudomonas viridiflava</i> 'nın Real-Time PCR ile Tanısı.....	66
4.3. Real-Time PCR ile <i>Dickeya chrysanthemi</i> , <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> , <i>Pseudomonas cichorii</i> , <i>Pseudomonas corrugata</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Pseudomonas mediterranea</i> ve <i>Pseudomonas</i> <i>viridiflava</i> Strainlerinin Tanısı.....	73
4.4. Primerler ve Probların Saf DNA'dan Hassasiyeti.....	77
4.5. Direkt Bakteriden Primerler ve Probların Hassasiyeti.....	81
4.6. Primerler ve Probların Seçiciliği.....	94
4.7. Real-Time Bio-PCR.....	107
4.8. Real-Time PCR ile Hastalıklı Bitki Dokularından <i>Dickeya chrysanthemi</i> , <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> , <i>Pseudomonas cichorii</i> , <i>Pseudomonas corrugata</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Pseudomonas</i> <i>mediterranea</i> ve <i>Pseudomonas viridiflava</i> 'nın Tespiti.....	111
5. TARTIŞMA.....	116
6. SONUÇ.....	120
7. KAYNAKLAR.....	124
ÖZGEÇMİŞ	

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

### Simgeler

<b>µg</b>	Mikrogram
<b>µl</b>	Mikrolitre
<b>°C</b>	Santigrat Derece
<b>cm</b>	Santimetre
<b>da</b>	Dekar
<b>g</b>	Gram
<b>ha</b>	Hektar
<b>IU</b>	Uluslar arası Ünite
<b>kcal</b>	Kilokalori
<b>kDa</b>	Kilo Dalton
<b>l</b>	Litre
<b>mg</b>	Miligram
<b>ml</b>	Mililitre
<b>mm</b>	Milimetre
<b>ng</b>	Nanogram
<b>pH</b>	Potenz Hidrojen
<b>pg</b>	Pikogram

### Kısaltmalar

<b>ABD</b>	Amerika Birleşik Devletleri
<b>AFLP</b>	Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizimi
<b>biovar</b>	Biyovaryete
<b>bp</b>	Baz Pairs
<b>C</b>	Sitozin
<b>C.</b>	<i>Clavibacter</i>
<b>CLP</b>	Cyclic Lipopeptid
<b>COST</b>	European Cooperation in Science and Technology
<b>Ct</b>	Eşik Döngüsü
<b>cv.</b>	Kültivar
<b>cfu</b>	Koloni Oluşturan Birim
<b>cfu/ml</b>	Mililitredeki canlı hücre sayısı
<b>CVP</b>	Crystal Violet-Pectate
<b>DAPG</b>	2,4-diacetylphloroglucinol
<b>D.</b>	<i>Dickeya</i>
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	İki Kere Distile Edilmiş Saf Su
<b>DNA</b>	Deoksiribonükleik Asit
<b>dNTP</b>	Deoksi Nükleotit Trifosfat
<b>DSM</b>	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
<b>ECL</b>	Eşdeğer Zincir Uzunluğu
<b>EDTA</b>	Etilendiamintetraasetik Asit
<b>ELISA</b>	Enzim Bağlı İmmünoabsorbent Deneyi
<b>EPPO</b>	European and Mediterranean Plant Protection Organization
<b>FAO</b>	Birleşmiş Milletler Beslenme ve Tarım Örgütü

<b>FAM</b>	Fluorescein Amidit
<b>FAME</b>	Yağ Asidi Metil Ester
<b>FPTPN</b>	Domates öz nekrozundan elde edilen floresan <i>Pseudomonas</i> strainleri
<b>G</b>	Guanin
<b>GC</b>	Guanin/Sitozin
<b>genomosp.</b>	Genomik Tür
<b>genomovar</b>	Genomik Varyete
<b>HR</b>	Hipersensitif Reaksiyon
<b>H<sub>2</sub>S</b>	
<b>IAA</b>	Indolasetik Asit
<b>IAM</b>	Indolasetamid
<b>ICMP</b>	International Collection of Microorganisms from Plants
<b>KB</b>	King's B media
<b>L.</b>	Linnaeus
<b>LNA</b>	Kilitli Nükleik Asit
<b>Mb</b>	Megabaz
<b>mcl-PHA</b>	Medium-Chain-Length Polyhydroxyalkanoates
<b>MGB</b>	Minor Groove Binding
<b>MLSA</b>	Multi Lokus Sequence Analiz
<b>MTBE</b>	Methyl-tetr butyl ether
<b>NA</b>	Nutrient Agar
<b>NaCl</b>	Sodyum Klorür
<b>NCBI</b>	National Center for Biotechnology Information
<b>NCPPB</b>	National Collection of Plant Pathogenic Bacteria
<b>NDA</b>	Nutrient Agar + 1% Dextrose
<b>NSA</b>	Nutrient Sakkaroz Agar
<b>OD</b>	Optik Yoğunluk
<b>P.</b>	<i>Pectobacterium</i>
<b>P.</b>	<i>Pseudomonas</i>
<b>PCR</b>	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>PCWDE</b>	Plant Cell Wall Degrading Enzymes
<b>PDA</b>	Patates Dekstroz Agar
<b>Pel</b>	Pectate Lyase
<b>Peh</b>	Polygalacturonase
<b>PF</b>	<i>Pseudomonas</i> Agar F
<b>PFGE</b>	Pulsed-Field Jel Elektroforez
<b>Pme</b>	Pectin Methyl Esterase
<b>Pnl</b>	Pectin Lyase
<b>pv.</b>	Patovar
<b>RAPD</b>	Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA
<b>rDNA</b>	Ribozomal Deoksiribonükleik Asit
<b>rep-PCR</b>	Tekrarlı Dizi Bazlı PCR
<b>RFLP</b>	Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi
<b>RNA</b>	Ribonükleik Asit
<b>rRNA</b>	Ribozomal Ribonükleik Asit
<b>RS</b>	Roy&Sasser
<b>S</b>	Svedberg Katsayısı
<b>S.</b>	<i>Solanum</i>

<b>SCAR</b>	Sekansı Karakterize Edilmiş oğaltılan Bölge
<b>ssp.</b>	Tür
<b>SSR</b>	Short-Sequence DNA Repeats
<b>subsp.</b>	Alt Tür
<b>syn.</b>	Sinonim
<b>SYBR</b>	Synergy Brands
<b>TAMRA</b>	Karboksitetrametilrodamin
<b>TAE</b>	Tris Asetik Asit EDTA
<b>Taq</b>	<i>Thermus aquaticus</i>
<b>tRNA</b>	Taşıyıcı Ribonükleik Asit
<b>U</b>	Ünite
<b>URP</b>	Universal rice primers
<b>UV</b>	Ultra Viyole
<b>Vir</b>	Virölens
<b>Xav</b>	<i>Xanthomonas axonopodis vesicatoria</i>
<b>YDC</b>	Yeast Dextrose Carbonate
<b>3'</b>	DNA molekülünün 3' terminal hidroksil ucu of DNA
<b>5'</b>	DNA molekülünün 5' terminal fosfat ucu of DNA



## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Dünya’da domates üretim miktarları .....	2
Şekil 1.2. Domates bakteriyel öz nekrozu hastalığının domates gövdesindeki belirtisi ...	5
Şekil 2.1. Domates bakteriyel öz nekrozu hastalığının domates gövdesindeki belirtisi..	11
Şekil 2.2. Domates bakteriyel öz nekrozu hastalığı sonucu domates gövdesinde ortaya çıkan adventif kök oluşumu.....	11
Şekil 2.3. <i>Dickeya chrysanthemi</i> ’nin neden olduğu domates bakteriyel öz nekrozu hastalığının domates yaprağındaki belirtisi (A), gövde öz kısmındaki belirtisi (B).....	13
Şekil 2.4. Nutrient Agar besi ortamında <i>Dickeya chrysanthemi</i> ’nin koloni gelişimi .....	14
Şekil 2.5. Nutrient Agar besi ortamında <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> ’un koloni gelişimi .....	17
Şekil 2.6. Şekil 2.2.2 <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> ’un neden olduğu domates bakteriyel öz nekrozu hastalığının domates bitkilerinin gövde yüzeyindeki belirtisi (A,B), öz kısmındaki belirtisi (C) .....	18
Şekil 2.7. <i>Pseudomonas cichorii</i> ’nin enfeksiyonu sonucunda domates gövdesindeki meydana gelen tipik gövde lekeleri (A, B, C), gövde öz kısmındaki nekroz belirtisi (C).....	23
Şekil 2.8. Nutrient Agar besi ortamında <i>Pseudomonas cichorii</i> ’nin koloni gelişimi .....	24
Şekil 2.9. Nutrient Agar besi ortamında <i>Pseudomonas corrugata</i> ’nın koloni gelişimi..	27
Şekil 2.10. <i>Pseudomonas corrugata</i> ’nın neden olduğu domates bakteriyel öz nekrozu hastalığının domates bitkilerinin öz kısmındaki belirtisi .....	28
Şekil 2.11. A. <i>Pseudomonas fluorescens</i> ’in King’s B ortamındaki görüntüsü, B. UV ışığı altındaki floresan görüntüsü .....	34
Şekil 2.12. <i>Pseudomonas fluorescens</i> ’in enfeksiyonu sonucunda domates gövdesindeki öz nekrozu belirtisi (A), domates gövdesinde ortaya çıkan adventif kök oluşumu (B) .....	34
Şekil 2.13. <i>Pseudomonas mediterranea</i> ’nın enfeksiyonu sonucunda domates gövdesindeki öz nekrozu belirtisi (A), hastalık sonucu domates gövdesinde ortaya çıkan adventif kök oluşumu (B).....	39
Şekil 2.14. Nutrient Agar besi ortamında <i>Pseudomonas mediterranea</i> ’nın koloni gelişimi .....	39
Şekil 2.15. Nutrient Agar besi ortamında <i>Pseudomonas viridiflava</i> ’nın koloni gelişimi .....	44
Şekil 2.16. <i>Pseudomonas viridiflava</i> ’nın neden olduğu domates bakteriyel öz nekrozu hastalığının domates bitkilerinin öz kısmındaki belirtisi.....	45
Şekil 3.1. Real-Time PCR’da <i>Dickeya chrysanthemi</i> ’nin tanısı için kullanılan HBDCL ve HBDCR primerlerinin ve probun gen üzerindeki bağlanma yerleri (Yeşil renk: Real-Time PCR primerlerini, Kırmızı renk: Probu temsil etmektedir) .....	58

Şekil 3.2. Real-Time PCR’da <i>P. carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> ’un tanısı için kullanılan HBPCCL ve HBPCR primerlerinin ve probun gen üzerindeki bağlanma yerleri (Yeşil renk: Real-Time PCR primerlerini, Kırmızı renk: Probu temsil etmektedir) .....	58
Şekil 3.3. Real-Time PCR’da <i>Pseudomonas cichorii</i> ’nin tanısı için kullanılan HBPCİL ve HBPCİR primerlerinin ve probun gen üzerindeki bağlanma yerleri (Yeşil renk: Real-Time PCR primerlerini, Kırmızı renk: Probu temsil etmektedir).....	59
Şekil 3.4. Real-Time PCR’da <i>Pseudomonas corrugata</i> ’nın tanısı için kullanılan HBPCIL ve HBPCR primerlerinin ve probun gen üzerindeki bağlanma yerleri (Yeşil renk: Real-Time PCR primerlerini, Kırmızı renk: Probu temsil etmektedir) .....	59
Şekil 3.5. Real-Time PCR’da <i>Pseudomonas fluorescens</i> ’in tanısı için kullanılan HBPFIL ve HBPFIR primerlerinin ve probun gen üzerindeki bağlanma yerleri (Yeşil renk: Real-Time PCR primerlerini, Kırmızı renk: Probu temsil etmektedir) .....	59
Şekil 3.6. Real-Time PCR’da <i>Pseudomonas mediterranea</i> ’nın tanısı için kullanılan HBPMIL ve HBPMIR primerlerinin ve probun gen üzerindeki bağlanma yerleri (Yeşil renk: Real-Time PCR primerlerini, Kırmızı renk: Probu temsil etmektedir).....	60
Şekil 3.7. Real-Time PCR’da <i>Pseudomonas viridiflava</i> ’nın tanısı için kullanılan HBPVIL ve HBPVIR primerlerinin ve probun gen üzerindeki bağlanma yerleri (Yeşil renk: Real-Time PCR primerlerini, Kırmızı renk: Probu temsil etmektedir).....	60
Şekil 4.1. 1- <i>Pseudomonas corrugata</i> (1100-bp), 2- <i>Pseudomonas mediterranea</i> (600-bp), 3- <i>Pseudomonas viridiflava</i> (180-bp), 4- <i>Pseudomonas cichorii</i> (890-bp), 5- <i>Pseudomonas fluorescens</i> (560-bp), 6- <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> (400-bp) ve 7- <i>Dickeya chrysanthemi</i> (171-bp)’nin Klasik PCR ile Tanısı. M, markeri; NK, Negatif kontrolü sembolize etmektedir.....	65
Şekil 4.2. <i>Dickeya chrysanthemi</i> ’nin Real-Time PCR ile Tanısı.....	66
Şekil 4.3. <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> ’un Real-Time PCR ile Tanısı.....	67
Şekil 4.4. <i>Pseudomonas cichorii</i> ’nin Real-Time PCR ile Tanısı.....	67
Şekil 4.5. <i>Pseudomonas corrugata</i> ’nın Real-Time PCR ile Tanısı .....	68
Şekil 4.6. <i>Pseudomonas fluorescens</i> ’in Real-Time PCR ile Tanısı .....	68
Şekil 4.7. <i>Pseudomonas mediterranea</i> ’nın Real-Time PCR ile Tanısı.....	69
Şekil 4.8. <i>Pseudomonas viridiflava</i> ’nın Real-Time PCR ile Tanısı .....	69
Şekil 4.9. <i>Dickeya chrysanthemi</i> ’nin SYBR Green-melt grafiği .....	70
Şekil 4.10. <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> ’un SYBR Green-melt grafiği .....	70
Şekil 4.11. <i>Pseudomonas cichorii</i> ’nin SYBR Green-melt grafiği .....	71

Şekil 4.12. <i>Pseudomonas corrugata</i> 'nın SYBR Green-melt grafiği.....	71
Şekil 4.13. <i>Pseudomonas fluorescens</i> 'in SYBR Green-melt grafiği .....	72
Şekil 4.14. <i>Pseudomonas mediterranea</i> 'nın SYBR Green-melt grafiği .....	72
Şekil 4.15. <i>Pseudomonas viridiflava</i> 'nın SYBR Green-melt grafiği.....	73
Şekil 4.16. <i>Dickeya chrysanthemi</i> Strainlerinin Real-Time PCR ile Tanısı .....	74
Şekil 4.17. <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> Strainlerinin Real-Time PCR ile Tanısı.....	74
Şekil 4.18. <i>Pseudomonas cichorii</i> Strainlerinin Real-Time PCR ile Tanısı .....	75
Şekil 4.19. <i>Pseudomonas corrugata</i> Strainlerinin Real-Time PCR ile Tanısı.....	75
Şekil 4.20. <i>Pseudomonas fluorescens</i> Strainlerinin Real-Time PCR ile Tanısı .....	76
Şekil 4.21. <i>Pseudomonas mediterranea</i> Strainlerinin Real-Time PCR ile Tanısı .....	76
Şekil 4.22. <i>Pseudomonas viridiflava</i> Strainlerinin Real-Time PCR ile Tanısı.....	77
Şekil 4.23. <i>Dickeya chrysanthemi</i> 'nin tespitinde kullanılan primer ve prob setinin saf DNA'dan hassasiyeti .....	78
Şekil 4.24. <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> 'un tespitinde kullanılan primer ve prob setinin saf DNA'dan hassasiyeti.....	78
Şekil 4.25. <i>Pseudomonas cichorii</i> 'nin tespitinde kullanılan primer ve prob setinin saf DNA'dan hassasiyeti .....	79
Şekil 4.26. <i>Pseudomonas corrugata</i> 'nın tespitinde kullanılan primer ve prob setinin saf DNA'dan hassasiyeti. ....	79
Şekil 4.27. <i>Pseudomonas fluorescens</i> 'nin tespitinde kullanılan primer ve prob setinin saf DNA'dan hassasiyeti .....	80
Şekil 4.28. <i>Pseudomonas mediterranea</i> 'nın tespitinde kullanılan primer ve prob setinin saf DNA'dan hassasiyeti. ....	80
Şekil 4.29. <i>Pseudomonas viridiflava</i> 'nın tespitinde kullanılan primer ve prob setinin saf DNA'dan hassasiyeti. ....	81
Şekil 4.30. <i>Dickeya chrysanthemi</i> (A), <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> (B), <i>Pseudomonas cichorii</i> (C), <i>Pseudomonas corrugata</i> (D)'nin Bakteri hassasiyet çalışmasında NA besi ortamında $10^{-7}$ seyreltmede tespit edilen en az bakterinin tespiti .....	85
Şekil 4.31. <i>Pseudomonas fluorescens</i> (E), <i>Pseudomonas mediterranea</i> (F) ve <i>Pseudomonas viridiflava</i> (G) Bakteri hassasiyet çalışmasında NA besi ortamında $10^{-7}$ seyreltmede tespit edilen en az bakterinin tespiti.....	86
Şekil 4.32. <i>Dickeya chrysanthemi</i> 'nin bakteri hassasiyet tespiti .....	87
Şekil 4.33. <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> 'un bakteri hassasiyet tespiti.....	88
Şekil 4.34. <i>Pseudomonas cichorii</i> 'nin bakteri hassasiyet tespiti .....	89
Şekil 4.35. <i>Pseudomonas corrugata</i> 'nın bakteri hassasiyet tespiti.....	90
Şekil 4.36. <i>Pseudomonas fluorescens</i> 'nin bakteri hassasiyet tespiti.....	91
Şekil 4.37. <i>Pseudomonas mediterranea</i> 'nın bakteri hassasiyet tespiti .....	92
Şekil 4.38. <i>Pseudomonas viridiflava</i> 'nın bakteri hassasiyet tespiti .....	93
Şekil 4.39. <i>Dickeya chrysanthemi</i> strainlerinin tespiti için tasarlanan primer ve prob setinin diğer öz nekrozu patojeni bakteri türlerine karşı spesifikliğinin belirlenmesi.....	94
Şekil 4.40. <i>Dickeya chrysanthemi</i> strainlerinin tespiti için tasarlanan primer ve prob setinin diğer bitki patojeni bakteri türlerine karşı spesifikliğinin belirlenmesi.....	95

Şekil 4.41. <i>P. carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> strainlerinin tespiti için tasarlanan primer ve prob setinin diğer öz nekrozu patojeni bakteri türlerine karşı spesifikliğinin belirlenmesi .....	96
Şekil 4.42. <i>P. carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> strainlerinin tespiti için tasarlanan primer ve prob setinin diğer bitki patojeni bakteri türlerine karşı spesifikliğinin belirlenmesi .....	97
Şekil 4.43. <i>Pseudomonas cichorii</i> strainlerinin tespiti için tasarlanan primer ve prob setinin diğer öz nekrozu patojeni bakteri türlerine karşı spesifikliğinin belirlenmesi .....	98
Şekil 4.44. <i>Pseudomonas cichorii</i> strainlerinin tespiti için tasarlanan primer ve prob setinin diğer bitki patojeni bakteri türlerine karşı spesifikliğinin belirlenmesi .....	99
Şekil 4.45. <i>Pseudomonas corrugata</i> strainlerinin tespiti için tasarlanan primer ve prob setinin diğer öz nekrozu patojeni bakteri türlerine karşı spesifikliğinin belirlenmesi .....	100
Şekil 4.46. <i>Pseudomonas corrugata</i> strainlerinin tespiti için tasarlanan primer ve prob setinin diğer bitki patojeni bakteri türlerine karşı spesifikliğinin belirlenmesi .....	101
Şekil 4.47. <i>Pseudomonas fluorescens</i> strainlerinin tespiti için tasarlanan primer ve prob setinin diğer öz nekrozu patojeni bakteri türlerine karşı spesifikliğinin belirlenmesi .....	102
Şekil 4.48. <i>Pseudomonas fluorescens</i> strainlerinin tespiti için tasarlanan primer ve prob setinin diğer bitki patojeni bakteri türlerine karşı spesifikliğinin belirlenmesi .....	103
Şekil 4.49. <i>Pseudomonas mediterranea</i> strainlerinin tespiti için tasarlanan primer ve prob setinin diğer öz nekrozu patojeni bakteri türlerine karşı spesifikliğinin belirlenmesi .....	104
Şekil 4.50. <i>Pseudomonas mediterranea</i> strainlerinin tespiti için tasarlanan primer ve prob setinin diğer bitki patojeni bakteri türlerine karşı spesifikliğinin belirlenmesi .....	105
Şekil 4.51. <i>Pseudomonas viridiflava</i> strainlerinin tespiti için tasarlanan primer ve prob setinin diğer öz nekrozu patojeni bakteri türlerine karşı spesifikliğinin belirlenmesi .....	106
Şekil 4.52. <i>Pseudomonas viridiflava</i> strainlerinin tespiti için tasarlanan primer ve prob setinin diğer bitki patojeni bakteri türlerine karşı spesifikliğinin belirlenmesi .....	107
Şekil 4.53. Tasarlanan primer ve prob seti ile canlı <i>Dickeya chrysanthemi</i> straininin tespiti .....	108
Şekil 4.54. Tasarlanan primer ve prob seti ile canlı <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> straininin tespiti .....	108
Şekil 4.55. Tasarlanan primer ve prob seti ile canlı <i>Pseudomonas cichorii</i> straininin tespiti .....	109
Şekil 4.56. Tasarlanan primer ve prob seti ile canlı <i>Pseudomonas corrugata</i> straininin tespiti .....	109
Şekil 4.57. Tasarlanan primer ve prob seti ile canlı <i>Pseudomonas fluorescens</i> straininin tespiti .....	110
Şekil 4.58. Tasarlanan primer ve prob seti ile canlı <i>Pseudomonas mediterranea</i> straininin tespiti .....	110

Şekil 4.59. Tasarlanan primer ve prob seti ile canlı <i>Pseudomonas viridiflava</i> straininin tespiti .....	111
Şekil 4.60. Öz nekrozu etmenlerinin domates bitkilerine inokulasyonundan bir ay sonra gövdede meydana getirdiği simptomlar A. <i>Dickeya chrysanthemi</i> (öz nekrozu), B. <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> , (öz nekrozu) C. <i>Pseudomonas cichorii</i> (öz nekrozu ve gövde lekeleri), D. <i>Pseudomonas corrugata</i> (öz nekrozu), E. <i>Pseudomonas fluorescens</i> (öz nekrozu), F. <i>Pseudomonas mediterranea</i> (öz nekrozu), G. <i>Pseudomonas viridiflava</i> (öz nekrozu) .....	112
Şekil 4.61. Tasarlanan primer ve prob seti ile <i>Dickeya chrysanthemi</i> straininin enfekteli bitki dokusundan tespiti .....	112
Şekil 4.62. Tasarlanan primer ve prob seti ile <i>P. carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> straininin enfekteli bitki dokusundan tespiti .....	112
Şekil 4.63. Tasarlanan primer ve prob seti ile <i>Pseudomonas cichorii</i> straininin enfekteli bitki dokusundan tespiti .....	113
Şekil 4.64. Tasarlanan primer ve prob seti ile <i>Pseudomonas corrugata</i> straininin enfekteli bitki dokusundan tespiti .....	113
Şekil 4.65. Tasarlanan primer ve prob seti ile <i>Pseudomonas fluorescens</i> straininin enfekteli bitki dokusundan tespiti .....	114
Şekil 4.66. Tasarlanan primer ve prob seti ile <i>Pseudomonas mediterranea</i> straininin enfekteli bitki dokusundan tespiti .....	114
Şekil 4.67. Tasarlanan primer ve prob seti ile <i>Pseudomonas viridiflava</i> straininin enfekteli bitki dokusundan tespiti .....	115

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Türkiye’de en fazla üretimi yapılan sebzelerin 2001-2013 yılları arasındaki toplam üretim miktarları .....	3
Çizelge 2.1. Ortalama büyüklükte (123 g) olgun bir domatesin Birleşik Devletler Tarım Bakanlığı (USDA, United States Department of Agriculture) Milli Gıda Standart Referans Veritabanı’ na göre kimyasal içeriği.....	10
Çizelge 2.2. <i>Dickeya chrysanthemi</i> ’nin bilimsel sınıflandırılması .....	12
Çizelge 2.3. <i>Pectobacterium carotovorum</i> ’un bilimsel sınıflandırılması .....	16
Çizelge 2.4. <i>Pseudomonas cichorii</i> ’nin bilimsel sınıflandırılması .....	23
Çizelge 2.5. <i>Pseudomonas corrugata</i> ’nın bilimsel sınıflandırılması.....	26
Çizelge 2.6. <i>Pseudomonas fluorescens</i> ’nin bilimsel sınıflandırılması .....	33
Çizelge 2.7. <i>Pseudomonas mediterranea</i> ’nın bilimsel sınıflandırılması .....	39
Çizelge 2.8. <i>Pseudomonas viridiflava</i> ’nın bilimsel sınıflandırılması .....	42
Çizelge 3.1. Real-Time PCR’da test edilen yerli <i>Dickeya chrysanthemi</i> , <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> , <i>Pseudomonas cichorii</i> , <i>Pseudomonas corrugata</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Pseudomonas mediterranea</i> ve <i>Pseudomonas viridiflava</i> strainleri .....	52
Çizelge 3.2. Real-Time PCR’da test edilen yabancı <i>Dickeya chrysanthemi</i> , <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> , <i>Pseudomonas cichorii</i> , <i>Pseudomonas corrugata</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Pseudomonas mediterranea</i> ve <i>Pseudomonas viridiflava</i> strainleri.....	53
Çizelge 3.3. Real-Time PCR’da kullanılan farklı bitki patojeni bakteriler .....	53
Çizelge 3.4. <i>Dickeya chrysanthemi</i> strainlerinin klasik PCR ile tanı ve tespitinin gerçekleştirilmesi amacıyla hazırlanan PCR programı.....	54
Çizelge 3.5. <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> strainlerinin klasik PCR ve Nested PCR ile tanı ve tespitinin gerçekleştirilmesi amacıyla hazırlanan PCR programı .....	55
Çizelge 3.6. <i>Pseudomonas cichorii</i> strainlerinin klasik PCR ile tanı ve tespitinin gerçekleştirilmesi amacıyla hazırlanan PCR programı.....	55
Çizelge 3.7. <i>Pseudomonas corrugata</i> strainlerinin klasik PCR ile tanı ve tespitinin gerçekleştirilmesi amacıyla hazırlanan PCR programı.....	55
Çizelge 3.8. <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Pseudomonas viridiflava</i> , strainlerinin klasik PCR ile tanı ve tespitinin gerçekleştirilmesi amacıyla hazırlanan PCR programı .....	55
Çizelge 3.9. <i>Pseudomonas mediterranea</i> strainlerinin klasik PCR ile tanı ve tespitinin gerçekleştirilmesi amacıyla hazırlanan PCR programı .....	56
Çizelge 3.10. Klasik PCR yöntemi ile <i>Dickeya chrysanthemi</i> , <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> , <i>Pseudomonas cichorii</i> , <i>Pseudomonas corrugata</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Pseudomonas mediterranea</i> ve <i>Pseudomonas viridiflava</i> etmenlerinin tanısı için kullanılan primerler ....	57

Çizelge 3.11. Real-Time PCR yöntemi ile <i>Dickeya chrysanthemi</i> , <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> , <i>Pseudomonas cichorii</i> , <i>Pseudomonas corrugata</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Pseudomonas mediterranea</i> ve <i>Pseudomonas viridiflava</i> 'nın tanısı için geliştirilmiş olan primerler.....	57
Çizelge 3.12. Real-Time PCR yöntemi ile <i>Dickeya chrysanthemi</i> , <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> , <i>Pseudomonas cichorii</i> , <i>Pseudomonas corrugata</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Pseudomonas mediterranea</i> ve <i>Pseudomonas viridiflava</i> 'nın tanısı için geliştirilmiş olan probalar .....	58
Çizelge 3.13. Real-Time PCR optimizasyonu sonucunda <i>Dickeya chrysanthemi</i> , <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> , <i>Pseudomonas corrugata</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> ve <i>Pseudomonas viridiflava</i> için oluşturulan Real-Time PCR programı .....	60
Çizelge 3.14. Real-Time PCR optimizasyonu sonucunda <i>Pseudomonas cichorii</i> için oluşturulan Real-Time PCR programı.....	61
Çizelge 3.15. Real-Time PCR optimizasyonu sonucunda <i>Pseudomonas mediterranea</i> için oluşturulan Real-Time PCR programı.....	61
Çizelge 4.1. Real-Time PCR ile ve <i>Dickeya chrysanthemi</i> 'nin direkt bakteriyel hücreden tespiti ve hassasiyet limitlerinin belirlenmesi .....	82
Çizelge 4.2. Real-Time PCR ile <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> 'un direkt bakteriyel hücreden tespiti ve hassasiyet limitlerinin belirlenmesi .....	82
Çizelge 4.3. Real-Time PCR ile <i>Pseudomonas cichorii</i> 'nin direkt bakteriyel hücreden tespiti ve hassasiyet limitlerinin belirlenmesi.....	83
Çizelge 4.4. Real-Time PCR ile <i>Pseudomonas corrugata</i> 'nın direkt bakteriyel hücreden tespiti ve hassasiyet limitlerinin belirlenmesi .....	83
Çizelge 4.5. Real-Time PCR ile <i>Pseudomonas fluorescens</i> 'in direkt bakteriyel hücreden tespiti ve hassasiyet limitlerinin belirlenmesi .....	84
Çizelge 4.6. Real-Time PCR ile <i>Pseudomonas mediterranea</i> 'nın direkt bakteriyel hücreden tespiti ve hassasiyet limitlerinin belirlenmesi.....	84
Çizelge 4.7. Real-Time PCR ile <i>Pseudomonas viridiflava</i> 'nın direkt bakteriyel hücreden tespiti ve hassasiyet limitlerinin belirlenmesi .....	85





## 1. GİRİŞ

Bakteriler, bitkilerin yeryüzündeki dağılımını, gelişimini ve verimini etkileyen en önemli biyotik faktörlerden biridir. Günümüzde yeryüzündeki toplam kullanılabilir tarım alanlarının çoğu bakterilerin saldırılarına maruz kalmaktadır. Her yıl ortalama 90 milyonluk artış gösteren Dünya nüfusunun 2050 yılında 8,5 milyara ulaşabileceği düşünüldüğünde, Dünya nüfusundaki artış ile tarımsal alanların ve tarımsal üretimin biyotik ve abiyotik streslere bağlı olarak azalmasının, özellikle insan beslenmesi için bir tehlike oluşturacağı beklenmektedir. Ülkemizde ve Dünya’da hastalık ve zararlardan kaynaklanan ürün kayıpları giderek artan gıda talebi ve tüketiminin yanında küçümsenecek miktarda değildir (Anonim 2011). Ülkemizde yetiştirilen kültür bitkilerinde ekonomik olarak zarara neden olan toplam 528 hastalık etmeni, zararlı ve yabancı ot bulunmaktadır. Bunlarla gerekli mücadele çalışmaları yapılmadığında ürün kaybı ortalama %35 dolaylarında olmaktadır. Bu kaybın kültür bitkisine, zararlı ve hastalık etmeninin tür ve yoğunluğuna bağlı olarak bazen %100'lere ulaşabilmesi mümkündür (Anonim 2011). Bu nedenle gıda talebinin artmasına karşın tarım alanlarının kısıtlı oluşu, mevcut tarım alanlarından yüksek verim elde etme çabasını gündeme getirmiştir. Araştırmacıları yüksek verimli çeşitler geliştirmenin yanında biyotik mikroorganizmaların ve abiyotik çevresel faktörlerin etkilerini moleküler düzeyde tanıyıp paralelinde dayanıklı çeşit ve mücadele yöntemlerini geliştirmeye yönlendirmiştir. Bitkisel üretimde ekonomik yönden oldukça büyük rakamlara ulaşan bu kayıpların önlenmesi için bitki koruma ve moleküler çalışmalara yeterli önemi vermek gerekmektedir. Hastalıklara neden olan patojenlerin tanılarının moleküler yöntemlerle kısa sürede doğru bir şekilde yapılması, ekimden önce temiz üretim materyaliyle başlanmasını mümkün kılarak sonradan meydana gelen enfeksiyonlarda erken mücadelenin doğru ve zamanında yapılmasına, meydana gelecek ciddi kayıpların önlenmesine katkı sağlamıştır (Basım ve Öztürk 2010).

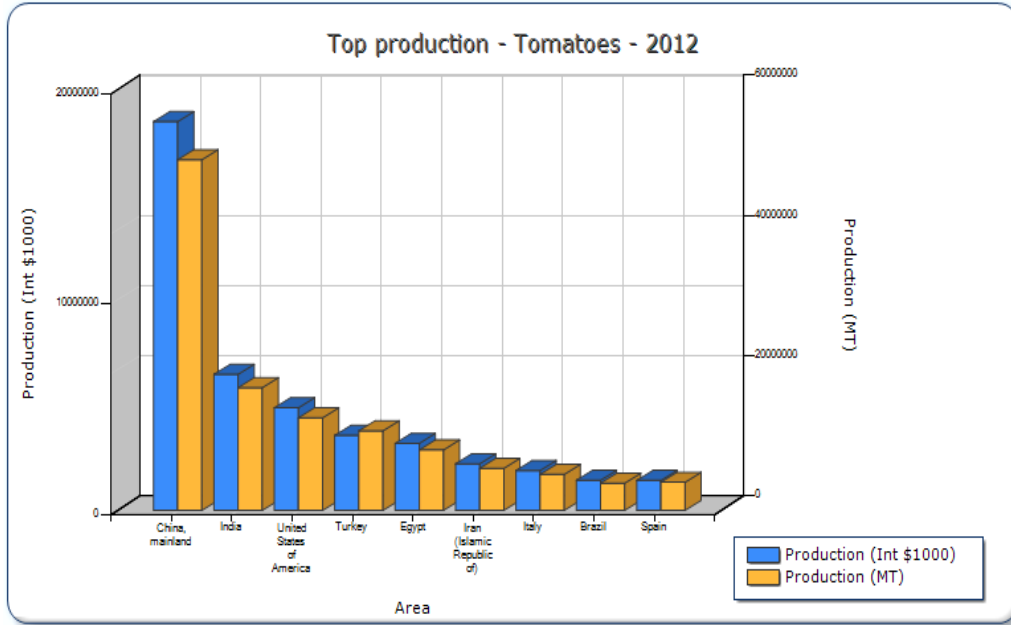
İçerdiği çeşitli mineral ve vitaminler ile insan sağlığı için yararlı gıda maddelerinden biri olan domates, Dünya’da yaygın olarak üretimi yapılan ve severek tüketilen en önemli sebze türlerinden biridir. Solanaceae familyasının *Solanum* cinsine bağlı tek yıllık, meyvesi yenen bir sebzedir (*Solanum lycopersicum* L.). Domatesin anavatanı, Peru ve Ekvador’un yer aldığı Güney Amerika ülkeleridir. Domates, ilk defa Meksikalılar tarafından kültüre alınmış ve Yeni Dünya’nın keşfinden sonra Amerika’dan Avrupa’ya ve Dünya’nın diğer taraflarına yayılmıştır. Ülkemize 1900 yılların başlarında Adana’da yetiştirilmeye başlanmıştır (Anonim 2011). Günümüzde, kısa vejetasyon süresinde yüksek verimliliği ile her yıl artan üretim ve tüketim miktarıyla yüksek ticari öneme sahip bir bitki türüdür (Anonim 2011).

Ülkemiz ekonomisinde çok önemli bir yeri olan domates, yetiştirildiği bölgelerde çiftçilerimizin önemli gelir kaynaklarından birini oluşturmaktadır. Ucuz ve bol vitamin kaynağı olan domates besleyici ve lezzetli özelliğinden dolayı Dünya’nın birçok ülkesinde en çok üretilen sebzelerdendir. Turfanda olarak yetiştirilebilmesi nedeni ile her mevsimde tüketilebilmektedir. 100 g taze domatesin % 94,1’i su dur. Yenildiği zaman 23 kalori verir. İçerisinde A, B1, B, B6, C, K vitaminleri, niasin, protein, yağ, karbonhidrat, potasyum, kalsiyum, demir ve yüksek miktarda likopen bulunmaktadır. İçerisindeki A, B6, B1, C vitaminlerinin ve likopenin bir antioksidan olarak değişik kanser türlerine ve kalp hastalıklarına karşı koruyucu etkisi vardır. Taze

olarak yenildiği gibi, salça, kuru, domates suyu, konserve, turşu, reçel, ketçap şeklinde de tüketilmektedir (Anonim 2008-a). Özellikle de salça ve ketçap endüstrisinde ihracatı ile ülkemize önemli bir döviz girdisi sağlayan sebzeler arasındadır (Şeniz 1992).

Sağlık ve beslenme yönünden çok yararlı olan domates, Dünya’da ve Türkiye’de taze ve işlenerek tüketimi en başta gelen sebzeler arasında yer almaktadır (Aybak ve Kaygısız 2004). Ülkemizin iklim koşullarının domatesin yetiştirilmesi için çok uygun olması, bu sebzeyle işleyecek sanayinin 1970’li yıllardan itibaren hızla kurulmuş olması, bu sebzeyle olan yönelmeyi hızlandırmış ve Türkiye domates üretiminde Dünya ülkeleri arasında alt sıralardan hızla üst sıralara tırmanarak Amerika ve İtalya gibi üretim devlerinin arasına girmiştir. Ayrıca sadece üretimin miktarı arttırılmamış, domatesten elde edilen işlenmiş domates ürünleri çeşitlendirilmiş, kaliteli ürün satın alan Japonya, Kanada ve ABD pazarına da mal satabilecek bir üretim miktarı ve kalitesine ulaşılmıştır. Bugün Türkiye üretim miktarı ve ürün kalitesi ile pek çok ülkeyi geride bırakarak ilk dört arasına girmeyi başarmıştır (Anonim 2009).

Ülkemiz, Dünya’da 113.5 milyon ton domates üretim miktarıyla Çin, Hindistan ve Amerika Birleşik Devletleri’nden sonra dördüncü sırada yer almaktadır (Anonim 2012) (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. Dünya’da domates üretim miktarları

Birleşmiş Milletler Beslenme ve Tarım Örgütü (FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations) 2012 yılı tahminlerine göre ülkemizde 300.000 hektarlık alanda domates üretimi yapılmaktadır.

Türkiye’den dış satımı yapılan yaş meyve ve sebze grubunda gerek miktar, gerekse değer olarak ilk sırada domates yer almaktadır. Türkiye Yaş Meyve Sebze İhracatçı Birlikleri’nin (TYMSİB) verilerine göre, 2012 yılında 1 milyon 77 bin 225 ton taze sebze ihraç edilirken, 2013 yılında ihracat yüzde 15 artışla 1 milyon 242 bin 980

tona, 644 milyon 854 bin dolar olan ihracat değeri ise yüzde 7'lik artışla 692 milyon 53 bin dolara ulaştı. Bu dönemde, sektör ihracatının değer bakımından yüzde 57'sini, miktar bakımından ise yüzde 40'ını kapsayan domates, ihraç miktarı ve geliri en yüksek ürün olduğu bildirilmiştir (Anonim 2014-a).

Türkiye İstatistik Kurumu'nun (TÜİK) 2013 yılı verilerine göre; sebze üretimi içinde, 11.820.000 ton üretim miktarıyla domates ilk sırada yer almaktadır. Domatesi 3.887.324 ton üretimle karpuz, 2.159.348 ton üretimle biber, 1.754.613 ton üretimle hıyar ve 826.941 ton üretimle patlıcan izlemektedir (Çizelge 1.1).

Çizelge 1.1. Türkiye'de en fazla üretimi yapılan sebzelerin 2001-2013 yılları arasındaki toplam üretim miktarları (Anonim 2013).

Yıl	Domates	Hıyar	Kavun	Karpuz	Patlıcan	Dolmalık Biber	Sivri Biber
2001	8 425 000	1 740 000	1 775 000	4 020 000	945 000	410 000	1 150 000
2002	9 450 000	1 670 000	1 820 000	4 575 000	955 000	410 000	1 340 000
2003	9 820 000	1 783 120	1 735 000	4 215 000	935 000	420 000	1 370 000
2004	9 440 000	1 725 000	1 750 000	3 825 000	900 000	375 000	710 000
2005	10 050 000	1 745 000	1 825 000	3 970 000	930 000	400 000	744 000
2006	9 854 877	1 799 613	1 765 605	3 805 306	924 165	392 617	775 577
2007	9 936 552	1 670 459	1 661 130	3 796 680	863 737	357 246	725 192
2008	10 985 355	1 682 776	1 749 935	4 002 285	813 686	371 050	734 596
2009	10 745 572	1 735 010	1 679 191	3 810 205	816 134	384 273	752 692
2010	10 052 000	1 739 191	1 611 695	3 683 103	846 998	387 626	816 901
2011	11 003 433	1 749 174	1 647 988	3 864 489	821 770	364 930	879 846
2012	11 350 000	1 741 878	1 688 687	4 022 296	799 285	383 213	910 725
2013	11 820 000	1 754 613	1 699 550	3 887 324	826 941	398 470	946 506

(ton) Source: Ministry of Food, Agriculture and Livestock

Kaynak: Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı

Ülkemizin tamamında domates yetiştiriciliği yapılmasına karşın, ekonomik anlamda domates yetiştiriciliğinin önemli olduğu bölgeler, başta Akdeniz Bölgesi olmak üzere Ege Bölgesi ve Marmara Bölgesi'dir (Keskin ve Dölekoğlu 2005).

Ülkemizde örtü altı sebze yetiştiriciliği 1950'li yıllarda başlanmış olup, 1990'lı yıllara kadar yavaş bir büyüme göstermiş, 1990'lı yıllardan sonra ise hızlı bir artış meydana gelmiştir. Örtü altı sebze yetiştiriciliğinde türler karşılaştırıldığında en büyük payı domates almaktadır (Anonim 2011).

Türkiye'de seracılık ekolojik koşullara bağlı olarak, özellikle Akdeniz sahil şeridinde yoğunlaşmıştır. Kaş'tan Gazipaşa'ya kadar uzanan 640 kilometrelik sahil şeridinde yoğun bir şekilde örtüaltı üretimi yapılmaktadır. Sebze ihracatı içinde örtüaltı üretimden elde edilen gelirler, sebze ihracat gelirlerinin önemli bir kısmını oluşturmaktadır (Çimen ve Aktaş 2001). Bu alanın %47'si Antalya ili sınırları içerisindedir. Mevcut sera varlığımızın %96'sında sebze üretimi yapılmaktadır (Titiz

2004). Antalya ve çevresinde örtüaltı sebze yetiştiriciliği ekonomik yönden önemlidir. Bölgede örtüaltı domates yetiştiriciliğinin hemen hemen tamamı cam ve plastik seralarda yapılmaktadır.

Domates yetiştiriciliği yapılan bölgelerde yetiştiricilikten kaynaklanan hatalar ve sera koşullarının neminin, sıcaklığın ve havalandırmasının ayarlanmasından kaynaklanan güçlükler nedeniyle fitopatolojik ve entomolojik sorunları meydana gelmektedir. Fitopatolojik sorunlar içerisinde fungal ve viral hastalıkların yanında, bakteriyolojik sorunlar önemli yer tutmaktadır. Domates yetiştiriciliğinin yaygın olarak yapıldığı Akdeniz Bölge'sinde görülen hastalıklar içerisinde özellikle öz nekrozu, bakteriyel kanser, bakteriyel leke, bakteriyel benek ve yumuşak çürüklük etmenleri tarafından oluşturulan bakteriyel hastalıklar önemli kayıplara neden olmaktadır (Basım ve Öztürk 2000).

Domates yetiştiriciliğinde görülen bakteriyel hastalık etmenlerinden domates bakteriyel öz nekrozu hastalık etmenleri diğer bakteriyel patojenlere oranla daha yoğun olarak görülmekte ve büyük ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Domates bakteriyel öz nekrozu hastalığına yedi farklı etmen sebep olmaktadır. Bunlar; *Dickeya chrysanthemi* (Alivizatos 1985, Wick ve Shrier 1990), *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Speights vd 1967, Victoria ve Granada 1983, Alivizatos 1985, Dhanvantari ve Dirks 1987, Malatrakis ve Goumas 1987, Smith ve Bartz 1990, Çınar ve Aysan 1995), *Pseudomonas cichorii* (Wilkie ve Dye 1974, Demir ve Gündoğdu 1988), *Pseudomonas corrugata* (Scarlett vd 1978, Bradbury 1987, Dhanvantari 1990, Catara ve Albanese 1993, Catara vd 1997, Lopez vd 1994, Aysan ve Çınar 2001, Catara vd 2000, Catara vd 2002, Scortichini 1992, Siverio vd 1993, Sutra vd 1997), *Pseudomonas fluorescens* (Alivizatos 1984, Skoudridakis 1986, Jacob 1991, Saygılı vd 2004), *Pseudomonas mediterranea* (Catara vd 2002, Basım vd 2005, Basım ve Yılmaz 2005) ve *Pseudomonas viridiflava* (Lukezic vd 1983-a, Lukezic vd 1983-b, Kudela ve Trynerova 1986, Malatrakis ve Goumas 1987, Kuwata ve Oikawa 1989)'dir.

Domates öz nekrozu hastalığı, domates bitkilerinde düzensiz gövde lekelerinin oluşumuna, bitkilerin gövdelerinin özünde renk değişimine, öz boşalmasına ve sonunda bitkinin tamamen ölümüne neden olmaktadır. Hastalık, bitkilerin meyve döneminde ortaya çıkar. Gövde, yaprak ve meyve sapının öz dokusunda kahverengi siyah renk değişimi görülür. Zamanla enfekteli dokunun ölmesiyle özde boşalma olur. Gövde üzerinde koyu renkli, çökük, lekeler meydana gelir. Gövdede iletim demetlerindeki zararlanmaya bağlı olarak dışa veya öz boşluğuna doğru yan kökler oluşur. Tüm bitkide orta derecede bir kloroz görülür. Hasta bitkiler genellikle ayakta kalırken bazen turgoritesini kaybedip devrilebilir. Meyvelerini olgunluğa eriştirebilir. Bazen etmen vasküler dokuyu sarar ve bunun sonucunda solgunluk ve ölüm ortaya çıkar (Scarlett vd 1978, Bradbury 1987, Catara ve Albanese 1993, Lopez vd 1994). Genelde domateslerde öz nekrozu belirtileri benzer olmasına rağmen hastalığı meydana getiren patojene bağlı olarak hastalığın şiddeti, ilerleyişi ve belirtileri değişkenlik gösterebilir (Catara vd 2002, Catara 2007).

Yüksek oranlı nem, aşırı azotlu gübreleme ve düşük gece sıcaklıkları, bakteriyel etmenlerin yayılması ve hastalığın gelişimi üzerine artırıcı etki yapmaktadır (Scarlett vd 1978, Catara vd 2000). Domateslerde öz nekrozu hastalığına genellikle geç sonbahar,

kış ve erken ilkbahar dönemlerinde Kasım ile Mart ayları arasında rastlamak mümkündür. Öz nekrozu patojenleri esas olarak örtü altında sorun yaratır. Kapalı ve çok nemli havalarda açıkta domates tarımında nadiren görülür. Aşırı azotlu gübrelemenin hastalığı teşvik ettiği sanılmaktadır. Hastalık kuvvetli, kalın gövdeli bitkilerde daha fazla görülmektedir. Bunun nedeni olarak yaprak ve koltuk alma işlemleri sırasında açılan yara dokusunun kalın gövdeli bitkilerde daha büyük olması ve patojenlerin bu yara dokularından enfeksiyon meydana getirmesidir. Ayrıca gevşek dokulu sucul bitkilerde öz nekrozu patojenleri daha hızlı enfeksiyon meydana getirmektedir. Öz nekrozu hastalığı çoğunlukla örtü altında, hava nisbi neminin yüksek olduğu bulutlu ve kapalı periyotları izleyen meyve dönemlerinde ortaya çıkmaktadır (Scarlett vd 1978, Catara vd 2000).



Şekil 1.2. Domates bakteriyel öz nekrozu hastalığının domates gövdesindeki belirtisi (Basım 2000)

Domatesin verimini azaltan ve pazar değerini düşüren öz nekrozu etmenlerinden biri konukçu aralığı geniş olan *Dickeya chrysanthemi*'dir. Patojen domates bitkisinin özünde ve vasküler dokusunda renk değişimi, yumuşama, genel solgunluk, meyve tutumundan sonra enfeksiyon oluşturduğunda meyvede yumuşama, meyve çürüklüğü ve ilerleyen aşamada bitkinin ölümüyle sonuçlanan belirtilere neden olmaktadır (Alivizatos 1985, Wick ve Shrier 1990).

*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* bakteriyel etmeni de gövdede koyu renkli alanların oluşumu, özde sulanma, renk değişimi, parçalanma ve yumuşak çürüklük ve bitkinin ölümü ile sonuçlanan belirtilere neden olabilmektedir. Texas (Speights vd 1967), Kanada (Dhanvantari ve Dirks 1987), Yunanistan (Malatrakis ve Goumas 1987) ve Türkiye'de (Çınar ve Aysan 1995) yapılan çalışmalarda söz konusu etmenin domateste benzer belirtiler oluşturduğunu tespit etmişlerdir. Etmenin bir çok bitki türünü hastalandırması ve bazı strainlerin belli konukçuya özelleşmesi söz konusu olabileceği rapor edilmiştir (Smith ve Bartz 1990).

Hastalığın diğere etmeni tarla ve sera domateslerinde öz parçalanması, boşalması ve yaprak kaidelerini çevreleyen düzensiz lekelerin oluşumu gibi benzer belirtilere neden olan *Pseudomonas cichorii*'dir. Oluşturduğu hastalığa gövde bakteriozisi adı verilen etmen, gövde üzerinde 30 cm'ye kadar ulaşan çizgi şeklinde koyu yeşil, kahve renkli dış lezyonların ortaya çıkışına neden olması ile diğere öz nekrozu patojenlerinden ayrılmaktadır. Domateslerde öz nekrozu hastalığı etmeni olarak Yeni Zelanda (Wilkie ve Dye 1974) ve Türkiye'de (Demir ve Gündoğdu 1988) yapılan çalışmalarda tespit edilmiştir.

*Pseudomonas corrugata*, ilk olarak İngiltere'de (Scarlett vd 1978) domates bitkilerinde yaygın olarak görülen kahve-siyah gövde lekeleri, bitkinin özünde meydana gelen renk değişimi, nekrosis ve boşalmayla beraber üst yapraklarda sararma, genel klorosis ve adventif kök oluşumuna neden olan yeni bir tür olarak tespit edilmiştir (Scarlett vd 1978, Bradbury 1987, Catara ve Albanese 1993, Lopez vd 1994). Türkiye'de domates yetiştiriciliğinde yaygın olarak görülen domates öz nekrozu hastalığına neden olan *Pseudomonas corrugata*'nın varlığına dair yapılan ilk çalışma Demir (1990) tarafından morfolojik, biyokimyasal ve patojenisitelerine bakılarak yapılmıştır. Çalışma ile öz nekrozuna neden olan etmenin *Pseudomonas corrugata* olduğu rapor edilmiştir.

Genellikle biyolojik ajan olarak kullanılan *Pseudomonas fluorescens*'in, gövde nekrozuna neden olduğunu Yunanistan'da Alivizatos (1984) ve Portekiz'de Jacob (1991) rapor etmiştir. Ülkemizde ise ilk defa Saygılı ve ark. (2004) *P. fluorescens* biotip I'in varlığını tespit etmişlerdir.

*Pseudomonas mediterranea* Catara ve ark. (2002) tarafından yapılan çalışmayla, domates bitkisinde öz nekrozuna neden olan yeni bir tür olarak ilk defa tanımlanmış ve *Pseudomonas corrugata* etmeniyle aynı belirtileri gösterdiği belirtilmiştir. Çalışmaya göre *Pseudomonas mediterranea* ve *Pseudomonas corrugata* etmenleri arasında virülenslik ve patojenisite yönünden farklılık bulunmadığı tespit edilmiştir (Catara vd 2002, Catara 2007). Türkiye'de de aynı bakteriyel etmenin domateste öz nekrozu hastalığına neden olduğu Basım vd (2005) tarafından ortaya çıkarılmıştır.

*Pseudomonas viridiflava*, 1973 yılında Yeni Zelanda'da domates yetiştiriciliği yapılan sera ve tarla domateslerinde görülen ve gövde nekrozu olarak tanımlanan belirtilerden izole edilerek tespiti yapılmıştır. *P. viridiflava*, domates bitkisinde düzensiz gövde lekelerinin ortaya çıkmasına, petiol ve yan sürgünleri de kapsayan öz kahverengileşme ve boşalmasına, petiollerde eksternal kanserlerin oluşmasına neden olan öz nekrozu patojeni olduğunu, ABD (Lukezic vd 1983-a, Lukezic vd 1983-b), Çekoslovakya (Kudela ve Trynerova 1986), Yunanistan (Malatrakis ve Goumas 1987), Japonya (Kuweta ve Oikawa 1989) ülkelerinde yapılan çalışmalarda tespit edilmiştir. Wilkie vd (1973) tarafından yapılan çalışmada, ilk araştırmalarda zayıf parazit veya sekonder patojen olarak kabul edilen *P. viridiflava*'nın daha sonra primer bitki patojeni olduğu vurgulayarak birçok konukçusu olduğunu saptanmıştır. *P. viridiflava* bakteriyel etmenin domates bitkisinin dışında sebze, süs bitkisi ve meyve ağaçları gibi birçok bitki türünün yaprak, tomurcuk, çiçek, meyve, gövde ve köklerinde hastalık oluşturduğu rapor edilmiştir (Young vd 1988, Billing 1970, Wilkie vd 1973, Hunter ve Cigna 1981, Lukezic vd 1983-a, Lukezic vd 1983-b, Leath vd 1989, Engelhard ve Jones 1990,

Gitaitis vd 1991, Little ve Gilberton 1994, Scortichini ve Morone 1997). Son olarak da etmenin bitkide stres yaratan koşullarda hastalık yapan bir fırsatçı olduğu görüşü belirlenmiştir (Lukezic vd 1983-a, Lukezic vd 1983-b, Jones vd 1984, Little ve Gilberton 1994).

Domateste görülen bakteriyel öz nekrozu hastalığının mücadelesinde aşırı azotlu gübrelemeden kaçınılmalı, potasyum ve kalsiyum gibi bitki dayanıklılığını artıran gübrelemelere dikkat edilmeli, bitkiler dengeli bir şekilde beslenmelidir. Hastalıklı bitkiler seradan uzaklaştırılmalıdır. Bakım işlemleri yürütülürken bitkiler yaralanmamalı ve seralarda koltuk alma işlemi yapılırken hasta bitkiler en sona bırakılmalıdır. Budama işleminden sonra koruyucu amaçlı bakterisit kullanılmalıdır. Etkin ve ekonomik bir kimyasal mücadele yöntemi yoktur. Bu nedenle dayanıklılık çalışmalarına kaynak oluşturacak moleküler çalışmaların önemi günden güne artmaktadır.

Bakteriyel patojenlerin tanı ve tespitinde izole edilen bitki, patojen ve tespitin amacına göre değişen geçmişten günümüze kadar geliştirilen birçok yöntem bulunmaktadır. Bunlar; hastalıklı bitki materyallerinden besi ortamlarına izolasyon, fidelerde belirti izleme yöntemi, test bitkilerine inokülasyon yöntemi, bakteriyofaj yöntemi, serolojik yöntemler (Aglutinasyon, Presipitasyon, ELISA (Enzim Bağlı İmmünosorbent Deneyi), biyokimyasal yöntemler, protein elektroforezi, mikroorganizmaların yağ asidi kompozisyonunun belirlenmesi, mikroskopi ve genetik farklılıkların esas alındığı modern biyoteknolojik yöntemlerinden olan nükleik asit hibridizasyonu, AFLP (Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi), RFLP (Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi), sekanslama, PFGE (Pulsed-Field Jel Elektroforez), klasik PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ve Real-Time PCR (Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu) gibi yöntemlerdir (Buckingham 2011).

Öz nekrozu hastalığı, domateslerin yanında ekonomik yönden önemli bitkilerde yaygın olarak görülen hastalıklardan biridir ve üretimi büyük ölçüde sınırlamaktadır. Bu çalışmanın amacı, öz nekrozu hastalığına neden olan *Dickeya chrysanthemi*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pseudomonas cichorii*, *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mediterranea* ve *Pseudomonas viridiflava* patojenlerinin hızlı ve güvenilir tanımlarını gerçekleştirebilmek için primer ve prob setleri geliştirmektir. Hastalığı meydana getiren patojenlerin hastalıklı bitkisel materyallerden kesin ve güvenilir tespitlerini sağlamaktır. Bu sayede ileriki çalışmalarda öz nekrozu patojenik bakteriyel türlerin dağılımı ve bu türlere ait çok sayıda izolatin elde edilebilmesine katkı sağlayacaktır. Farklı izolatlarla daha sonra yapılacak çalışmalarla genotipik farklılıkların ortaya konmasıyla farklı strainleri doğru olarak elde edilebilecektir. Gelecekte yapılacak öz nekrozuna karşı bitki dayanıklılık çalışmalarında bu farklı strainlerin kullanılması büyük önem taşımaktadır. Bu açıdan; bu çalışma, farklı öz nekrozu bakteriyel patojenik türlerin kısa sürede ve kesin tanısına ve de ileri ki çalışmalarda farklı strainlerin elde edilmesine olanak sağlayacak olması bakımından önem taşımaktadır. Böylelikle bu çalışma, bu konudaki teorik bilgi birikiminin artmasına aynı zamanda pratik yönden domates bakteriyel öz nekrozu patojenlerinin kısa sürede kesin tanı ve tespitlerine olanak sağlamış olacaktır.

## 2. KURAMSAL BİLGİLER ve KAYNAK TARAMALARI

Domates (*Solanum lycopersicum* L.), patlıcangiller (*Solanaceae*) ailesinden, anavatanı Güney ve Orta Amerika olan, meyvesi yenebilen otsu bitki türüdür. *Solanum lycopersicum* veya *Solanum esculentum* olarak adlandırılan domates; *Plantae* âleminin Magnoliophyta bölümünün, *Magnoliopsida* sınıfındadır. Domates bu sınıf içinde *Solanales* takımının, *Solanaceae* familyası dâhilinde ve *Solanum* cinsine bağlıdır (Anonim 2014-c). Patlıcangiller adıyla da anılan *Solanaceae* familyası, tropikal ve subtropikal bölgelerde yayılmış 90 cins ve 2500 tür ihtiva eder. Türkiye’de 12 cins ve bunlara ait 36 türü bilinmektedir. Bu familya mensuplarından bazılarının kültürü yapılmaktadır (Anonim 2014-c).

Domatesin bitkiler alemindeki sınıflandırması ilk olarak 1753 yılında İsveçli botanikçi Carl Linnaeus tarafından *Solanum lycopersicon* olarak yapılmıştır. Bu isimlendirme 15 yıl sonra İngiliz bir botanikçi olan Phillip Miller tarafından *S. esculentum* Mill. S. olarak değiştirilmiştir (Taylor 1986, Heiser ve Anderson 1999). Orijinal isimlendirmenin *S. lycopersicon* olduğunu düşünen birçok taksonomist olmasına rağmen literatürde *S. esculentum* olarak geçmektedir. Ancak 2005 yılında Peralta ve arkadaşlarının Kuzey Peru bölgesinde yaptığı bir araştırmada *Solanaceae* familyasına ait bazı yeni yabancı domates türlerinin de bulunmasıyla yapılan farklı sınıflandırmada domates *Solanum lycopersicum* olarak isimlendirilmiş ve diğer türler de farklı isimler almışlardır (Peralta and Spooner 2005). Sınıflandırılmasıyla ilgili tarihsel gelişim süreci içerisinde yabancı domatesler morfolojik karakterlerine, dölleme biyolojilerine ve tercih ettikleri yaşama ortamlarına göre gösterdikleri büyük farklılıklar nedeniyle araştırmacıların değişik sınıflandırmalarına maruz kalmışlardır. Türlerin iki yıllık ya da çok yıllık olmaları, yapılarında tüy ya da diken bulunması, ince ve otsu gövdelerinin çalı ya da dik formda olması, yaprakların dizilişleri ve çiçek salkımlarının tekli, ikili veya çoklu olması gibi birçok kritere göre değerlendirilmiştir (Oğuz 2010).

Domatesin Avrupa’ya gelişi ile ilgili kayıtlar ilk kez 1554 yılında Pier Andrea Mattioli isimli bir İtalyan botanikçi tarafından tutulmuştur. Kuzey Amerika’daki yetiştiriciliğine ilişkin kayıtlar ise 1710 yılına aittir (Tigchelaar 1986, Kaya 2012). Domatesin ülkemizdeki kültürü ile ilgili geçmişinin 1900’lü yıllara dayandığı (Vural vd 2000, Günay 2005) ve yetiştiriciliğinin Adana’da başlayıp yaygınlaştığı tahmin edilmektedir (Vural vd 2000, Kaya 2012).

Domatesin kültürünün diğer bitkilere oranla geç başlamasının nedeni, bir zamanlar zehirli olduğunun sanılması ve bu nedenle tüketilmediğinden kaynaklanmaktadır (Günay 2005). *Solanaceae* familyası bitkileri içerisinde birçok zehirli tür vardır ve domates bu türlerle kolayca karıştırılabilmektedir. Toksik etkiye neden olan bu familyanın tüm üyelerinde bulunan solanin alkaloid bir maddedir (Tigchelaar 1986). Günümüzde domates, hem kuzey hem de güney yarım kürede büyük ölçülerde üretilmektedir. Bu üretimlerde kullanılan modern kültür domatesinin geliştirilmesinde özellikle *L. hirsutum*, *L. peruvianum* ve *L. pimpinellifolium* türlerinden büyük ölçüde yararlanılmıştır (Tigchelaar 1986, Vural vd 2000, Günay 2005). Günümüzde yetiştirilen birçok eski yerel domates çeşidi, bu bitkinin ilk yetiştirilmeye başlandığı yıllarda Dünya’ya yayılmıştır (Günay 2005). Örneğin, Avrupa’da domatesin girdiği ilk ülkeler İtalya ve İspanya’dır. Avrupa’ya girişi ile birlikte domates, değişik



ekolojilere adapte olmuştur. Bu durum, Türkiye de dahil olmak üzere, geçmişte Dünya'nın birçok ülkesinde çiftçiler tarafından seçilmiş çok sevilen yerel domates popülasyonlarının geliştirilmesini sağlamıştır (Vural vd 2000). Yerel çeşitlerin geliştirilmesinde domatesin yüksek adaptasyon yeteneği etkili olmuştur. Özellikle Akdeniz ülkelerinde birçok eski yerel domates çeşidi hala yaygın olarak üretilmektedir. Örneğin Ruiz ve ark. (2005), eski yerel domates çeşitlerinin İspanya pazarlarında modern çeşitlere göre 6 kat fazla fiyatla alıcı bulduklarını bildirmektedirler (Kaya 2012).

Domates aynı zamanda Türkiye gıda sanayinin kullandığı ilk ürünlerden birisi olarak literatürlere geçmiştir (Vural 1998, Vural vd 2000). 1970'li yıllarda ilk kez domates salçası üretimi ile işe başlayan Türk gıda sanayi, hızlı bir gelişme göstererek günümüzde domates salçasının yanı sıra; soyulmuş, kübik kesilmiş ve püre haline getirilmiş domates ürünlerini de üretmektedir (Vural 1998, Grandillo vd 1999). Bu ürünlerin yanında bazı gıda işletmeleri tarafından güneşte kurutulmuş ve son zamanlarda da dondurulmuş domates ürünleri piyasada yerini almıştır (Vural 1998, Düzyaman ve Duman 2003, Kaya 2012).

Sebze türleri içerisinde domates ayrıca, üzerinde en yoğun araştırmaların yapıldığı ve en yeni moleküler genetik tekniklerin uygulama alanı bulduğu bir bitki olarak da bilinmektedir (Grandillo vd 1999). Günümüzde bilim insanları domates üzerinde birçok araştırma yapmaya devam etmekte ve bu bitkinin kalite, verim gibi özelliklerini daha da geliştirmeyi hedeflemektedirler (Kaya 2012).

10 veya 15 cm boya sahip olan domates bitkisinin hafif odunsu bir gövdesi vardır. 10–25 cm uzunluğunda olan yapraklarının üzerinde 5-9 yaprakçık bulunur. Yaprakları tüylüdür. 1–2 cm uzunluğunda ve genellikle sarı olan domates çiçekleri bir sap üzerinde 3-12 adettir. Genellikle kırmızı, yenilebilen meyvesi yabani bitkilerde 1–2 cm çapında iken, kültür bitkilerinde daha büyüktür (Anonim 2014-d).

Domatesin hasat edilen kısmı, rengi likopen birikimine bağlı olarak sarıdan koyu kırmızıya kadar değişen meyvesidir. Meyvenin şekli ve büyüklüğü domatesin çeşidine göre değişiklik göstermektedir. Meyvelerin çapları 2-15 santimetre arasındadır. Meyveler A, C vitaminleri ve potasyum açısından oldukça zengindir (Rhodes 2008) (Çizelge 2.1). Domatesin insanlar tarafından en fazla üretilen ve tüketilen tarımsal ürün olması, taze tüketilebilmesinin yanında pek çok farklı ürüne işlenebilirliği, yüksek vitamin ve mineral içeriğinin insan sağlığına olan yararlı etkisi düşünüldüğünde önemi daha iyi anlaşılır (Anonim 2007).

Çizelge 2.1. Ortalama büyüklükte (123 g) olgun bir domatesin Birleşik Devletler Tarım Bakanlığı (USDA, United States Department of Agriculture) Milli Gıda Standart Referans Veritabanına göre kimyasal içeriği (Anonim 2008-b)

Genel Kompozisyonu		Mineral içeriği		Vitamin içeriği		Aminoasit içeriği	
Su	116,23 g	<b>Kalsiyum</b>	12 mg	<b>C vitamini</b>	15,6 mg	<b>Triptofan</b>	0,007 g
<b>Enerji</b>	22 kcal	<b>Demir</b>	0,33 mg	<b>Tiamin</b>	0,046 mg	<b>Treonin</b>	0,033 g
<b>Protein</b>	1,08 g	<b>Magnezyum</b>	14 mg	<b>Riboflavin</b>	0,023 mg	<b>İzolösin</b>	0,022 g
<b>Toplam yağ</b>	0,25 g	<b>Fosfor</b>	30 mg	<b>Niasin</b>	0,731 mg	<b>Lösin</b>	0,031 g
<b>Doymuş</b>	0,034 g	<b>Potasyum</b>	292 mg	<b>Pantotenik asit</b>	0,109 mg	<b>Lizin</b>	0,033 g
<b>Tekli doymamış</b>	0,038 g	<b>Sodyum</b>	6 mg	<b>B-6 vitamini</b>	0,098 mg	<b>Metionin</b>	0,007 g
<b>Çoklu doymamış</b>	0,102 g	<b>Çinko</b>	0,21 mg	<b>Folat</b>	18 µg	<b>Sistin</b>	0,011 g
<b>Fitosterol</b>	9 mg	<b>Bakır</b>	0,073 mg	<b>Kolin</b>	8,2 mg	<b>Fenilalanin</b>	0,082 g
<b>Kül</b>	0,61 g	<b>Mangan</b>	0,14mg	<b>Betain</b>	0,1 mg	<b>Tirozin</b>	0,017 g
<b>Şeker</b>	4,82 g	<b>Flor</b>	2,8 µg	<b>β karoten</b>	552 µg	<b>Valin</b>	0,022 g
<b>Diyet lif</b>	1,5 g			<b>α karoten</b>	124 µg	<b>Arjinin</b>	0,026 g
<b>Glukoz</b>	1,54 g			<b>A vitamini</b>	1025 IU	<b>Histidin</b>	0,017 g
<b>Fruktoz</b>	1,69 g			<b>Likopen</b>	3165 mg	<b>Alanin</b>	0,033 g
				<b>E vitamini</b>	0,66 mg	<b>Aspartik asit</b>	0,166 g
				<b>K vitamini</b>	9,7 µg	<b>Glutamik asit</b>	0,530 g
						<b>Glisin</b>	0,023 g
						<b>Prollin</b>	0,018 g
						<b>Serin</b>	0,032 g

Çeşit standardizasyonunun olmaması, ıslah edilmemiş çeşitlerin kullanılması, yanlış budama, yanlış gübreleme, aşırı veya yetersiz sulama gibi teknik ve kültürel uygulamaların uygun bir şekilde gerçekleştirilememesi yanında gerek ülkemizde gerek Dünya’da bu önemli ürünün verimini azaltan ve pazar değerini düşüren pek çok bakteriyel, fungal ve viral bitki hastalık etmenleri ve zararlılar mevcuttur (Anonim 2011). Hastalık ve zararlıların yanında bu tezin konusu da olan hastalıktan biri de domates bakteriyel öz nekrozu hastalığıdır. Bu hastalığa yedi farklı etmen sebep olmaktadır. Bunlar; *Dickeya chrysanthemi*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pseudomonas cichorii*, *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mediterranea* ve *Pseudomonas viridiflava*’dır.

Domateslerde bakteriyel öz nekrozu hastalığı, domates bitkilerinde düzensiz gövde lekelerinin oluşumuna, bitkilerin gövdelerinin özünde renk değişimine, öz boşalmasına ve sonunda bitkinin tamamen ölümüne neden olmaktadır. Hastalık, bitkilerin meyve döneminde ortaya çıkar. Gövde, yaprak ve meyve sapının öz dokusunda kahverengi siyah renk değişimi görülür. Zamanla enfekteli dokunun ölmesiyle özde boşalma olur. Gövde üzerinde koyu renkli, çökük, büyük lekeler meydana gelir. Bazen gövdede dışa veya öz boşluğuna doğru yan kökler oluşur. Tüm bitkide orta derecede bir kloroz görülür. Hasta bitkiler genellikle ayakta kalır ve meyvelerini olgunluğa erdirtirebilirler. Bazen etmen vasküler dokuyu sarar ve bunun sonucunda solgunluk ve ölüm ortaya çıkar (Speights vd 1967, Wilkie ve Dye 1974,

Scarlett vd 1978, Lukezic vd 1983-a, Lukezic vd 1983-b, Alivizatos 1984, Alivizatos 1985, Bradbury 1987, Catara vd 2000, Basım ve Yılmaz 2005).



Şekil 2.1. Domates bakteriyel öz nekrozu hastalığının domates gövdesindeki belirtisi (Basım 2000)



Şekil 2.2. Domates bakteriyel öz nekrozu hastalığı sonucu domates gövdesinde ortaya çıkan adventif kök oluşumu (Basım 2000)

## 2.1. *Dickeya chrysanthemi* İle İlgili Kuramsal Bilgiler

*Dickeya chrysanthemi* ilk kez süs bitkilerinden biri olan krizantemlerde patojen olarak belirlenmiştir. ABD’de seralarda yetiştirilen krizantemlerde 1950’li yılların başında yeni bir hastalığın ortaya çıktığı gözlemlenmiştir. Hasta bitki gövdesine bastırıldığında bitki kolayca kırılmakta, boyuna kesildiğinde özde bir yumuşama, köklerinde nadiren çürüme ve yanıklık semptomlarının olduğu, lezyonların kahverengiden siyaha kadar değişen tonlarda meydana geldiği belirlenmiştir. Hastalığın özellikle yüksek nem ve sıcaklığın olduğu seralarda bitkinin sukkulent dokusunda hızla ilerlediği ve infekteli dokudan izole edilen patojenin *Erwinia* cinsine ait olduğu saptanmıştır. Patojen, *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* ve *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*’dan %1’lik laktozu geç kullanma, Krumwiede’s Triple Sugar Agar ortamında önce sarı sonra kırmızı renk oluşturma, Endo Agar ortamında pembe koloni ve ortamın renginin pembeye dönüşmesi, Fermi’s solüsyonunda iyi gelişme, metilen kırmızısı ortamında negatif, Voges-Proskauer ortamında pozitif sonuç vermesi özellikleriyle ayrılmıştır. Bu farklılıklar dikkate alınarak Burkholder ve ark. (1953) bu yeni bitki patojenini *Erwinia chrysanthemi* olarak isimlendirmişlerdir. Daha sonra, *Erwinia chrysanthemi*, *Pectobacterium* cinsine transfer edilerek *Pectobacterium chrysanthemi* (Hauben vd 1998) olarak adlandırılmış ve son olarak da *Erwinia chrysanthemi*’nin ismi *Dickeya chrysanthemi* olarak değiştirilmiştir (Samson vd 2005, Asselbergh vd 2008, Slawiak vd 2009-a).

Çizelge 2.2. *Dickeya chrysanthemi*’nin bilimsel sınıflandırılması

<b>Alem</b>	Bacteria
<b>Bölüm</b>	Proteobacteria
<b>Sınıf</b>	Gamma Proteobacteria
<b>Takım</b>	Enterobacteriales
<b>Familiya</b>	Enterobacteriaceae
<b>Cins</b>	<i>Dickeya</i>
<b>Tür</b>	<i>Dickeya chrysanthemi</i> (Burkholder vd 1953) Hauben vd 1998

*Dickeya chrysanthemi* patojenin konukçuları Solanaceae familyası bitkilerden biber, patates (Dickey 1979, Laurila vd 2008, Slawiak vd 2009-a, Toth vd 2011), patlıcan, domates, tütün (Schaad ve Brenner 1977, Dickey 1979, Perombelon and Kelman 1980, Dickey 1981, Asselbergh vd 2008), Convolvulaceae familyası bitkilerden tatlı patates, Brassicaceae familyasından brokoli, turp, Apiaceae familyasından kereviz, havuç, Poaceae familyasından şeker kamışı, sorgum, pirinç, Bromeliaceae familyasından ananas, Asparagaceae familyasından kuşkonmaz, Amaryllidaceae familyasından soğan, Musaceae familyasından muz (Lin vd 2010), süs bitkilerinden Orchidaceae familyasından orkide, Liliaceae familyasından lale, Asteraceae familyasından beyaz hindiba, Kasımpatı, Caryophyllaceae karanfil, Asparagaceae familyasından sümbül, Crassulaceae familyasından sedum, Amaryllidaceae familyasından amarillis ve Begoniaceae familyasından begonya’da hastalık oluşturabilmektedir (Anonim 2014-d, Lee ve Yu 2006). Daha sonraki çalışmalar etmenin tanısı ve konukçularının belirlenmesi üzerine yapılmıştır. *Dickeya chrysanthemi*’nin domateste patojen olduğu ilk kez Victoria ve Granada (1981) tarafından Kolombiya’da rapor edilmiştir.

*Dickeya chrysanthemi* konukçu aralığının geniş olmasını sağlayan ve virülensliğine katkıda bulunan enzimler; (Plant cell wall degrading enzymes –PCWDE) pektolitik enzim, pektin lyase (*Pnl*), pektat lyase (*Pel*), poligalakturonaz (*Peh*) ve pektin metil esteraz (*Pme*)’dir (Collmer ve Keen 1986, Kotoujansky 1987, Bell vd 2002, Whitehead vd 2002, Chang vd 2004, Asselbergh vd 2008). Pektolitik enzimler patojenin genomunda bulunan farklı genler tarafından sentezlenir (Barras vd 1987, McMillan vd 1994, Chang vd 2004) ve bu genlerin virülens faktörlerinin salgılanması üzerine düzenleyici etkisi vardır (Andersson vd 1999). Konukçu bitkinin hücreler arasında çoğalarak ürettikleri bu enzimler hücre duvarının yapısındaki pektini parçalar böylece bakteri kendi çoğalması ve gelişimi için gerekli maddeleri sağlar (Pérombelon 2002, Chang vd 2004, Asselbergh vd 2008).

*Dickeya chrysanthemi* Gram-negatif, strainleri 0,8-3,2×0,5-0,8 µm ebatlarında, çubuk şeklinde, peritrik kamçılı, spor oluşturmeyen, fakültatif anaerobik, genom büyüklükleri 4.7×10<sup>9</sup> baz çifti, DNA’sının G-C içeriği %54-30 arasında değişmektedir (Pritchard vd 2013). Nitratı nitrite indirger, oksidaz negatif, laktik asit pozitifdir (Hauben vd 2005). Bu cinsteki bakterilerin gelişebildikleri sıcaklıklar bakterinin türüne hatta strainine göre büyük değişiklik göstermektedir en iyi gelişebildiği optimum sıcaklık 25-30°C arasında değişmektedir. Optimum gelişme pH’sı ise 6-7 arasında değişmektedir (Hauben vd 2005).

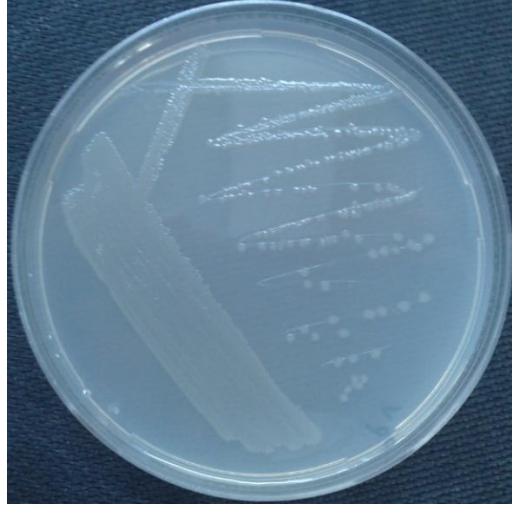


Şekil 2.3. *Dickeya chrysanthemi*'nin neden olduğu domates bakteriyel öz nekrozu hastalığının domates yaprağındaki belirtisi (A), gövde öz kısmındaki belirtisi (B) (Bu çalışmadan)

*Dickeya chrysanthemi* patateslerde yumuşak çürüklüğe neden olan yeni bir hastalık etmeni olarak Hollanda’da rapor edilmiştir. Japonya’da yarı kurak bölgelerde sulanan yumrulara yumuşak çürüklüğe neden olduğu ve ilerleyen çalışmalarda İsrail (Lumb vd 1986, Tsrör vd 2012), Güney Afrika (Serfontein vd 1991), İspanya (Palacio-Bielsa vd 2006), Finlandiya (Joutsjoki vd 2005, Laurila vd 2008, Laurila vd 2010), Polonya (Slawiak vd 2009-a), Çin (Lin vd 2010) ve Fransa dahil olmak üzere Avrupa



genelinde (Samson vd 1987, Samson vd 2005, Helias 2006, Tsrör vd 2009, Tsrör vd 2012 ) patojenin tespiti yapılmıştır.



Şekil 2.4. Nutrient Agar besi ortamında *Dickeya chrysanthemi*'nin koloni gelişimi (Bu çalışmadan)

Palacio-Bielsa vd (2006), İspanya'nın farklı bölgelerinden farklı yıllarda patates yetiştiriciliği yapılan alanlardaki hastalıklı bitkilerden izole edilen 13 *Dickeya chrysanthemi* izolatının karakterizasyonunu biyokimyasal, fizyolojik, moleküler ve patojenisite testlerinden yararlanarak yapmışlardır. PCR metodunda *pectate lyase* gen bölgesinden 450 bp'lik amplikon veren *peLADE* (ADE1/ADE2; Nassar vd 1996) primerlerini kullanmışlardır. Çalışmada yararlanılan testler sonucunda 1, 3, 5 ve 6 olmak üzere 4 biovaryete tanımlanmıştır.

Kaneshiro vd (2008), ananas (*Ananas comosus* var. *comosus*) yetiştiriciliğinde ciddi kayıplara sebep olan patojenlerin tespit ve tanımlarını yapmak amacıyla biyokimyasal test, ELISA, 16S rDNA sekans analizi, PCR, BOX PCR ve patojenisite testlerinden yararlanmışlardır. Çalışma sonucunda yumuşak çürüklüğe sebep olan patojenin *Dickeya chrysanthemi* olduğunu rapor etmişlerdir.

Tsrör vd (2009), İsrail'de ticari amaçla yetiştiriciliği yapılan patates bitki ve yumrularında sıklıkla görülen ve ciddi kayıplara neden olan patojenin *Dickeya* spp. cinsi bakterilerin neden olduğu düşünülmüş ve izole edilen 6 strainin tanı ve tespitini yapmak amacıyla patojenisite testi, biyokimyasal test, serolojik yöntemlerden ELISA ve PCR metodlarını kullanmışlardır. PCR metodunda *pectate lyase* gen bölgesinden 450 bp'lik amplikon veren *peLADE* (ADE1/ADE2; Nassar vd 1996) primerleri ve Rep-PCR için REP1R, REP2I (Versalovic vd 1991) primerlerini kullanmışlardır. Çalışma sonucunda strainler arasında benzerlik olduğu ve hastalığa neden olan farklı biovaryetelerin bulunduğunu tespit etmişlerdir.

Laurila vd (2008), Finlandiya'da hastalıklı patates bitkilerinden ve nehir suyundan izole edilen *Dickeya* spp. strainlerinin tespiti ve karakterizasyonunu için fatty asit analizi (FAME), patojenisite testi, PCR ve filogenetik analiz yöntemlerini

kullanmışlardır. PCR işleminde 16S-23S intergenic spacer ve 16S rDNA bölgesinden ~800 bp'lık bölgeyi çoğaltan 1114f , L1r (Fessehaie vd 2002) primerlerini kullanmışlardır. Bu çalışma ile *Dickeya* spp. türlerinin sulama suyunda bulunup hastalık oluşturabileceği saptanmıştır.

Slawiak vd (2009), 1979-2007 yılları arasında Hollanda, Polonya, Finlandiya ve İsrail'de patates yetiştiriciliği yapılan enfekteli patates bitkilerinden izole edilen 65 *Dickeya* spp. strainin tanılanması amacıyla biyokimyasal test, REP-PCR, 16S rDNA ve dnaX dizi analiz yöntemlerini kullanmışlardır. Çalışmalarında *pelADE* spesifik primerleri (Nassar vd 1996), dnaX dizi analizinde 535 bp'lik bölgeyi çoğaltan dnaXf, dnaXr primerlerini, 16S rDNA gen bölgesinden dizayn edilmiş F985PTO, R1378 primerlerini (Heuer vd 1999) ve REP-PCR için REP1R, REP2I primerlerini (Versalovic vd 1991) kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar ile filogenetik ağaç oluşturulmuştur. Çalışma sonucunda test edilen strainlerden *Dickeya dianthicola*, *D. dieffenbachia*, *D. dadantii*, *D. zae* ve *D. chrysanthemi*'nin tanısı yapılmıştır.

Diallo vd (2009), patateslerde ciddi kayıplara neden olan *Dickeya chrysanthemi* ile *Pectobacterium atrosepticum* patojenlerinin kısa sürede tespitlerinin yapılabilmesi amacıyla Multiplex-PCR yöntemini kullanmışlardır. Çalışmada Multiplex-PCR yönteminin hasasiyetini belirlemek amacıyla farklı 61 *Dickeya* ve *Pectobacterium* strainleri denenmiştir. Klasik PCR metodunda 420 bp'lik fragment veren Y45/46 (Fréchon vd 1998) ile 600 bp'lik ADE (Nassar vd 1996) primerlerini ve Multiplex PCR metodunda yaptıkları çalışmada geliştirdikleri Ech1/1 primerlerini kullanmışlardır. Çalışma patates tüberlerini ekimden önce bu patojenlerle enfekteli olup olmadığının tespit edilmesini imkan sağlayarak sonra meydana gelecek zararların önlenmesine katkıda bulunmaktadır.

Li vd (2011), *Dickeya chrysanthemi* Çin'de muzlarda yumuşak çürüklüğe neden olan yeni bir hastalık etmeni olduğunu bildirmiştir. Patojen o bölgedeki muzlarda ciddi kayıplara neden olmuş ve araştırmacıları hastalığın ekolojisini, tanısını ve hastalıktan mücadele yollarını araştırmaya itmiştir. Etmenin sulama suyunda, toprakta ve bitki kalıntılarında canlılığını devam ettirip, hastalık meydana getirdiği, hastalık belirtilerinin ise bitki dokusunun öz kısmında olmasından dolayı geç tespit edildiği saptanmıştır. Bu nedenle hastalıkla mücadele edilebilmesi için geleneksel tanı metodlarından ziyade doğru ve kısa sürede sonuç veren moleküler yöntemlerden PCR metodunu hastalığın tespiti amacıyla kullanmışlardır (Henson ve French 1993, Lévesque 2001, McCartney vd 2003, Atkins ve Clark 2004).

Li vd (2011) yaptıkları çalışmayla 16S -23S rDNA ITS bölgesini çoğaltan universal primerleri kullanarak elde ettikleri 440 bp'lik fragmentin gen bankasından blast yapılarak sadece *Dickeya chrysanthemi* etmenine spesifik LF ve LR primerlerini dizayn etmişlerdir. LF ve LR primerleri muzda hastalık meydana getiren 7 patojene karşı denenmiş sadece *Dickeya chrysanthemi* patojeninde pozitif sonuç alınmıştır. Bu primerler patojenin enfekteli bitki materyalinden, topraktan ve sudan tespitinde kullanılabilirliği bildirilmiştir.

Pritchard vd (2013), bitki patojeni olan ve Dünya'da bir çok bitkide hastalık oluşturan *Dickeya* cinsine bağlı 17 izolatin genom dizilimlerini çıkarmışlardır. Genom

dizilimi çıkarılan türlerden üç tanesi konukçu aralığı geniş olan *Dickeya chrysanthemi*, üç tanesi *D. dadantii*, beş tanesi *D. zaeae*, bir tanesi *D. paradisiaca* ve *Dickeya* cinsine bağlı olup henüz tür olarak tanılanmamış 5 izolat yer almaktadır. Araştırmacılar çalışmanın, patojenlerle ilgili tüm bilgilerin saklandığı genom dizilimlerin belirlenmesiyle tanılama ve dayanıklılık çalışmalarına kaynak oluşturmasını hedeflemişlerdir.

## 2.2. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* İle İlgili Kuramsal Bilgiler

*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* bakteriyel etmeni ilk olarak havuç ve diğer sebzelerden Jones (1901) tarafından tespit edilmiş *Bacillus carotovorus* olarak, daha sonra Waldee (1945) tarafından *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* olarak adlandırılmış ve son çalışmalar sonucunda adlandırılması *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* olarak değiştirilmiştir (Hauben vd 2005).

Çizelge 2.3. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*'un bilimsel sınıflandırılması

Alem	Bacteria
Bölüm	Proteobacteria
Sınıf	Gamma Proteobacteria
Takım	Enterobacteriales
Familya	Enterobacteriaceae
Cins	<i>Pectobacterium</i>
Tür	<i>Pectobacterium carotovorum</i> (Jones 1901) Waldee 1945

*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* bitkilerde yumuşak çürüklüğe sebep olarak hastalık meydana getirmektedir (Barras vd 1994, Liao vd 1993, Young vd 1996). Taksonomik çalışmalar sonucunda *Erwinia* cinsi 3 filogenetik gruba ayrılmış, başlangıçta *Erwinia* cinsi içerisinde yer alan etmen daha sonra *Pectobacterium* cinsine dahil edilmiştir (Hauben vd 1998, Graham 1972, Verdonck vd 1987, De Boer vd 1987, Goto ve Matsumoto 1987, Alcorn vd 1991, Gallois vd 1992). *Pectobacterium carotovorum* fiziksel, biyokimyasal ve patojenik özelliklerine dayanarak *carotovorum*, *atrosepticum*, *betavasculatorum*, *wasabiae* ve *odoriferum* alt türlerine ayrılmaktadır (Lelliott ve Dickey 1984, Helias vd 1998, Gardan vd 2003, Gallois vd 1992). *Pectobacterium carotovorum* subsp. *betavasculatorum* ve *P. carotovorum* subsp. *wasabiae* (*Pcw*) şeker pancarında yumuşak çürüklük (Goto ve Matsumoto 1987), *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum* serin bölgelerde patateslerde karabacak hastalığına neden olmaktadır (Pérombelon ve Kelman 1987, Pérombelon 2002, Young vd 1996). Dünya'nın bir çok bölgesine yayılmış olan *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (*Pcc*), yumuşak çürüklüğe neden olur ve diğer alt türlere oranla konukçu aralığı daha geniştir (De Boer vd 1987, Smith ve Bartz 1990, Helias vd 1998, Seo vd 2002, De Boer 2003, Ma vd 2007, Avrova vd 2002, Toth vd 2003, Yap vd 2004, Yishay vd 2008, Young vd 1996, Lelliott ve Dickey 1984, Gardan vd 2003, Park vd 2012).

Domateslerde *Erwinia* türlerinin sebep olduğu hastalığın varlığı ilk kez Teksas, ABD (Speights vd 1967), Kolombiya (Victoria ve Granada 1981), Kanada (Dhantvantari ve Driks 1987), Küba (Stefanova vd 1984), Yunanistan (Alivizatos



1985), Florida ABD (Chellemi vd 1998) ve İspanya’da (Cazorla vd 2001) rapor edilmiştir. Ülkemizde Doğu Akdeniz Bölgesinde domates seralarında gövde çürüklüğüne neden olan *Envinia* türlerinin varlığı ilk kez 1994 yılında tespit edilmiş (Çınar ve Aysan 1995) ve hastalığın oldukça yaygın olduğu belirlenmiştir (Aysan ve Çınar 2001). Hastalık etmenlerinin Ege Bölgesinde de önemli kayıplara neden olduğu bildirilmiştir (Üstün ve Saygılı 2001). Günümüzde ise bu hastalık domates yetiştiriciliği yapılan seralarda sorun olan en önemli bakteriyel hastalıklar arasında yer almaktadır.

*Pectobacterium carotovorum* konukçu aralığı monokotiledonlardan özellikle Poales takımına ait bitkiler, pirinç, mısır, süpürge darısı ve şeker kamışı (Thomson vd 1981), muz, soğansı bitkiler (geofitler) (Smith ve Bartz 1990, Wright vd 2001, Seo vd 2002), *Zantedeschia* spp. (Smith ve Bartz 1990, Wright 1998, Snijder ve van Tuyl 2002), *Dieffenbachia* spp., *Scindapsus aureus* (Norman vd 2003), *Ornithogalum* spp. (De Hertogh ve Le Nard 1993), süs bitkileri (Byther ve Chastagner 1993), çin otu (*Pinellia ternata*) (Hu vd 2008, Ying vd 2007) ve ticari önemi olan domates (Toth vd 2001), patates (De Haan vd 2008, Anonim 2008-b), havuç, lahana, kabak, kavun, kereviz, enginar (Anonim 2008-b) ve biberdir (Yishay vd 2008). Patojen bitkinin çeşitli aksamlarında zarar meydana getirirken hasat sonrası depolanan bitkilerde yumru, soğan ve rizomlarda yumuşak çürüklüğe neden olmaktadır (Byther ve Chastagner 1993).

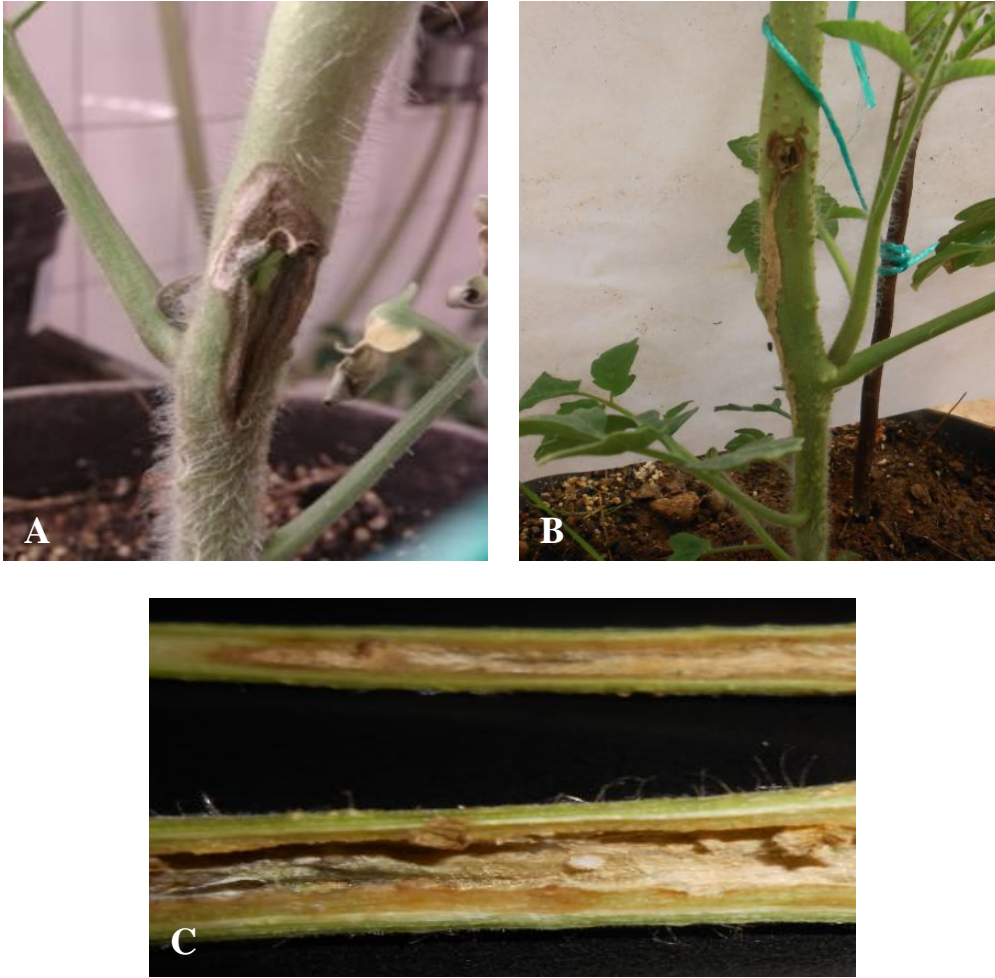
*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* pektolitik aktiviteye sahip (Chang vd 2004), Gram-negatif, çubuk şekilli, 1-6 peritrik kamçılı, kapsülsüz, fakültatif anaerob, 0,5-1,0µ ile 1.0-3µ büyüklüğünde, genom büyüklüğü  $4.86 \times 10^9$  baz çifti, DNA’sının G-C içeriği %51,9 olan bir bakteri türüdür. Optimum gelişme sıcaklığı 27°C, maksimum gelişme sıcaklığı 35-37°C, minimum ise 6°C’dir. Kings B’de krem renkli, 4-5 mm çapında, düzensiz kenarlı koloniler oluşturur (Hauben vd 2005).



Şekil 2.5. Nutrient Agar besi ortamında *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*’un koloni gelişimi (Bu çalışmadan)

Yumuşak çürüklük hastalığına neden olan *Pectobacterium* türleri domateste tüm bitkide solgunluk, gövdede sulu lekeler, iletim demetlerinde renk değişiklikleri, öz

yapısının bozulması, ileri dönemlerde gövdede çürüklük, sulanma ve dokunulduğunda bitkinin devrilmesi gibi hastalık belirtilerine neden olur (Dhanvantari ve Driks 1987).



Şekil 2.6. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*'un neden olduğu domates bakteriyel öz nekrozu hastalığının domates bitkilerinin gövde yüzeyindeki belirtisi (A,B), öz kısmındaki belirtisi (C) (Bu çalışmadan)

*Pectobacterium* ve *Dickeya* cinslerinin konukçu aralığının geniş olması pektolitik enzim, pektin lyase (*Pnl*), pektat lyase (*Pel*), poligalakturonaz (*Peh*) ve pektin metil esteraz (*Pme*) enzimleri üretmelerinden kaynaklanır. Konukçu bitkinin hücreler arasında çoğalarak ürettikleri bu (Plant cell wall degrading enzymes -PCWDE) enzimler hücre duvarının yapısındaki pektini parçalar böylece bakteri kendi çoğalması ve gelişimi için gerekli maddeleri sağlar (Pérombelon 2002, Chang vd 2004). Pektolitik enzimler patojenin virülensliğine katkıda bulunmaktadır (Bell vd 2002, Whitehead vd 2002, Chang vd 2004) ayrıca enzimleri üreten bu genlerin virülens faktörlerinin salgılanması üzerine düzenleyici etkisi vardır (Andersson vd 1999). Bu nedenle, bitki organlarında yumuşamaya sebep olan bu enzimler virülens faktörleri olarak da adlandırılır (Koiv ve Mae 2001). Pektinaz enzimi patojenin patojenisitesindeki en önemli enzimdir (Barras vd 1994, Pérombelon 2002, Chang vd 2004). Pektolitik enzimler patojenin genomunda bulunan farklı genler tarafından sentezlenir (Barras vd

1987, McMillan vd 1994, Chang vd 2004) ve yumuşak çürüklük oluşturan hastalıkların tespitinde bu genlerin bulunduğu bölgeyi amplifiye eden primerler kullanılmaktadır.

Perombelon ve Kelman (1980), yaptıkları çalışma sonucunda *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*'un aerosol, böcek, yüzey ve yağmur suları ile taşınabildiğini rapor etmişlerdir. Patojenin bitkilerde latent enfeksiyon olarak, bitki kalıntılarında, toprakta, suda, bitki yüzeylerinde epifitik olarak bulunarak (Pérombelon ve Kelman 1980, Pérombelon ve Salmond 1995) hastalık gelişimi için uygun sıcaklık, nem ve su varlığında hastalık meydana getirdiği rapor edilmiştir (Pérombelon ve Kelman 1980, Pérombelon ve Salmond 1995). Hastalık etmeni toprakta saprofit olarak yaşayabildiği gibi, toprakta kalan hastalıklı bitki artıkları üzerinde ve bazı böceklerin (Örn. *Hylemia cilicrura*) pupaları üzerinde kışı geçirebilir. Patojenin bitkiye girişi çeşitli faktörlerin etkisiyle açılan yaralardan olur ve özellikle don ve dolu olaylarının görüldüğü aylarda meydana getirdiği hastalık şiddetli bir yayılma gösterir ve zarar oranı artar.

*Pectobacterium carotovorum* izolatlarının doğal koşullarda konukçusuna özel adaptasyon gösterdiği rapor edilmiştir (Avrova vd 2002, De Boer 2003, Toth vd 2003, Yap vd 2004). Ancak konukçusuna göre özelleşmenin genetiksel farklılıkla bağlantılı olmadığı tespit edilmiştir (Smith ve Bartz 1990, De Boer 2003, Yap vd 2004, Yishay vd 2008).

*Pectobacterium carotovorum*'un tespitinde monoklonal ve poliklonal antibody içeren serolojik yöntemler kullanılmıştır (De Boer vd 1987, Klopmeier ve Kelman 1988, Van der Wolf vd 1996). Fakat alt türlerin tespitinde sero gruplar arasındaki yakın bağlantılar alt türlerin tespitini güçleştirmiş, kesin ve hızlı sonuç veren moleküler çalışmalara yönlendirmiştir (Gardan vd 2003).

Avrova vd (2002), *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* konukçu aralığının geniş olmasında patojenin çoğu çevre koşullarına karşı dayanıklı olmasının etkili olduğunu savunmuşlardır. *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* tarımsal ve ekonomik öneme sahip havuç, patates, soğan, kereviz, biber, domates, kavun, kabak gibi pek çok bitkide yumuşak çürüklük hastalığına sebep olduğunu bildirmiştir (Bell vd 2004). Toprak kaynaklı etmen ayrıca havada (Dhanvantari vd 1987), sularda (Mc Carter vd 1985) ve bitki artıklarında canlılığını sürdürüp hastalık meydana getirebilmektedir. Bu bakteri türünün üyeleri aynı zamanda karbapenem grubu antibiyotik ürettiği rapor edilmiştir (Andersson vd 1999).

Kang vd (2003), URP (Universal rice primers) primerlerini kullanarak elde ettikleri parmak izindeki polimorfik bantlardan geliştirdikleri spesifik primerlerle *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* tespitini yapmışlardır. Çalışmalarında farklı coğrafik bölgelerdeki farklı konukçulardan toplanmış 54 bakteri straini pECC2F plazmidinden dizayn edilen EXPCCR, EXPCCF primerleri kullanılarak yapılan PCR çalışmasında 29 tane *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* ve 3 tane *P. carotovorum* subsp. *wasabiae* strainin tespitini yapmışlardır. *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* tespitini kesin olarak yapmak amacıyla nested PCR yöntemini kullanmışlardır. Nested PCR işleminde kullanılacak olan primerler ilk PCR ürününün *RsaI* enzimini kullanılarak elde edilen polimorfik bantın sekansından geliştirilmiştir. Geliştirilen

INPCCR, INPCCF primerleri ile sadece *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* tespiti yapılmıştır. URP (Universal rice primers) Pirinç bitkisinin genomundaki evrensel tekrarlı dizilerden geliştirilen primerlerdir. İnsan, bitki ve mikroorganizmaların parmak izi yöntemiyle DNA profillerini belirlemede kullanılmaktadır (Kang vd 2002). URP primerleri 20 nükleotid içerir ve RAPD PCR tekniklerinde kullanılmaktadır (Kang vd 1998).

Fiori ve Schiaffino (2003), biberlerde yaygın olarak görülen ve ciddi kayıplar veren öz nekrozu hastalık etmeni *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*'un moleküler açıdan tanısını ve karakterizasyon çalışmalarını yapmışlardır. Hastalık biber bitkilerinde ilk çiçek oluşumuyla beraber gövde ve dallar üzerinde boyuna siyah leke şeklinde lezyonlar gösterirken köklerde kirli beyaz bakteriyel akıntılara, petiol ve genç yaprakların damarlarında kahverengimsi siyah renk değişikliğine, gövde içinde öz nekrozuna ve ilerleyen aşamada genel solmayla beraber bitkinin ölmesine neden olmaktadır. Enfekteli biber bitkisinden izole edilen patojenin tanısında electron mikroskobu, Gram testi, pektolitik aktivite, Crystal Violet-Pectate (CVP) ortamı (Cuppels ve Kelman 1974), oksidaz testi (Kovacs 1956), katalaz testi, arginin dihidrolaz testi (Thornley 1960), nitrattan nitrit üretimi testi, aseton oluşumu testi, indol üretimi testi, hidrojen sülfid testi, nişastanın parçalanması testi, sakkarozdan indirgenen maddeler testi (Hugh ve Leifson 1953), organik maddelerden asit üretimi testi (Dickey ve Kelman 1988), sıcaklığa hassasiyet testi, %5 NaCl'ye tolerans testi (Dye 1968), pektinaz aktivitesi testi, King's B besi ortamının kullanımı (King vd 1954, Cuppels ve Kelman 1974), KOH testi ve jelatinin hidrolizi testini uygulamışlardır. Fatty asit profillerine incelemişlerdir ve Serolojik yöntemlerden immünofluoresan yöntemini kullanmışlardır (Mazzucchi ve Bazzi 1980). Patojenin tanılanmasında, elde edilen sonuçların da 'Bergey's Manual of Systematic Bacteriology ile paralellik gösterdiğini bildirmişlerdir. Bitkilerden elde edilen *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* izolatlarına patolojik ve biyokimyasal testler uyguladıktan sonra moleküler düzeyde kesin tanıların yapılması amacıyla PCR ve RFLP yöntemlerini kullanarak tanılama yapmışlardır.

Gardan vd (2003), farklı bölge ve konukçulardan izole edilmiş 53 *Pectobacterium carotovorum* strainin tanılanması amacıyla fenotipik, biyokimyasal, serolojik, filogenetik ağaç, DNA-DNA hibridizasyonu metotlarını kullanmışlardır.

Aysan vd (2006), domates (*Lycopersicum esculentum*), biber (*Capsicum annuum*), patates (*Solanum tuberosum*), havuç (*Daucus carota*), kereviz (*Apium graveolens*), kabak (*Cucurbita pepo*), kavun (*Cucumis melo*) ve soğan (*Allium porrum*) bitkilerinde yumuşak çürüklük hastalığına neden olan *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* ve *Erwinia chrysanthemi* patojenlerinin tespiti ve tanısını yapmak amacıyla belirtilen konukçulardan izole edilen 23 strainin karakterizasyonunu yapmışlardır. Çalışmada morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal test, tütünde HR testi, patojenisite testi, fatty asit metil ester analizi sonuçlarına göre filogenetik ağaç ve *pel* gen bölgesinden 434 bp'lik bölgeyi çoğaltan PCR yöntemini kullanmışlardır.

Hu vd (2008), yaptıkları çalışmada Çin'de yıllardır tıbbi aromatik bitki olarak kullanılan çin otunda (*Pinellia ternata*) yumuşak çürüklüğe neden olan patojenin tespitini yapmak amacıyla hastalıklı bitkiden izole edilen 2 farklı strain ile patojenisite

testi, Koch postülatları, fatty asit analizi, biyokimyasal testler ve moleküler metotlardan 16S-rDNA dizilimi ve PCR metotlarını kullanmışlardır. 16S-rDNA dizilimi filogenetik ağaçta bakıldığında %97-99 oranında *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* ile homoloji göstermiştir. *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*'a uygun primerler kullanılarak patojenin tanısı yapılmıştır. Bu çalışma *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*'un çin otunda hastalık yaptığına dair ilk kayıttır.

Ürün (2008) yaptığı çalışmada, *Pectobacterium* ve *Erwinia amylovora* bakterilerinde mikroorganizmaların çoğunda bulunan amino asit eksikliği, karbon kaynağı yokluğu veya besin azlığı gibi olumsuz çevre koşullarında yaşamlarını sürdürebilmek için “Çevresel Strese Cevap” adı verilen özel bir mekanizmaya sahip olup olmadığını araştırmıştır. Bu mekanizma, *RelA* enzimi tarafından sentezlenen (p)ppGpp molekülü ile kontrol edilir. Bu çalışmada öncelikle, *P. atrosepticum*'a ait *relA* gen dizisinden tasarlanmış özgün primerler kullanılarak, *P. carotovorum*'da 569 bp'lik bir DNA bölgesi PCR ile çoğaltılmıştır. PCR ürünü DNA dizi analizi, bu bölgenin *P. atrosepticum*'daki ilgili bölge ile %91 oranında homolog olduğunu göstermiştir. Daha sonra western immünoblot analizi ile *P. carotovorum* ve *P. atrosepticum*'da ilk kez *RelA* proteininin varlığı ortaya konmuştur. İlginç olarak *E. amylovora*'da *RelA* proteini saptanmamıştır. İşlevsel *RelA* proteininin varlığı western blot yöntemiyle gösterilmiş ve biyolojik fonksiyonu belirlenmiştir.

Yishay vd (2008) yaptıkları çalışmada, monokotiledon ve dikotiledon konukçulardan izole edilen *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* izolatları arasındaki patojenisite ve genetik farklılığı araştırmışlardır. Çalışmada patojenisite testi, pektolitik aktivite testi, gaz kromatografisi, fatty asit analizi, 16S rRNA dizilimine göre filogenetik ağaç, ITS bölgesine göre PCR ve AFLP metotları kullanılmıştır.

Czajkowski vd (2009), patateslerde ciddi kayıplara neden olan karabacak hastalığı patojenleri *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* ve *Dickeya* spp.'nin patates yumru ve tohumlarından izole ederek biyokimyasal ve moleküler yöntemlerle tespitini yapmışlardır. Yaptıkları çalışmada hastalığın ekimden önce tohumdan kısa sürede tespitini yaparak sonra meydana gelebilecek kayıpları önlemeyi amaçlamışlardır.

Yaprak (2009), *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043 suşunun *spoT* gen dizisine göre tasarlanan özgün primerler kullanılarak, *P. carotovorum*'da 599 baz çiftlik bir bölgesi PCR ile çoğaltılmıştır. Dizi analizi ve BLAST araştırması PCR ürünün *P. atrosepticum*'daki ilgili bölge ile %93 oranında homolog olduğunu göstermiştir. Daha sonra western blot analizi ile *P. carotovorum* ve *P. atrosepticum*'da ilk kez *SpoT* proteininin varlığını saptamıştır. Çalışmada sonucunda *Erwinia amylovora*'da *SpoT* proteini saptanamamıştır.

De Boer vd (2012), Kanada'da patates yetiştiriciliği yapılan bölgelerde görülen bakteriyel hastalıklardan karabacak hastalıklı bitkilerden izole edilen patojenlerinin tanılamalarını yapmak amacıyla biyokimyasal ve moleküler yöntemleri kullanmışlardır. PCR ile yaptıkları tanılama çalışmasında *Pectobacterium atrosepticum*, *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis*, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, *P. wasabiae* ve *Dickeya* spp. spesifik primerler kullanmışlardır. Çalışma sonucunda patateslerde karabacak hastalığına neden olan en yaygın türün (%63 oranında) *Pectobacterium atrosepticum*

olduğunu belirlemişlerdir. Çalışmada *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* oranı %23 olarak bulunmuş fakat kullanılan primerlerin *P. carotovorum* subsp. *wasabiae* patojenini de tespit etmesinden dolayı bu oranın daha da düşebileceği belirtilmiştir.

Yumuşak çürüklük hastalığına neden olan *Erwinia* türleri ile ilgili olarak Dünya’da bir çok araştırma yapılmasına rağmen hastalığın mücadelesinde etkili kontrol yöntemi sağlanamamıştır (Perombelon ve Kelman 1980). Etmen uygun iklim koşullarında duyarlı domates bitkilerinde şiddetli hastalıklara ve ciddi ekonomik kayıplara neden olabilmektedir. Kimyasal preparatlarla ve kültürel uygulamalarla yeterli kontrolü sağlanamayan domateste *Erwinia* türlerinin neden olduğu hastalıkların mücadelesinde biyolojik kontrol çalışmaları önem kazanmış araştırmacıların bu konu üzerinde çalışmasına neden olmuştur (Kloepper 1983, Xu ve Gross 1986, Chard vd 1991, Lucon ve De Melo 1999, Altın ve Bora 2001, Karataş ve Aysan 2003). Ülkemizde Karataş ve Aysan (2003), Doğu Akdeniz Bölgesinde domates bitkilerinde gövde çürüklüğüne neden olan *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*’nın biyolojik mücadele olanaklarını araştırmışlardır. Çalışmalarında Adana ilinde domates üretimi yapılan seralardan alınan toprak örneklerinden izole edilen ve Dr. Elad’dan (ARO, İsrail) temin edilen aday antagonistler de dahil olmak üzere toplam 78 adet aday antagonist kullanmışlardır. İzolatların antagonistik etkisi besi yerinde *in vitro* ve patates dilimlerinde yarı *in vivo* denemelerle araştırılmıştır. İklim odasında saksılarda yetiştirilen domates bitkileri üzerinde 13 antagonistin etkisi %33-66 arasında değişen oranlarda tespit edilmiştir. *In vitro*, yarı *in vivo* ve saksı denemelerinde elde edilen sonuçlar dikkate alınarak seçilen beş antagonist sera koşullarında testlenmiştir. Sera çalışmalarında bu antagonistlerden bir tanesinin (G2) *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*’nın neden olduğu gövde çürüklüğünü %50 oranında engellediği tespit edilmiştir.

### 2.3. *Pseudomonas cichorii* İle İlgili Kuramsal Bilgiler

Wilkie ve Dye (1974) tarafından yapılan çalışmayla domates öz nekrozuna neden olan *Pseudomonas cichorii*’nin varlığı ilk olarak Yeni Zelanda’da belirlenmiştir. Ülkemizde ise Ege Bölgesinde Demir ve Gündoğdu tarafından (1988) ve Doğu Akdeniz Bölgesinde Tokgönül (1995) tarafından etmenin varlığı bildirilmiştir.

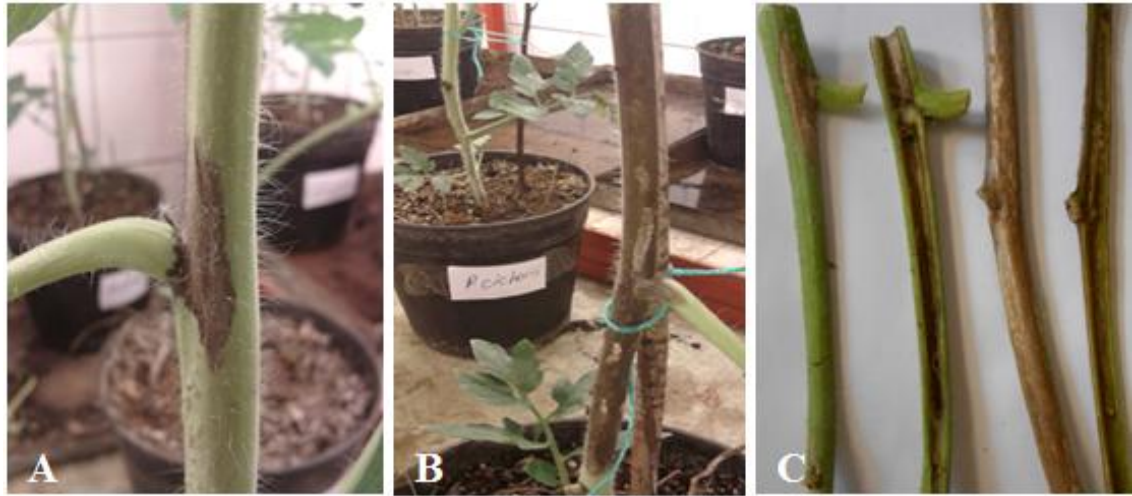
*Pseudomonas cichorii* Gram-negatif, çubuk şekilli, 1-6 polar kamçıya sahip, aerobik, spor oluşturmeyen, 1,1-3,5x0,7 µm boyutunda, genom büyüklüğü 5.99×10<sup>9</sup> baz çifti, DNA’sının G-C içeriği %58,1, optimum gelişme sıcaklığı 27°C mezofilik bir bakteridir (Palleroni 2005).

#### Çizelge 2.4. *Pseudomonas cichorii*’nin bilimsel sınıflandırılması

<b>Alem</b>	Bacteria
<b>Bölüm</b>	Proteobacteria
<b>Sınıf</b>	Gamma Proteobacteria
<b>Takım</b>	Pseudomonadales
<b>Familya</b>	Pseudomonadaceae
<b>Cins</b>	<i>Pseudomonas</i>
<b>Tür</b>	<i>Pseudomonas cichorii</i> (Swingle 1925) Stapp 1928



*Pseudomonas cichorii* marullarda (*Lactuca sativa*) midrib rot hastalığına (Grogan vd 1977, Cottyn 2005, Aysan vd 2003, Cottyn vd 2011), zencefillerde (*Curcuma longa*) yaprak yanıklığı (Maringoni vd 2003), patlıcanlarda (*Solanum melongena*) nekrotik yaprak lekelerine (Kiba vd 2006), kahve bitkilerinde (*Coffea arabica*) (Sanchez vd 2003), hindiba bitkisinde (*Cichorium endivia*) yumuşak çürüklük (Alippi vd 2002), kerevizlerde (*Apium graveolens*) iletim demetlerinde kahve rengileşme ve bakteriyel yanıklık (Alippi vd 1996), turnagagası bitkisinde (*Pelargonium hortorum*) yaprak lekesi (Engelhard vd 1983), lahanalarda (*Brassica oleracea* var. *capitata*) lezyonlara (Engelhard vd 1983, Alippi vd 1996), karnabaharda (*B. oleracea*) lezyonlara (Engelhard vd 1983, Alippi vd 1996), brokoli (*B. oleracea* var. *italica*) lezyonlara (Alippi vd 1996), beyaz hindibada (*Cichorium intybus*) lezyonlara (Alippi vd 1996), krizantemlerde (*Chrysanthemum morifolium*) yaprak lekelerine (Engelhard vd 1983, Alippi vd 1996), tütünde (*Nicotiana tabacum*), beş parmak bitkisinde (*Schefflera arboricola*) (Mirik vd 2011), Kasımpatı'nda (*Dendranthema grandiflora*) yaprak ve çiçeklerde yanıklığa ve domateslerde (*Lycopersicon esculentum*) öz nekrozuna (Wilkie ve Dye 1974, Üstün ve Saygılı 2001, Tekman 2005, Trantas vd 2013) neden olmaktadır. Bunların yanında *Pseudomonas cichorii*'nin birçok bitkide yaprak lekelerine, öz nekrozuna, tomurcuk ve çiçek yanıklıklarına neden olduğu farklı araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir (McFadden 1961, Wehlburg 1963, Wehlburg vd 1966, Jones vd 1983, Engelhard vd 1983, Jones vd 1984, Chase ve Brunk 1984).



Şekil 2.7. *Pseudomonas cichorii*'nin enfeksiyonu sonucunda domates gövdesindeki meydana gelen tipik gövde lekeleri (A, B, C), gövde öz kısmındaki nekroz belirtisi (C) (Bu çalışmadan)

*Pseudomonas cichorii* etmeninin diğer floresan *Pseudomonas* türlerinden ayırt etmek için farklı selektif besi ortamları geliştirilmiştir. Jones vd (1990) yaptıkları çalışmada kesme çiçek yetiştiriciliği yapılan toprak ve Kasımpatı (*Dendranthema grandiflora*) bitkisinin yaprak ve çiçek tomurcuklarından izole edilen *P. cichorii* etmeninin selektif izolasyonu için PCM-1, PCM-2 yarı seçici besi ortamlarını geliştirmişlerdir. PCM-1 ortamı içeriğinde fungal ve bakterial inhibitörlerin yanında toprakta ve bitkilerde bulunan çoğu mikroorganizmanın katabolize edemediği karbon kaynağı olan L(+)-tartrat içermektedir. PCM-2 ortamı ise King B ortamının

modifikasyonu ile oluşturulmuş, yüksek oranda antibiyotik yanısıra L(+)- tartrat ve peptone içermektedir. Her iki ortamda *P. cichorii* etmeninin selektif izolasyonu sağlanmıştır.



Şekil 2.8. Nutrient Agar besiy ortamında *Pseudomonas cichorii*'nin koloni gelişimi (Bu çalışmadan)

*Pseudomonas cichorii* marullarda hastalığa neden olduğu Grogan vd (1977) ve Cottyn vd (2009) tarafından rapor edilmiştir. Patojen 1990'dan bu yana Belçika'da marullarda ciddi kayıplara neden olmuş ve araştırmacıları hastalığın ekolojisini, tanısını ve hastalıktan mücadele yollarını araştırmaya itmiştir. Etmenin toprakta sınırlı olarak bulunduğu, hastalık yaygın olarak damlama sulama suyundan taşınan patojen tarafından oluşturulduğu tespit edilmiştir (Grogan vd 1977, Cottyn vd 2009, Cottyn vd 2011).

Yapılan sera incelemelerinde gövde nekrozuna neden olan farklı bakteri türlerinin oluşturduğu hastalık belirtilerinin genelde benzer olduğu belirlenmiştir. Ancak dış belirtilerde bazı farklılıklar olduğu Üstün ve Saygılı (2001) tarafından bildirilmiştir. Tanısı yapılamayan floresan *Pseudomonas* türlerinin domates bitkilerinde oluşturduğu belirtilerin *Pseudomonas cichorii*'nin neden olduğu belirtilerle birbirine çok benzediğini vurgulamışlardır.

Mirik vd (2011), farklı konukçulardan izole edilmiş *Pseudomonas cichorii* patojeninin karakterizasyonu ile ilgili yaptıkları çalışmada LOPAT testi, patojenisite testi, ELISA testi, fatty asit (FAME) testi ve Box-PCR yöntemlerini kullanmışlardır. Çalışmada doğal enfekteli 3 marul (*Lactuca sativa*), 3 beş parmak bitkisi (*Schefflera arboricola*), 6 domates (*Lycopersicon esculentum*) bitkisinden izole edilen strainleri kullanmışlardır. Çalışmada tüm strainler Gram-negatif, King's B ortamında floresan pigment üretir, NSA ortamında levan oluşumu yok, oksidaz pozitif, pektolitik aktivite negatif, arjinin dihidroliz negatif, tütünde HR pozitif, katalaz pozitif, oksidatif, 5% NaCl ortamda gelişim yok, jelatin hidrolizi yok, L (+) arabinoz, D-arabinoz, glukoz, inulin, laktoz, mannitol, mannoz, maltoz, melibioz, rafinoz, sorbitol, sükröz ve trehaloz gibi karbon kaynaklarından asit üretimi yok, King's B ortamında mukoid olmayan krem floresan koloniler oluştururlar. Fatty asit analizi sonucunda filogenetik ağaç



oluşturulmuş, tüm strainler %84-97 arasında homoloji göstermiştir. Box-PCR sonucunda farklı konukçulardan izole edilen strainler arasında %98 oranında benzerlik gözlenmiştir. Çalışmada ayrıca strainlerin bakır (Cu) ve streptomycine dayanıklılıklarına bakılmış dayanıklı strain gözlenmemiştir.

Cottyn vd (2011), *Pseudomonas cichorii* marullarda meydana getirdiği hastalıkla mücadele edilebilmesi için geleneksel tanı metotlarından ziyade doğru ve kısa sürede sonuç veren ve bakterinin populasyon yoğunluğunun kısa sürede belirlenmesini sağlayan moleküler yöntemlerden Real-time PCR yöntemini hastalığın tespiti amacıyla kullanmışlardır. Yapılan çalışmada patojenisiteden sorumlu *hrcRST* gen bölgesini çoğaltan *hrp1a*, *hrp2a* klasik PCR primerleri kullanılarak elde edilen 897 bp'lik fragmentin sekans analizi yapılmış. Elde edilen diziden 90 bp'lik amplicon veren Real-Time primerleri; PscHrc662F (22-mer [5'- AGGCTTTATGGAAACCCTGACG-3']) ve PscHrc751R (20-mer [5'- ACAATCACCGCCACGATCAG -3']) ve TaqMan Minor Groove Binding (MGB probe) PscHrcMGB687 (16-mer [5'FAM- TTCAAGCAGGCC ATGT - MGB - NFQ 3']) probu kullanılmıştır. Çalışmada geliştirilen Real-Time primer ve probun spesifikliğini belirlemek amacıyla 39 *Pseudomonas cichorii* straini ve 89 farklı *Pseudomonas* türleri test edilmiştir. Yöntemin ve kullanılan primer- prob setinin hasasiyetinin belirlenmesi için farklı seyreltmeler test edilmiştir. Daha önceki yıllarda araştırmacılar tarafından yapılan klasik PCR denemeleriyle karşılaştırılan sonuçlarda klasik PCR ile test edilemeyen düşük miktardaki bakteri yoğunluğunun bu yöntem ile tespit edilebildiği ortaya çıkarılmıştır. Sıcaklık, nem gibi fiziksel faktörlerin yanı sıra *Pseudomonas cichorii* patojeninin yeterli miktarda varlığının enfeksiyonun oluşması açısından önemli bir etken olduğu yapılan kantitatif Real-Time PCR yöntemiyle saptanmıştır. Ayrıca bu çalışmayla hangi bakteriyel populasyonun hastalık oluşumunda risk içerip içermediği belirlenmiştir.

Trantas vd (2013), domateslerde öz nekrozu hastalığına neden olan *Pseudomonas cichorii* izolatlarının biyokimyasal ve moleküler yöntemlerle karakterizasyonunu yapmışlardır. Çalışmalarında moleküler yöntemlerden Box-PCR ve Multi Lokus Sequence Analizini (MLSA) kullanarak filogenetik ağaç oluşturmuşlar. Çalışma sonucunda alt varyeteler tanımlanmıştır.

Babu vd (2013) yaptıkları çalışmada, orman toprağından izole edilen izolatların karakterizasyonunu yapmak amacıyla seçici besi ortamı ve biyokimyasal testlerden yararlanmışlar ve izolatların *Pseudomonas cichorii* olduğunu tespit etmişlerdir. Çalışma sonucunda topraktan izole edilen izolatların Gram-negatif, oksidaz pozitif, fosfatı kullanabildiği, King's-B ortamında floresan pigment ürettiği, NSA ortamında levan oluşturduğu, laktoz, ksiloz, fruktoz, gliserol, trehaloz, mannitol ve ribozu kullanabildiği, glikoz, sükroz ve jelatini kullanamadığı saptanmıştır.

#### **2.4. *Pseudomonas corrugata* İle İlgili Kuramsal Bilgiler**

*Pseudomonas corrugata* Dünya'da ilk defa Scarlett ve ark. (1978) tarafından yapılan çalışmayla İngiltere'de domates seralarında gövde nekrozlarında rastlanmıştır. Hastalığa yeni bir etmenin neden olduğuna karar verilmiş ve izole edilen etmen bakteri morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerine göre *P. corrugata* olarak tanılanmıştır (Clark ve Watson 1986, Bradbury 1987, Catara ve Albanese 1993, Lopez

vd 1994, Catara vd 2000, Catara 2007, Guo vd 2007). Etmenin pek çok ülkede varlığı ilerleyen yıllarda çeşitli araştırmacılar tarafından tespit edilmiştir. İngiltere (Lukezic 1979), Almanya (Naumann 1980, Kohn 1982), İspanya (Lopez ve Noval 1980), İsrail (Zutra ve Kritzman 1983), İsviçre (Vogelsanger ve Grimm 1983), İtalya (Fiori vd 1983, Scortichini 1989, Catara ve Albanese 1993, Sesto vd 1996), ABD (Lai vd 1983, Wick ve Shrier 1990, Carroll vd 1992), Yeni Zelanda (Clark ve Watson 1986), Güney Afrika (Bradbury 1987), Yugoslavya (Mijatoviç vd 1988), Japonya (Kuwata ve Oikawa 1989), Sovyetler Birliği (Popkova ve Nosova 1989), Brezilya (Neto vd 1990), Türkiye (Demir 1990, Basım ve Yılmaz 2005), Suriye (Bayda ve Warrak 1990), Arjantin (Alippi vd 1993), Yunanistan (Buanario vd 1993) ülkelerinde saptanmıştır. *P. corrugata* bakteriyel etmeni başta Avrupa ve A.B.D. olmak üzere tüm Dünya’da öz nekrozuna en fazla neden olan patojen olarak rapor edilmiştir (Scortichini 1992).

#### Çizelge 2.5. *Pseudomonas corrugata*’nın bilimsel sınıflandırılması

<b>Alem</b>	Bacteria
<b>Bölüm</b>	Proteobacteria
<b>Sınıf</b>	Gamma Proteobacteria
<b>Takım</b>	Pseudomonadales
<b>Familya</b>	Pseudomonadaceae
<b>Cins</b>	<i>Pseudomonas</i>
<b>Tür</b>	<i>Pseudomonas corrugata</i> Roberts and Scarlett 1978

*Pseudomonas corrugata* domates yetiştiriciliği yapılan seralarda (Buonario vd 1993, Catara ve Albanese 1993), tarlalarda (Lai vd 1983, Carroll vd 1992), fideliklerde (Sesto vd 1996) ciddi zararlara neden olmuştur (Lopez vd 1994, Anonim 2014-e). Domatesin yanında hastalığa neden olduğu konukçular biber (Lopez vd 1994), krizantem (Fiori 1992), sardunya (Magyarosy ve Buchanan, 1995), patlıcan, fasulye, kereviz, salatalık, kavun, bezelye, tütün ve dolmalık kabak yer almaktadır (Sutra vd 1997, Catara vd 1997, Catara vd 2000, Catara vd 2002, Catara 2007). Kültür bitkisi olarak yetiştiriciliği yapılan domatesler (*Lycopersicon esculentum*) *Pseudomonas corrugata* patojenine yabancı domateslere (*Lycopersicon* spp.) göre daha hassastır (Scortichini ve Rossi 1993, Catara 2007).

*Pseudomonas corrugata* sudan (Scarlet vd 1978), domates tohumlarından (Zutra ve Kritzman 1983, Abdalla 2000), yonca köklerinden (Lukezic 1979), çeltik danelerinden (Qutry vd 1992), bürülceden (Bennik vd 1998), brokoli başlarından (Bedini vd 1999, Padaga vd 2000), topraktan (Achouak vd 2000, Catara vd 1997, Kovacevich ve Ryder 1991, Pandey vd 2001, Ryder ve Rovira 1993, Schisler ve Slininger 1994, Scortichini 1989, Walker vd 2000) izole edilmiştir. Ayrıca hastalık oluşturmadan *Achillea ageratum* bitkisinin köklerinden (Picard ve Bosco 2003), kanola kök uçlarından (Fernando vd 2005), hıyar rizosferinden (Paulitz vd 1992), üzümde endofit olarak (Bell vd 1995), Lucerne bitkisinin kök kısmından ve endofit olarak (Lukezic 1979), fasulye filizinden (Bennik vd 1998), patates tüberlerinden (Garbeva vd 2001), kırmızı amerikan meşesinin mikorizal kök uçlarından (Sbrana vd 2002), prinç tanelerinden (Cottyn vd 1996), çilek stolonlarından (Tanprasert ve Reed 1997), çay bitkisinin rizosferinden (Pandey vd 2000), buğday rizosferinden (Ryder ve Borret 1991)

izole edilmiştir (Lukezic 1979, Scortichini 1989, Ryder ve Borret 1991, Paulitz vd 1992, Achouak vd 2000, Catara 2007).

*Pseudomonas corrugata* Gram-negatif, çubuk şekilli, 1-3 polar kamçılara sahip, genom büyüklüğü  $6-6,1 \times 10^9$  baz çifti, DNA'nın % G-C içeriği 60,5 (Licciardello vd 2014), aerobik, oksidaz pozitif, floresan olmayan fakat DNA-rRNA hibridizasyonu (De Vos vd 1985) ve fatty asit profillerine (Stead 1992) göre floresan *Pseudomonas*'lar arasında yer alan, levan üretmeyen, hücreler arası depo granülü olarak poly- $\beta$  hidroksibutirat kullanan (Catara 2007), pektolitik olmayan, NDA ortamında ise yeşil merkezli, sarımtırak hafif kubbeli, (adlandırılmasında etkili olan özelliği) genelde merkezi veya kenarları kırışık ve sarı yeşil ortama yayılan pigment oluşturan (Scarlett vd 1978), nitratı nitrite indirgeyen, YBGA (Yeast Bactopeptone Glucose Agar) ortamında kırışık ya da düz koloniler oluşturan bir bakteridir. Strainlerin bir kısmı tütün bitkisinde hipersensitif reaksiyona (HR) neden olur. Strainlerin çoğu 15 gün inkübasyondan sonra arjinin pozitif, Tween 80'i hidrolize eder (Sutra vd 1997, Catara vd 1997, Catara vd 2002, Catara 2007). Strainlerin koloni morfolojisi, arjinin hidrolizi, Tütünde hipersensitif reaksiyonu (HR), indolasetik asit üretimi, casein hidrolizi, jelatin, lesitin ve lipaz üretimi, karbon kaynaklarından yararlanması değişkenlik göstermektedir. Optimum gelişme sıcaklığı 28°C, maksimum 37-38°C, minimum ise 4°C'dir (Catara vd 1997, Catara vd 2002, Catara 2007, Lopez vd 1994, Siverio vd 1993, Sutra vd 1997).



Şekil 2.9. Nutrient Agar besi ortamında *Pseudomonas corrugata*'nın koloni gelişimi (Bu çalışmadan)

*Pseudomonas corrugata* domates bitkisinin öz kısmının parankimatik dokularında (Coco vd 2001) nekrozlara ve boşalmaya neden olur, ilerleyen aşamada genel solgunlukla beraber bitkinin turgoritesini kaybedip çökmesine sebep olmaktadır (Scarlett vd 1978, Clark ve Watson 1986, Bradbury 1987, Catara ve Albanese 1993, Lopez vd 1994, Catara vd 2000, Guo vd 2007). Patojen diğer konukçularında da domates bitkisiyle benzer semptomlara neden olmaktadır.



Şekil 2.10. *Pseudomonas corrugata*'nın neden olduğu domates bakteriyel öz nekrozu hastalığının domates bitkilerinin öz kısmındaki belirtisi (Bu çalışmadan)

*Pseudomonas corrugata*'nın hastalıklı bitkilerden sağlıklı bitkilere sulama suyuyla taşındığı araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir (Scarlett vd 1978, Fiori 2002, Naumann vd 1989, Sadowska vd 1997, Catara 2007). Hastalık hem sera hem de tarlada yetiştiriciliği yapılan domateslerde gözükmemektedir. Hastalığın ilerlemesinde çevre koşulları önem arz etmektedir. Özellikle yaprak ve sap yüzeylerinde suyun mevcudiyeti, sınırlı hava akımı, aşırı sulama, gün içerisindeki gece-gündüz sıcaklık farklılıkları, topraktaki yüksek azot seviyesi, yabancı otların varlığı, *Pseudomonas corrugata*'nın enfeksiyonunu teşvik etmektedir (Carroll vd 1992, Naumann vd 1989, Scarlett vd 1978).

*Pseudomonas corrugata*'nın tespit ve tanısında biyokimyasal, serolojik, patolojik (Siverio vd 1993, Sutra vd 1997) testlerden yararlanılmış fakat tür içerisinde karşılaşılan fenotipik ve genomik çeşitlilik (Siverio vd 1993, Catara vd 1997, Sutra vd 1997) araştırmacıları etmenin kısa sürede kesin tanımlarını yapmak, epidemiyolojilerini araştırmak için nükleik asit temelli moleküler yöntemleri çalışmaya itmiştir (Catara vd 2000, Catara 2007, Achouak vd 2000). Bu amaçla ERIC-PCR (Achouak vd 2000), RAPD (Catara vd 2000), Box-Rep-PCR (Catara vd 2002) çalışmaları yapılmıştır. Aynı seradan bile izole edilen *Pseudomonas corrugata* izolatları genotipik farklılık göstermiştir (Achouak vd 2000, Catara 2007, Trantas vd 2014).

Clark ve Watson (1986), Yeni Zelanda'da domates yetiştiriciliği yapılan alanlarda yaygın olarak görülen, domates yapraklarında klorozis, gövde de griden kahve renge dönen renkte düzensiz geniş yarıklar ve öz kısmında sulu kahve rengi nekroz şeklinde simptom gösteren hastalığın tespitini ve tanısını yapmak amacıyla tütünde hipersensitif reaksiyon (HR), patatestte pektolitik aktivite, nitrat redüksiyonu, NSA ortamında levan oluşumu, asit üretimi, 2-ketogluconate üretimi, jelatin hidrolizi, arginin hidrolizi, nişasta hidrolizi içeren biyokimyasal testlerden yararlanmışlardır. Çalışma sonucunda izole edilen tüm izolatlar patatestte pektolitik aktivite göstermemiştir, oksidaz pozitif, nitratı nitrite indirger, L-arabinose ve mannitoldan asit üretimi pozitif, D-rarbinose, rhamnose, ve eryhritolden asit üretimi negatiftir, jelatini hidrolize eder, arginin hidroliz etmez, NSA ortamında levan oluşumu ve 2-ketogluconate üretimi yoktur. Patojenisite testleri doğal enfeksiyonlar kadar ciddi olmamıştır. İzole edilen patojen *Pseudomonas cichorii* patojeniyle benzer belirtiler gösterebileceği yapılan testler

sonucunda ayrılmıştır. İki patojen arasındaki en belirgin farklılık *Pseudomonas corrugata* Kings'B ortamında floresan oluşturmaz, GYCA ortamında yeşil pigment üretir, jelatini hidrolize eder ve nitratı indirger. Yapılan testler sonucunda domateste öz nekrozu hastalığına neden olan patojenin *Pseudomonas corrugata* olduğu rapor edilmiştir. Bu çalışma etmenin Yeni Zelanda da domateslerde öz nekrozu hastalığına neden olduğuna dair ilk kayıttır.

Ülkemizde 1989 yılında Ege Bölgesindeki seralarda ciddi kayıplara neden olan hastalıklı domates bitkilerinde yapraklarda solgunluk, gövdede lezyonlar ve özde nekrozlar olduğu gözlenmiştir. Örneklerden izole edilen saf bakteri kültürü ile yapılan morfolojik, biyokimyasal ve patojenite testleri sonucunda hastalık etmeninin *Pseudomonas corrugata* olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışma Türkiye'deki *P. corrugata*'nın varlığı dair ilk kayıttır (Demir 1990). Yapılan çalışmada patojenin tütünde hipersensitif reaksiyon verdiği, nitratı nitrite indirgediği, Kings'B ortamında floresan pigment ürettiği, H<sub>2</sub>S ürettiği, NSA ortamında levan oluşturduğu, %5 NaCl'de geliştiği gözlenmiştir. Ayrıca patojenin eskulin, sükroz, mannoz, maltoz, rafinoz, glycerol, monnitol, sorbitol, inositol ürettiği saptanmıştır. Akdeniz Bölgesinde ise Baş ve Çınar (1995) tarafından patojenin varlığı ve öz nekrozu hastalığına neden olduğu rapor edilmiştir.

Alippi vd (1993), Arjantin ve Güney Amerika da yaptıkları çalışmada Carmelo, Ceibo, Simona, ve Lerika domates hibritlerinde ekonomik kayıplara neden olan gövde üzerinde siyah lekeler, gövdenin iç kısmında öz boşalmasının yanında öz kısmının kahverengileştiği, yan kök oluşumuna ve yapraklarda klorozise neden olan patojenin tanısını yapmak amacıyla çeşitli biyokimyasal ve patojenisite testlerinden yararlanmışlardır. Hastalıklı bitkilerden izole edilen bakteri Kings'B besi ortamında floresan pigment üretmez, NDA ortamında ortası yeşilimsi sarı koloniler oluşturur ve kolonilerden ortama 48 saat içinde mavimsi yeşil pigment yayılır, NSA ortamında levan üretmez, bakteri Gram-negatif, aerobik, spor üretmez, 37°C'de gelişir, nişastayı hidrolize etmez, jelatinini hidrolize eder. Katalaz, oksidaz, L-(+)- arabinoz, D-mannitol ve D-glukozu kullanır. Arginini hidrolize etmez, D-(+) cellobiose kullanmaz. Patojenisite sonuçlarında tütünde hipersensitif reaksiyon oluşturmuş, soğan (*Allium cepa*) dilimlerinde çürümeye neden olmuş, marul (*Lactuca sativa*) da nekrozlara neden olmuş fakat patatest ( *Solanum tuberosum*) yumuşak çürüklük gözlenmemiştir. Domates bitkilerine yapılan inokulasyondan 6 hafta sonra aynı belirtiler gözlenmiş ve bakteri tekrar izole edilmiştir. Çalışma sonucunda hastalığa neden olan bakteri *Pseudomonas corrugata* olarak tanılanmıştır. Bu çalışma Arjantin ve Güney Amerika'da *P. corrugata*'nın domateslerde öz nekrozu hastalığına neden olduğuna dair ilk kayıttır.

Siverio vd (1993), *Pseudomonas corrugata* strainlerindeki serolojik çeşitlilik üzerine yaptıkları çalışmada, farklı ülkelerden elde ettikleri strainlerin serolojilerine immunofloresan yöntemini kullanarak bakmışlardır. Araştırmalar sonucunda tek başına serolojinin *Pseudomonas corrugata*'nın tespitinde yeterli bir metot olmadığını görmüşlerdir (Catara vd 2000). LPS grupları ve serolojileri arasındaki ilişkiye bakmışlardır. Bu çalışma farklı orjinlerden elde edilen *P.corrugata* strainlerini serolojik yöntemlerle kıyaslayan ilk çalışmadır. Bu çalışmayı takiben Siverio vd (1996) *Pseudomonas corrugata* etmeninin yağ asit profillerini araştırmışlardır. Çalışmada

hexane tek olarak ve methyl-tetr butyl ether (MTBE) ile beraber kullanmışlardır. Methyl-tetr butyl ether (MTBE) ile beraber kullanılan hexane uygulamasında *P.corrugata* strainlerinin birbirlerinden farklı yağ asiti profillerine sahip olduğu saptanmıştır. Strainler arasındaki bu farklılığın alt kültürlerin sahip olduğu morfolojik farklılıktan kaynaklandığı görülmüştür. Araştırmadaki düz ve kırışık kolonilerin yağ asiti profillerine bakılınca farklılık doğrulanmıştır. Çalışma sonucunda morfolojik farklılıktan kaynaklanan yağ asit profillerinin değişkenliği lipaz, lektinaz ve jelatin hidrolizi gibi enzimatik aktivitelerin değişkenliğinden kaynaklandığını saptamışlardır. *P.corrugata* strainleri varyete analizlerine göre dört farklı gruba ayrılmıştır. Her iki çalışmada etmenin strainlerinde farklılık göstermesinden dolayı kesin tanıda kullanılamamaktadır (Catara vd 2000).

Lopez vd (1994), biber ve domates bitkilerinde önemli kayıplara neden olan patojenin tanısını yapmak amacıyla fiziksel, serolojik testler, fatty asit (FAME) profilleri ve patojenisite testlerini kullanmışlardır. Ayrıca patojenin plazmid varlığını belirlemeye çalışmışlardır. Çalışma sonucunda hastalığı meydana getiren etmenin *Pseudomonas corrugata* olduğunu tespit etmişlerdir. Bu çalışma *Pseudomonas corrugata*'nın biberlerde hastalık oluşturduğuna dair ilk kayıttır. Ayrıca çalışmada *P. corrugata*'nın büyük bir plazmide sahip olduğu ortaya çıkarılmıştır.

Sutra vd (1997), öz nekrozu hastalıklı domates bitkilerinden izole edilen *Pseudomonas* strainlerinin tanıları üzerine çalışmışlardır. Çalışmalarında *Pseudomonas corrugata* strainlerinin fenotipik çeşitliliği hakkında mevcut bilgileri düzenlemek, *Pseudomonas corrugata* strainlerini FPTPN strainleri (domates öz nekrozundan elde edilen floresan *Pseudomonas* strainleri) ile kıyaslayarak, iki grup arasındaki genetik homolojiyi belirlemeyi amaçlamışlardır. Bu amaçla fenotipik testler, DNA-DNA hibridizasyonları, yağ asit profilleri, lipopolisakkarit örneklerin elektroforezis jelde incelenmesi, serolojik ve patojenisite testlerinden yararlanılmıştır. Çalışma sonucunda öz nekrozuna neden olan patojenler *Pseudomonas corrugata* strainleri ve floresan *Pseudomonas*ları içeren FPTPN strainleri (domates öz nekrozundan elde edilen floresan *Pseudomonas* strainleri) olarak iki gruba ayrılmıştır. İki grup *Pseudomonas corrugata* strainlerinin King's B ortamında floresan pigment üretimi, levan oluşumu ve sorbitol asimilasyonu ayrılmıştır. FPTPN strainleri de kendi aralarında üç alt gruba ayrılmıştır. FPTPN strainleri arasındaki ayrım FP1 ve FP2 levan üretirler sorbitolden faydalanırlar fakat cirocanat ve laevulinatdan faydalanmaz, jelatin ve Tween 80 hidrolizi değişkendir. FP3 jelatini hidrolize eder, Tween 80'ni hidrolize etmez, citrocanat, laevulinat ve N-acetilglukozamin'den faydalanır fakat itakonat, amilamin ve glicineden faydalanmaz. Levan üretimi ve sorbitolden faydalanması değişkenlik göstermektedir (Catara vd 2000).

Abdalla (2000), Mısır'da domates tohumlarında bulunan tohum kökenli patojenik bakterilerin tespiti ve tanısını yapmak amacıyla 75 farklı domates tohumundan izolasyon yapmış, izole edilen bakterilere Gram testi, patojenisite testi, tütünde HR testi, biyokimyasal ve fizyolojik testlerin yanında yarı seçici besi ortamlarından yararlanılmıştır. Çalışmada, %14,7 oranında *Pseudomonas corrugata* ve %12 oranında *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* tespiti yapılmıştır. İzole edilen bakteriler Tween B (McGuire vd 1986), CKTM (Sijam vd 1992), nutrient agar (NA), nutrient agar + 1% dextrose (NAD), pseudomonas agar F (PF) ve Kings'B (KB) (King

vd 1954) ortamlarında geliştirilmiş ve sonuç olarak *Pseudomonas corrugata*'nın diğer ortamlara oranla Tween B ve CKTM ortamlarında daha iyi gelişim gösterdiği saptanmıştır. Bu çalışma izole edilen patojenlerin Mısır'da domates tohumlarında bulunduğuna dair ilk kayıttır.

Catara vd (2000), *Pseudomonas corrugata*'nın tanısı biyokimyasal, serolojik, fatty asit ve patojenisite testleriyle türler arasındaki benzerliklerden dolayı kesin olarak yapılamamakta (Siverio vd 1993, Siverio vd 1996, Sutra vd 1997) ve uzun zaman almasından dolayı çalışmalarında *Pseudomonas corrugata* strainlerinin tanısı için RAPD-PCR yöntemini kullanmışlardır. RAPD PCR yönteminde OPA1, OPA4, OPA9, OPA10 ve OPA20 primerlerini kullanmışlardır. Genomik DNA izolasyonu, klonlama ve sekanslama yapmışlardır. Çalışma sonucunda farklı iki strainden klonlanan DNA ampliconlarından iki çift spesifik primer sekansı elde etmişlerdir. Strainler 600 bp ve 1100 bp büyüklüğünde iki farklı spesifik bant oluşturmuştur ve buna bağlı olarak da strainleri iki farklı grup olarak sınıflandırmışlardır. Her iki grup için de iki çift primer dizayn etmişlerdir. PC5/1 (5' CCACAGGACAACATGTCCAC 3') ile PC5/2 (5'CAGGCGCTTTCTGGAACATG 3') primerleri 1100 bp'lik amplicon, PC1/1 (5'GGATATGAGCCAGGTCTTCG3') ile PC1/2 (5' CGCTCAAGCGCGACTTCAG 3') primerleri 600 bp'lik amplicon vermektedir. Öz nekrozuna neden olan *Pseudomonas corrugata* strainleri dizayn edilen primerler ile pozitif sonuç verirken diğer öz nekrozuna neden olan (FPTPN) floresan *Pseudomonas* FP1, FP2 ve FP3 türleri her iki primer setiyle denenmiş ve herhangi bir amplicon gözlenmemiştir. Bu çalışma *Pseudomonas corrugata*'nın tanısını kısa süre içerisinde kesin tanısını mümkün kılması ve diğer çalışmalara kaynak oluşturması açısından önemlidir.

Cirvilleri vd (2000), çalışmalarında *Pseudomonas corrugata* tanısında luciferase genlerinin bir marker olarak kullanılabilirliğini araştırmışlardır. *Pseudomonas corrugata* *Vibrio fisherii*'nin *lux* operonuyla modifiye edilmiş operonun *Pseudomonas corrugata* 4.3 t *lux* 18 straini ile 4.3 t yabancı strainini, koloni morfolojisi, patojenisite, *in vitro* gelişim ve domates bitkisindeki meydana getirdiği enfeksiyon şiddeti yönünden kıyaslanmıştır. Çalışma sonucunda yabancı ve mutant strainin aynı özelliklere sahip olduğu saptanmıştır.

Ülke (2003), domateslerde öz nekrozuna neden olan etmenler *Pseudomonas cichorii* ve *Pseudomonas corrugata*'nın tanısını klasik bakteriyolojik yöntemler, serolojik yöntem ELISA ve moleküler tekniklerden PCR ile yapmıştır. Epidemiyoloji çalışmalarında etmenlerin tohum, toprak ve bitki artıklarında yaşam sürelerini belirlemiştir. Etmenlerin mücadelesinde tohum uygulamaları, solarizasyon uygulaması, antagonistler, bitki ekstraktlarının etkisi araştırmıştır. *P. corrugata*'nın beş, *P. cichorii*'nin dört ay domates tohumlarında yaşayabildikleri ve tohumlarda birincil inokulum kaynağını oluşturdukları saptanmıştır. Her iki etmenin de toprakta yaklaşık dört ay yaşamlarını sürdürebildikleri saptanmıştır. Bitki artıklarında *P. corrugata* yaklaşık iki ay yaşamını sürdürebilmiş ancak, *P. cichorii* ilk inokulum gününden itibaren tekrar izole edilememiştir. Uygulamada pratik olması ve çimlenmeye etkisi göz önüne alındığında tohum uygulamalarından en etkili olarak Bronopol (Bronotak®) tespit edilmiştir ve etmenlerin toprak ve bitki kalıntılarındaki yapay ve doğal inokulumunu azaltmada etkili olduğunu saptanmıştır. Patojenlerin gelişimini *in vivo* koşullarda, %80'e varan ümitvar antagonist izolatlar tespit edilmiştir.

Alippi vd (2003), Arjantinde domates ve biber bitkilerinde öz nekrozu hastalığına neden olan patojenlerin tanılanması amacıyla yaptıkları çalışmada izole edilen patojenlerle referans strainlerden yararlanarak fenotipik özellikleri, Gram testi, NSA ortamında levan oluşumu, katalaz üretimi testi, ELISA testi, patojenisite testi, DNA parmak izleri, 16S rRNA gen fragmentleri, RFLP analizleri yapılarak, bakır ve antibiyotiğe hasasiyetleri karşılaştırılmıştır. Bakıra dayanıklılık testinde 40, 80, 180, 200, 240, 280 ve 300 µg/ml konsantrasyonları denenmiş ve tüm *Pseudomonas corrugata* strainleri 200-300 µg/ml konsantrasyonunda bakıra dayanıklı olduğu saptanmıştır. *Pseudomonas corrugata* strainleri Streptomycine %50 dayanıklı bulunurken Oxytetracyclin'e %44 oranında dayanıklı bulunmuştur. Çalışmada strainler arasında genetik çeşitlilikler saptanmıştır. Bu çalışma, *Pseudomonas corrugata* strainlerinin bakıra dayanıklılıklarının kıyaslandığı ilk çalışmadır ayrıca araştırmada *Pseudomonas viridiflava*'nın biberde öz nekrozu hastalığına neden olduğu ilk defa rapor edilmiştir. *Pseudomonas viridiflava*'nın bakıra dayanıklılığı değişkenlik göstermiştir.

Solaiman vd (2005), *Pseudomonas corrugata*'nın biyoteknolojik olarak kullanılabilmesini agro-industrial atıkları medium-chain-length polyhydroxyalkanoates (mcl-PHA) gibi faydalı mikrobiyal biopolimerlere dönüştürebildiğini rapor etmişlerdir. Buna ek olarak *P. corrugata*'nın antimikrobiyal ve biosurfactant activity gösteren cyclic lipopeptid (CLP) maddeler ürettiklerini bildirmişlerdir. Sağladıkları faydalar *P. corrugata*'nın önemini arttırmış biyoteknolojik konularda çalışan araştırmacıların ilgilerini çekmiştir (Licciardello vd 2012, Licciardello vd 2014).

Guo vd (2007), domateslerde fitopatogenlere karşı kullanılacak strainlerin belirlenmesi amacıyla izole ettikleri 628 strainin *Botrytis cinerea* patojenine karşı antogonistik etkilerini araştırmışlardır. P94 strainin antogonistik aktivite gösterdiğini tespit etmişler ve strainin tanılanması amacıyla 16S rDNA sekans analizi, klasik PCR, biyokimyasal ve fizyolojik testlerden yararlanmışlardır. 63F,1494R, PC 1/1, PC 1/2, PC 5/1, PC 5/2 primerlerini kullanarak yapılan PCR sonucunda P94 strainin *Pseudomonas corrugata* olduğunu tespit etmişlerdir. *Pseudomonas corrugata* P94 strainin biyolojik mücadelede kullanılabilmesini rapor etmişlerdir.

Licciardello vd (2014), endüstri uygulamalarına kaynak oluşturması amacıyla fitopatogenik bir bakteri olan ve mikrobiyal biopolimerler (mcl-PHA) üreten *Pseudomonas corrugata*'nın genom dizilimini çıkarmışlardır. Sekans analizinde İtalya'daki hastalıklı domates bitkilerinden izole edilen ve type strain olarak kabul edilen CFBP 5454 strainini kullanmışlardır. Çalışma sonucunda *Pseudomonas corrugata*'nın genom büyüklüğü 6.193.893 bp, G-C içeriği % 60,51, total gen sayısı 6211, protein kodlayan gen sayısı 6165 olarak bulunmuştur.

*Pseudomonas corrugata* Dünya'da domateslerde öz nekrozuna neden olan en yaygın patojen olarak meydana getirdiği zararla bilinmesine rağmen, bu bakteriden bitki korumada biyolojik ajandan (Chun ve Leary 1989, Cirvilleri vd 2001, Smilanick vd 1993, Mark vd 2006), biyoremediasyon (Kuiper vd 2004) ve biyoplastik (Olivera vd 2001) üretimine kadar bir çok alanda yararlanılmaktadır (Gustine vd 1990, Ryder ve Roveria 1993, Solaiman vd 2005, Guo vd 2007, Catara 2007, Licciardello vd 2012, Licciardello vd 2014).



*Pseudomonas corrugata*'nın meydana getirdiği zararların yanında buğdaylarda *Gaeumomyces graminis*'in neden olduğu kara bacak hastalığını baskılayıcı özelliğe sahip olması, *Trifolium repens*'in yaprak sapı ve kallusunda fitoaleksinin (medikarpin) biyosentezini uyaran patojen kaynaklı elisitör aktif fraksiyonlara ve peptid karakterli hipersensitif reaksiyon elisitörü metabolitlere sahip olması nedeniyle yararlı bir biyokontrol ajanı olarak değerlendirilmiştir (Gustine vd 1990, Ryder ve Roveria 1993, Guo vd 2007).

*Pseudomonas corrugata*'nın genelde rizosferde bulunarak bitki patojeni fungus ve bakterilere karşı etkili olmasından dolayı biyolojik ajan (Biological Control Agents) (BCAs) olarak tanımlanmıştır (Chun ve Leary 1989, Cirvilleri vd 2001, Smilanick vd 1993). *In vitro* denemelerde *P. corrugata*'nın *Bacillus* spp., *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Brenneria quercina*, *Burkholderia cepacia*, *P. syringae* pv. *pisii*, *P. syringae* pv. *tomato*, *Agrobacterium tumefaciens* (Bell vd 1995, Chun ve Leary 1989, Cirvilleri vd 2001) bakteri türlerine ve *Gaeumomyces graminis* var. *tritici* (Ryder ve Rovira 1993), *Pythium aphanidermatum* (Zhou ve Paulitz 1993), *Gibberella pulicaris* (Schisler ve Slilinger 1994), *Penicillium digitatum*, *Botrytis cinerea* (Cirvilleri vd 2000), *Sclerotinia sclerotiorum* (Fernando vd 2005) fungus türlerine karşı etkili olduğu rapor edilmiştir.

*Pseudomonas corrugata*'nın biyolojik ajan olarak gösterilmesi rizosferde yüksek miktarda bulunmasına ek olarak çok sayıda Gram-pozitif, Gram-negatif bakteriler ve fungal patojenlere karşı etkili olmasından ve kötü koşullara karşı rekabet yeteneğinin yüksek olmasından kaynaklanmaktadır (Meyer vd 2002, Risse vd 1998). *Pseudomonas corrugata*'nın antimikrobiyal aktivitesine neden olan temel unsurun LPDs (Emanuele vd 1998, Scaloni vd 2004), uçucu inhibitörler (Fernando vd 2005), hidrojen siyanid (Ramette vd 2003), 2,4-diacetylphluoroglucinol (GenBank nos. AJ515694, AJ515693, AJ515692), pyrrolnitrin (Garbeva vd 2001) üretilmelerinden kaynaklandığı araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir.

## 2.5. *Pseudomonas fluorescens* İle İlgili Kuramsal Bilgiler

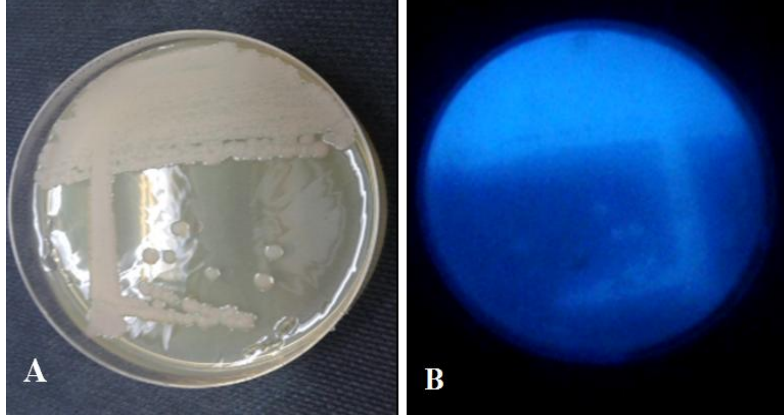
Gövde nekrozuna neden olan *Pseudomonas fluorescens*'in varlığı ilk olarak Yunanistan Alivizatos (1984) ve Portekiz Jacob (1991) tarafından rapor edilmiştir.

Çizelge 2.6. *Pseudomonas fluorescens*'nin bilimsel sınıflandırılması

<b>Alem</b>	Bacteria
<b>Bölüm</b>	Proteobacteria
<b>Sınıf</b>	Gamma Proteobacteria
<b>Takım</b>	Pseudomonadales
<b>Familiya</b>	Pseudomonadaceae
<b>Cins</b>	<i>Pseudomonas</i>
<b>Tür</b>	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (Flugge 1886) Migula 1895

*Pseudomonas fluorescens* Gram-negatif, çubuk şekilli, spor oluşturmeyen, peritrik kamçılı, obligat aerob, genom büyüklükleri  $6.06 \times 10^9$  baz çifti, DNA'sının G-C içeriği %60,1 (Dueholm vd 2014), oksidaz, arginin dihidrolaz ve jelatin hidrolizi pozitif,

pektolitik değil, NSA ortamında levan oluşturur, tütünde HR göstermez, nitrat indigenmesi yok, King's B ortamında floresan, gelişebildikleri sıcaklıklar değişiklik göstermektedir. 4°C sıcaklıkta gelişme gözlenirken, 40°C'de gelişme gözlenmemiştir. Optimum gelişme sıcaklığı 25-30°C'dir. Optimum gelişme pH'sı 6-7 aralığındadır (Palleroni 2005).



Şekil 2.11. A. *Pseudomonas fluorescens*'in King's B ortamındaki görüntüsü, B. UV ışığı altındaki floresan görüntüsü (Bu çalışmadan)

*Pseudomonas fluorescens* domateslerde öz nekrozu hastalığına, bitkilerin gövdelerinin özünde renk değişimine, öz boşalmasına, yaprakların sararıp solmasına gövdede dışa veya öz boşluğuna doğru yan kök oluşmasına ve sonunda bitkinin tamamen ölümüne neden olmaktadır.



Şekil 2.12. *Pseudomonas fluorescens*'in enfeksiyonu sonucunda domates gövdesindeki öz nekrozu belirtisi (A), domates gövdesinde ortaya çıkan adventif kök oluşumu (B) (Bu çalışmadan)

*Pseudomonas fluorescens* antimikrobiyal metabolitler üretmelerinden dolayı toprak kökenli patojenlerin gelişimini engellemekte ve biyolojik ajan olarak bitki

korumada yaygın olarak kullanılmaktadır (Vincent vd 1991, Keel vd 1992, Kraus ve Loper 1992, Mazzolla vd 1992, Fenton vd 1992, Pfender vd 1993 Cronin vd 1997, Rodriguez ve Pfender 1997, Sharifi-Tehrani vd 1998, De Souza vd 2003, Haas ve Keel 2003, Iavicoli vd 2003, Morrissey vd 2004, Haas ve D efago 2005, Rezzonico vd 2006).

Rhodes (1959), yaptıkları çalışmada topraktan ve sudan izole edilen 169 floresan *Pseudomonas* izolatının karakterizasyonunu sitolojik, fiziksel, biyokimyasal testleri kullanarak tanımlamışlardır. Howell ve Stipanovic (1979, 1980) pamuk fidelerinin rizosferlerinden izole edilen *Pseudomonas fluorescens* strainlerinin *Rhizoctonia solani* fungal patojenlerine karşı antogonistik etki gösterdiğini saptamışlardır. Saptanan antogonistik etkinin pyrolnitrin (3-chloro-4-[2'-nitro-3'-chlorophenyl]- pyrrole) antibiyotiği üretmelerinden kaynaklandığını ve bu antibiyotiğin *Thielaviopsis basicola*, *Alternaria* spp., *Verticillium dahliae* fungal patojenlerine karşı da etkili olduğunu rapor etmişlerdir. Ayrıca alışmada *Pseudomonas fluorescens*'nin ürettiği antibiyotiklerin *Fusarium* spp. patojenin gelişimini kısmen engellerken *Pythium ultimum* gelişimini engellemediğini gözlemlemişlerdir.

Bitki köklerinde kolonize olan *Pseudomonas fluorescens* CHA0 straini toprak kökenli fungal bitki patojenlerine karşı etkili olmasından dolayı biyolojik ajan olarak biyolojik mücadele çalışmalarında model strain olarak kabul edilmiştir (Natsch vd 1994, Troxler vd 1997, De'fago vd 1997, Hase vd 1999, Hase vd 2000, Mascher vd 2000, Rezzonico vd 2003, Lawongsa vd 2012). Ancak kullanılan biyolojik mücadele ajanının etkinliği evre koşullarına ve konukçu bitki türüne göre değişkenlik gösterdiği rapor edilmiştir (Notz vd 2001, Lawongsa vd 2012). Araştırmacılar toprak kökenli floresan *Pseudomonas*'ların biyolojik ajan olarak kullanılmasında katabolik olarak çok yönlü metabolizmaya sahip olması, konukçu bitki köklerinde yüksek kolonize olma yeteneği, ürettiği enzim ve metabolitler ile bitkilerin biyotik ve abiyotik stress koşullarını atlatmasına katkıda bulunmasının etkili olduğunu belirtmişlerdir (Ramamoorthy vd 2001, Vivekananthan vd 2004, Mayak vd 2004).

Sutra vd (1997), gövde nekrozuna neden olan floresan *Pseudomonas* türlerinin tanısı ve taksonomisi ile ilgili yaptıkları çalışmada floresan *Pseudomonas*'ları 3 genomik gruba ayırarak bir çok özellik bakımından *P. corrugata*'ya benzediğini saptamışlardır. Yapılan çalışmalarda 1. ve 2. genomik grupların fenotipleri bakımından birbirine yakın olduğunu ve genomik grup 3 citraconat ve laevulinat organik tuzlarını kullanması genomik gurup 1 ve 2'den ayrıldığını tespit etmişlerdir. Lipopolysaccaride ve yağ asiti analizleri ile 3 farklı genom olduğunu ve bu 3 farklı genomlarında, *P. corrugata*'dan farklı olduğunu belirlemişlerdir. Bu üç farklı genomik grubu FP1, FP2 ve FP3 olarak belirtmişlerdir.

Mavrodi vd (2002), özellikle fungal patojenlerden dolayı üretimin sınırlandığı üretim alanlarında antifungal metabolitler üreten *Pseudomonas fluorescens* strainlerinin biyolojik ajan olarak kullanılma olanaklarını araştırmışlardır. Çalışmada *Pseudomonas fluorescens* strainlerinin sentezlediği antifungal metabolitlerden 2,4-diacetylphloroglucinol (2,4-DAPG)'un (Shanahan vd 1992, Cook vd 1995, Thomashow ve Weller 1996, Mavrodi vd 2001, Thomashow vd 2002) *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (Cook ve Weller 1987, Harrison vd 1993, Pierson ve Weller 1994, Raaijmakers ve Weller 1998), *Thielaviopsis basicola* (Stutz vd 1986, Keel vd 1992)

*Pythium ultimum* (Fenton vd 1992), *Fusarium oxysporum* sp. *lysopersici* (Duffy ve De Fago 1997) yanında bir çok fungal patojene karşı mücadelede etkili olduğu bildirilmiştir.

Şahin vd (2005), öz nekrozu simptomsu gösteren hastalıklı bitkilerden izole edilen patojenlerin tespit ve tanımlarını yapmak amacıyla morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal, patojenisite ve FAME (Fatty acid methyl ester analysis) yöntemlerini kullanmışlardır. Çalışma sonucunda öz nekrozuna neden olan patojenlerin *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mediterranea*, *Pseudomonas viridiflava*, *Pseudomonas cichorii* ve *Pseudomonas corrugata* olduğunu rapor etmişlerdir. Çalışma *Pseudomonas fluorescens*'in ülkemizde öz nekrozuna neden olduğuna dair ilk kayıttır.

De Souza vd (2003), yaptıkları biyokimyasal, yağ asiti analizleri (FAME) ve genetik çalışmalar sonucunda altı *Pseudomonas fluorescens* strainin zoosporla çoğalan oomycetes ve diğer zoosporik fungusların zoosporlarına zoosporisidal etki gösterdiğini saptamışlardır.

Saygılı vd (2004), farklı bölgelerdeki öz nekrozu hastalıklı domateslerden izole edilen 27 izolatanın tanımlanması ve karakterizasyonu amacıyla yaptıkları çalışmada patojenisite, biyokimyasal ve fatty asit (FAME) testi yapmışlardır. Biyokimyasal testler sonucunda tüm izolatlar Gram-negatif, oksidaz, arginin dihidrolaz ve jelatin hidrolizi pozitif, pektolitik değil, NSA ortamında levan oluşumu pozitif, tütünde HR negatif, nitrat indigenmesi negatiftir. Fatty asit analizi sonucu patojenin *Pseudomonas fluorescens* olduğunu rapor etmişlerdir. Bu çalışma patojenin Türkiye'de öz nekrozu hastalığına neden olduğuna dair ilk kayıttır. Çalışmada referans olarak *Pseudomonas fluorescens* biotip 1 (CFBP 2101, Fransa) straini kullanılmıştır.

Paulsen vd (2006), toprak kökenli olan ve bitki rizosferlerinde yaygın olarak bulunarak bitkinin gelişimini teşvik eden ve fitopatogenlerin gelişimini engelleyen sekonder metabolitler üreten *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 strainin genom dizilimini tamamlamışlardır. Çalışmada canlıya ait tüm verileri içeren genom dizisinin elde edilmesiyle *Pseudomonas fluorescens* ile ilgili gelecek çalışmalara kaynak oluşturması ve diğer türlerden farklılığın ortaya konması amaçlanmıştır. Çalışma sonucunda *Pseudomonas fluorescens* genom büyüklüğü 7.074.893 baz çifti, G-C içeriği %63,3, protein kodlayan 3.822 gen, rRNA 5, tRNA 71 ve totalde 6144 proteinden diğer *Pseudomonas* türleriyle homoloji göstermeyen 656 adet proteinin varlığını saptamışlardır. Çalışma sonucu elde edilen genom dizilimine GenBank'tan accession number; CP000076 ile ulaşılabileceğini belirtmişlerdir.

Pujol vd (2006), elma ağaçlarında *Erwinia amylovora* neden olduğu ateş yanıklığı hastalığına karşı biyolojik mücadele ajanı olarak kullanılan *Pseudomonas fluorescens* EPS62e straininin elma çiçek ve yapraklarında kolonize olan populasyon dinamiğinin izlenmesi amacıyla Real-Time PCR yöntemini kullanmışlardır. Çalışmalarında 67 *Pseudomonas fluorescens* straini ve yakın akraba olan 30 farklı *Pseudomonas* straini denemişlerdir. SCAR 450R, 900F primerlerini kullanarak elde ettikleri sekans diziliminden 83 bp'lik amplicon veren Q 450F (5' AATGGGCTTGCGTCGAGTT 3'), SCAR 450R (5' CGGTTAGATCCGACAAGATTAGAG 3') primerleri ile 450 PBR VIC-

CCGCCACTACCAGGCTATTCAGCTGC-TAMRA TaqMan probu ve 65 bp'lik amplicon veren SCAR 900F (5'CTCGCGTTGAGAGCAGAGAAC 3'), Q 900R (5'TGTGCCCAATTAGAAGCTGTTG 3') primerleri ile 900 PBR FAM-CTCGATGGCCCTCACCAGGC-TAMRA TaqMan probunu dizayn etmişlerdir. Çalışmada *Pseudomonas fluorescens* strainlerin tanısı Real-Time PCR ile kısa sürede yapılmıştır. Populasyonda zamana bağlı artış çiçeklerde düzenli olarak devam ederken, yapraklarda Real-Time PCR sonuçları ile kültürde geliştirilen bakteri sayısında farklılıklar ortaya çıkmıştır. Bu durumun yapraklarda var olan ama ölmüş bakteriyel hücreler ya da ortamda canlı bulunan kültürde geliştirilemeyen (viable but nonculturable (VBNC) evresinde olan) bakterilerden kaynaklı olduğunu saptamışlardır. Çalışmada sonuç olarak *Pseudomonas fluorescens* EPS62 strainin populasyonu uygun koşullarda çiçeklerde artarken, yapraklarda stres koşullarında azalmalar görülebileceği ortaya konulmuştur. Strainin biyolojik olarak etkinliği ve varlığının kontrolü için hem kültür ortamında geliştirme hem de Real-Time PCR işleminin eş zamanlı olarak yapılması gerektiği bu çalışmayla ortaya konulmuştur.

Pekhtereva vd (2006), Rusya'da öz nekrozu simptomsu gösteren bitkilerden izole edilen 110 izolatin karakterizasyonunu yapmışlardır. Çalışma sonucunda öz nekrozuna neden olan patojenlerin *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas viridiflava* ve *Pseudomonas fluorescens* olduğunu rapor etmişlerdir.

Molan ve İbrahim (2006), Suudi Arabistan'da 2002-2004 yılları arasında yapılan sörveylerde öz nekrozu hastalıklı domateslerden izole edilen patojenlerin tespit ve tanımlarını yapmışlardır. Çalışma sonucunda öz nekrozuna sebep olan patojenlerin *Pseudomonas corrugata* ve *Pseudomonas fluorescens* (biotype 1) olduğunu rapor etmişlerdir. Bu çalışma öz nekrozu hastalığının Suudi Arabistan'da domateslerde görüldüğüne dair ilk kayıttır.

Mavrodi vd (2007), biyolojik mücadelede kullanılan 2,4-Diacetylphloroglucinol-üreten *Pseudomonas fluorescens* strainlerinin bitki rizosferinden tanımlarını Real-Time PCR ile yapmak amacıyla primer dizayn etmişler ve SYBR Green kullanmışlardır. Çalışmalarında *phlD* genine sahip *phlD*<sup>+</sup> *P. fluorescens* A (Pf-5), B (Q2-87), D (Q8r1-96 and FTAD1R34) ve I (FTAD1R36) strainlerin her birine özel Real-Time primer ve protokolleri hazırlamışlardır. Çalışma sonucunda geliştirilen Real-Time PCR ile *Pseudomonas fluorescens*'in populasyon yoğunluğu ve tespiti direkt bitki rizosferinden ve topraktan yapılabilmektedir.

Saravanakumar ve Samiyappan (2007), yer fıstığı (*Arachis hypogea*) bitkilerinde tuzluluk stresi koşullarında *Pseudomonas fluorescens*'in ürettiği 1-aminocyclopropane-1-carboxylic asitinin (ACC) etkisini araştırdıkları çalışmada bitki büyümesini teşvik eden (PGPR) dört bakteri straininden yararlanmışlardır. İlk olarak strainlerin tanımlarını ITS1F, ITS2R primerlerini kullanarak strainlerin *Pseudomonas fluorescens* olduklarını tespit etmişlerdir. Dört strainden sadece *Pseudomonas fluorescens* TDK1 straini ACC aktivitesi gösterdiği biyokimyasal ve PCR sonuçlarında gözlemlenmiştir. ACC maddesinin verimi etkileyen parametreler arasında olduğu görülmüştür. *Pseudomonas fluorescens* TDK1 straini tarafından sentezlenen ACC aktivitesi bitkilerde biyokimyasal olayların ilerlemesini sağlayan etilen hormonuna etki gösterdiği bu nedenle stress koşullarında bu strainden yararlanılabileceğini rapor etmişlerdir.

Subramanian vd (2009), ipek böceği yetiştiriciliği yapılan mikrofloradaki faydalı mikroorganizmaların tanılanması amacıyla klasik PCR yöntemini kullanmışlardır. Çalışmalarında *Streptomyces* türlerinin tanılanmasında SrepB, StrepE primerlerini (Rintala vd 2001), *Pseudomonas fluorescens*'in tanılanmasında ITS1F, ITS2R primerlerini (Rameshkumar vd 2002), *Bacillus subtilis*'in tanılanmasında Bsub5F, Bsub3R primerlerini (Wattiau vd 2001) kullanmışlardır. Elde edilen ampikonlar ile sekans analizi yapılmış ve blast sonucunda gen bankasıyla %99 homoloji gösterdiği saptanmıştır. Çalışma sonucu elde edilen dizilerin diğer çalışmalara kaynak oluşturmasını hedeflemişlerdir.

Lawongsa vd (2012), yaptıkları çalışma kapsamında *in-vitro* koşullarda Tayland'dan pirinç bitkisinin rizosferinden izole edilen *Pseudomonas fluorescens* R21 strainiyle İrlanda'dan şekerpancarı rizosferlerinden izole edilen *Pseudomonas fluorescens* F113 strainlerinin fitopatogenlere karşı antogonistik aktivitelerini kıyaslamışlardır. Çalışma sonucunda her iki strainin de *Pythium* spp. türlerini baskı altına aldığı rapor edilmiştir. Her iki straininde pyoluteorin, pyrrolnitrin, hydrogen cyanide ve 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG) gibi patojenlerin gelişimini engelleyen sekonder metabolitlerin yanında R21 strainin bitki gelişimini teşvik eden IAA oluşturduğu saptanmıştır (Lawongsa vd 2008). Ayrıca R21 strainin pirinçlerde bitki boy uzunluğunu, sürgün ve köklerin kuru ağırlığını arttırdığı gözlenirken, F113 strainle kontrolde bitki gelişiminde herhangi bir fark gözlenmemiştir. *Pseudomonas fluorescens* strainlerinin tanısında 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG) sentezinden sorumlu *phlD* ve *phlA* gen bölgesine göre dizayn edilen Phl2a, Phl2b (Raaijmakers vd 1997) ve phlA-1f, PhlA-1r spesifik primerleri (Rezzonico vd 2003) kullanılmış ve pozitif sonuç alınmıştır.

Dimartino vd (2011), İtalya'da 2006-2008 yılları arasında yapılan sörveylerde topraklı ve topraksız kültür domates yetiştiriciliğinde karşılaşılan öz nekrozu hastalıklı bitkilerden izole ettikleri patojenlerin tespit ve tanısını yapmışlardır. Çalışmaları sonucunda 158 izolattan 21 tanesinin *Pseudomonas fluorescens* biovar 1 olduğunu rapor etmişlerdir.

## **2.6. *Pseudomonas mediterranea* İle İlgili Kuramsal Bilgiler**

Catara ve ark. (2002), Fransa, İtalya ve İspanya'da domateslerde gövde nekrozu simptomu gösteren bitkilerden izole ettikleri floresan *Pseudomonas* türleri ile yaptıkları çalışmada 20 biyokimyasal test, DNA-DNA hibridizasyonu, Rep-PCR ve Box-PCR sonuçlarına göre *Pseudomonas corrugata*'ya yakın akraba olan ilk olarak PCR sonuçlarında ikinci bir grup olarak tanımlanan bakterinin yeni bir tür olduğunu ve *Pseudomonas mediteranea* olarak isimlendirilmesini önermişlerdir. Çalışma sonucunda domateslerde gövde nekrozuna neden olan yeni bir bakteri türü saptanmıştır. İlerleyen yıllarda *Pseudomonas mediteranea*'nın Portekiz'de (Moura vd 2005) ve Türkiye'de (Basım vd 2005) domateslerde öz nekrozu hastalığına neden olduğu rapor edilmiştir.



Çizelge 2.7. *Pseudomonas mediterranea*'nın bilimsel sınıflandırılması

<b>Alem</b>	Bacteria
<b>Bölüm</b>	Proteobacteria
<b>Sınıf</b>	Gamma Proteobacteria
<b>Takım</b>	Pseudomonadales
<b>Familya</b>	Pseudomonadaceae
<b>Cins</b>	<i>Pseudomonas</i>
<b>Tür</b>	<i>Pseudomonas mediterranea</i> Catara et al. 2002

*Pseudomonas mediterranea* Gram-negatif, polar kamçılara sahip, aerobik, oksidaz pozitif, King's B ortamında floresan pigment üretmez, levan oluşturmaz, hücreler arası depo granülü olarak poly- $\beta$  hidroksibutirat kullanan, pektolitik değil, sarıdan kahverengine dönen pigment oluşturan, nitrati nitrite indirgeyen (Lelliot ve Stead 1987), YBGA ortamında kırışık ya da düz koloniler oluşturan bir bakteridir. Strainlerin bir kısmı tütün bitkisinde hipersensitif reaksiyona (HR) neden olur. Strainlerin çoğu 15 gün inkübasyondan sonra arjinin pozitif, Tween 80'i hidrolize eder, jelatini hidrolizi değişkendir. Sukroz ve mannitoldan asit üretimi pozitif fakat eritrol ve sorbitolden asit üretimi negatiftir. *P. mediterranea* *Pseudomonas* rRN group I ile (medium-chain-length polyhydroxyalkanat (mcl-PHAs) biriktirmesi yönünden benzerlik göstermiştir (Kessler ve Palleroni 2000, Solaiman vd 2000, Solaiman vd 2005).



Şekil 2.13. *Pseudomonas mediterranea*'nın enfeksiyonu sonucunda domates gövdesindeki öz nekrozu belirtisi (A), hastalık sonucu domates gövdesinde ortaya çıkan adventif kök oluşumu (B) (Bu çalışmadan)



Şekil 2.14. Nutrient Agar besi ortamında *Pseudomonas mediterranea*'nın koloni gelişimi (Bu çalışmadan)

Basım vd (2005), Akdeniz bölgesinde domateslerde yaygın olarak görülen öz nekrozu hastalığına neden olan patojenin tanılanması amacıyla yaptıkları çalışmada biyokimyasal ve moleküler yöntemleri kullanmışlar. Çalışma sonucunda hastalığa neden olan patojenlerin *Pseudomonas corrugata* ve *Pseudomonas mediterranea* olduğunu rapor etmişlerdir. Bu çalışma, *P. mediterranea*'nın Türkiye'de öz nekrozu hastalığına sebep olduğuna dair ilk kayıttır. *P. mediterranea* aerobik, NA besi ortamında düz, KB ortamında floresent değil, oksidaz pozitif, levan oluşumu yok, pektolitik değil, nitratı nitrite indirger (Lelliot ve Stead 1987). Hastalıklı bitkilerden izole edilen 83 izolata patolojik ve biyokimyasal testler uyguladıktan sonra kesin tanıların yapılması amacıyla klasik PCR ve BOX-PCR yöntemlerini kullanmışlardır. PCR yönteminde (PC5/1, PC5/2, PC1/1, PC1/2) (Catara vd 2002) tanı primerlerini kullanmışlardır.

Basım ve Yılmaz (2005), Batı Akdeniz Bölgesinde domates yetiştiriciliğinde ciddi ekonomik kayıplara yol açan domates öz nekrozu hastalık etmenlerinden *Pseudomonas corrugata* ve *Pseudomonas mediterranea* izolatlarının Multiplex-PCR ve Real-Time PCR yöntemleriyle kesin ve hızlı tanıları yapmışlardır. Hastalık etmeni bakteriler ile Nutrient Sakkaroz Agar (NSA) ortamında levan oluşumu, oksidaz testi, patates testi, arginini dihidrolaz testi ve tütünde hypersensitif reaksiyon testini içeren LOPAT testleri uygulanmıştır. Çalışmada (PC5/1, PC5/2, PC1/ 1, PC1/2) (Catara vd 2002) klasik PCR primerlerini kullanmışlar elde ettikleri fragmentlerden Real-Time primer setleri dizayn etmişlerdir. Real-Time PCR yönteminde yalnızca çift sarmallı DNA'ya bağlandıklarında floresan ışığa veren bir boya olan SYBR Green tekniği kullanmışlardır. *P. corrugata* ve *P. mediterranea*'nın tespitinde klasik PCR yönteminin hassasiyeti sırasıyla  $1.5 \times 10^6$  hücre/ml ve  $1.0 \times 10^6$  hücre/ml iken, RT-PCR yönteminde hassasiyet her iki patojen bakteri için klasik PCR'a göre 10 000 kez daha hassas düzeyde *P. corrugata* için  $1.8 \times 10^2$  bakteri/ml ve *P. mediterranea* için  $1.6 \times 10^2$  hücre/ml olarak belirlemişlerdir. Geliştirdikleri Multiplex-PCR ve Real-Time-PCR yöntemleriyle patojen bakterilerin moleküler tanıları, hem direkt *P. corrugata* ve *P. mediterranea* hücrelerinden hem de hastalıklı bitki dokularından çok kısa sürede (30-45 dakika)



sağlanmıştır. Optimizasyon çalışmaları sonucunda elde edilen ve SYBR Green kullanılarak yapılan Real-Time PCR yöntemiyle *P. corrugata* ve *P. mediterranea*'nın moleküler düzeyde tespitleri yüksek hassasiyette yapılabileceğini ortaya koymuşlardır.

Solaiman vd (2005), yaptıkları çalışmada PCR metodunu kullanarak *Pseudomonas corrugata*'da 2-pha-distinguishable grup bulmuşlar ve *P. mediterranea*'nın mcl-PHA'yı üretmesiyle bu iki tür arasındaki farklılığını ortaya koymuşlardır. *P. corrugata* ve *P. mediterranea* fenotipik olarak *P. mediterranea* strainleri meso-tartrate, 2-ketogluconate ve histamine metabolize edebilmesinden ayırt edilebileceğini belirtmişlerdir.

Licciardello vd (2011), yakın akraba olup domateslerde benzer simptom gösteren öz nekrozu patojenlerinden *Pseudomonas corrugata* ve *Pseudomonas mediterranea*'nın tespiti için hızlı ve hassas bir yöntem olan Dublex Real-Time PCR metodunu kullanmışlardır. Çalışmada (PC5/1, PC5/2, PC1/1, PC1/2) (Catara vd 2002) klasik PCR primerlerini kullanmışlar elde ettikleri fragmentlerden Real-Time primer ve prob setleri dizayn etmişlerdir. *Pseudomonas corrugata*, Real-Time PCR ile tespiti için 149 bp DNA fragmenti veren PcoFw (5'-GGTGGTATCGGTTGCGTAGCG-3'), PcoRew (5'-GTGGGAACGTTTGGGCCTGG-3') primerlerini, *Pseudomonas mediterranea*'nın Real-Time ile tespiti için 85 bp DNA fragmenti veren PmeFor (5'-CTGTCCGAGACGATGGCGAC-3'), PmeRew (5'-CAGACGTGGCCTCAAGCAGAT-3') primerlerini ve *P. corrugata* için Pco (5'-FAM-CCGCCCCATCTGCCACCCTGC-3' BHQ-1) ve *P. mediterranea* için Pme (5'-TXR-CCCGCTCATCCGCTGGACCGGC-3' BHQ-2) TaqMan problemlerini kullanmışlardır. Geliştirdikleri primer ve TaqMan prob setleriyle tek PCR tüpünde patojenlerin tespitini ve tanımlarını kısa ve hassas bir şekilde yapmışlardır. Çalışmada domateslerde hastalık meydana getiren farklı bitki patojeni bakterileri kullanılarak primer ve problemlerin spesifikliğı test edilmiştir. Çalışma sonucunda patojenlerin bakteriyel hücreden, tohumdan ve hastalıklı bitki materyallerinden hızlı ve hassas bir şekilde tespitinin ve tanısının yapılabildiğı ortaya çıkarılmıştır.

Xu vd (2012), Amerika Birleşik Devletleri ve Ohio'de domates yetiştiriciliğı yapılan bölgelerde %5 oranında domateslerde öz nekrozu hastalığına neden olan etmenlerin tanısını yapmak amacıyla biyokimyasal, patojenisite, yeast dextrose carbonate (YDC) ve *Pseudomonas* F (PF) agar besi ortamları, klasik PCR yöntemlerini kullanmışlardır. YDC ortamında gelişen koloniler morfolojik olarak benzer şekilde yuvarlak, mukoid, yeşilimsi merkezli, kırışık, sarımsı yeşil ortama pigment yayar. PF ortamında krem, sarı floresan olmayan koloniler gözlenmiştir. Tüm izolatlar Gram-negatif, levan oluşturmamış, oksidase pozitif ve pektolitik aktivite negatiftir. Üç izolatın arginin hidrolizi pozitifken altı izolatın negatif bulunmuştur. İzolatlar tüpünde hipersensitif reaksiyon (HR) göstermemiştir. Tüm izolatlar 37°C gelişme göstermiştir. Klasik PCR metodunda *Pseudomonas corrugata*'nın tanısında PC5/1-PC5/2 (Catara vd 2000) primerleri ile *P. mediterranea*'nın tanısında PC1/1-PC1/2 (Catara vd 2002) primerleri kullanılmıştır. Pozitif kontrol olarak Türkiye strainleriyle NCBI kültür koleksiyonundan strainler kullanılmıştır. Arginin hidrolizi negatif sonuç veren 6 izolat *P. mediterranea* primerleriyle pozitif sonuç vermiştir. Arginin hidrolizi pozitif sonuç veren 3 izolat *P. corrugata* primerleriyle pozitif sonuç vermiştir. Elde edilen fragmentler sekans analizi yapılmış ve SM664-12 referans strainiyle %99 homoloji

göstermiştir. Patojenisite testleri pozitif sonuç vermiştir yapılan re-izolasyon sonucu tekrar PCR yapılmış aynı sonuçlar elde edilmiştir. Bu çalışma bölgede her iki patojenin varlığına dair yapılan ilk kayıttır.

Trantas vd (2014), Yunanistan'dan yaklaşık yirmi yıldan fazla süredir öz nekrozu simptomsu gösteren domates ve biber bitkilerinden izole edilen patojenlerin biyokimyasal, patojenisite, serolojik ve moleküler yöntemlerle karakterizasyonunu yapmışlardır. Yapılan biyokimyasal, serolojik, patojenisite, DNA parmak izi, multi lokus sekans analizi sonuçlarına göre hem tür içerisinde hemde türler arasında farklılık saptanmıştır. *Pseudomonas corrugata* ve *P. mediterranea*'nın patojenisite testleri sonucunda bitkilerde benzer belirtilere neden olduğu ve belirtilerden patojenlerin ayırt edilemeyeceği belirtilmiştir. Çalışmada gerçekleştirilen tanılamalar neticesinde *Pseudomonas corrugata* ve *P. mediterranea* türlerinin baskın olduğu belirlenmiştir. Bu çalışma *P. mediterranea*'nın bölgede biberlerde hastalık oluşturduğuna dair ilk kayıttır.

## 2.7. *Pseudomonas viridiflava* İle İlgili Kuramsal Bilgiler

*Pseudomonas viridiflava* bakteriyel etmeni ilk olarak Burkholder tarafından 1930 yılında İsviçre'de fasülye ve bakla bitkilerinden izole edilmiş ve *Phytomonas viridiflava* olarak adlandırılmıştır (Palleroni 2005). Daha sonra Dowson (1939) tarafından *Pseudomonas viridiflava* olarak adlandırılmıştır (Billing 1970).

*Pseudomonas viridiflava* etmeni ticari olarak önemli olan bitkilerin kök, gövde, yaprak, tomurcuk ve çiçeklerinde hastalık meydana getirmektedir (Alippi ve Wolcan 2000, Caruso ve Catara 1996, Conn vd 1993, Engelhard ve Jones 1990, Gitaitis vd 1991, Goumans ve Chatzaki 1998, Leath vd 1989, Lukezic vd 1983-a, Lukezic vd 1983-b, Wilkie vd 1973, Billing 1970, Hunter ve Cigna 1981, Young vd 1988, Little ve Gilberton 1994, Scortichini ve Morone 1997).

Çizelge 2.8. *Pseudomonas viridiflava*'nın bilimsel sınıflandırılması

<b>Alem</b>	Bacteria
<b>Bölüm</b>	Proteobacteria
<b>Sınıf</b>	Gamma Proteobacteria
<b>Takım</b>	Pseudomonadales
<b>Familya</b>	Pseudomonadaceae
<b>Cins</b>	<i>Pseudomonas</i>
<b>Tür</b>	<i>Pseudomonas viridiflava</i> Burkholder 1930, Dowson 1939

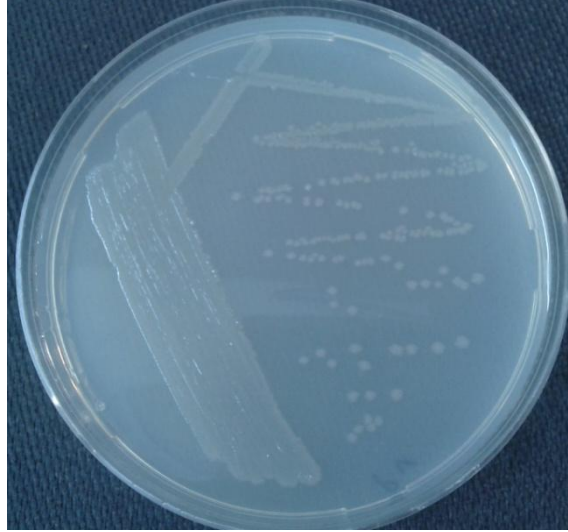
*Pseudomonas viridiflava* bakteriyel etmeni bir çok bitki türünde hastalık meydana getirmektedir. *P. viridiflava* alfalfa (*Medicago sativa*) (Heydari vd 2014), fasülye (*Phaseolus vulgaris*) (Gonzalez vd 2003), gazelboynuzu (*Lotus corniculatus*), lahana (*Brassica oleracea* var. *capitata*), karnabahar (*B. oleracea* var. *botrytis*), kiwi (*Actinidia chinensis*) (Gonzalez vd 2003), dere otu (*Anethum graveolens*), üzüm (*Vitis vinifera*), marul (*Lactuca sativa*) (Gonza'lez vd 2003), acı bakla (*Lupinus angustifolius*), yabancı havuç (*Pastinaca sativa*) (Godfrey ve Marshall 2002), maruçya (*Passiflora edulis*), bezelye (*Pisum sativum*) (Martin-Sanz vd 2010, Ertan ve Benlioğlu 2012), biber (*Capsicum annuum*, *Capsicum frutescens*), Atatürk çiçeği (*Euphorbia*

*pulcherrima*), haşhaş (*Papaver somniferum*), balkabağı (*Cucurbita maxima*), kanola (*B. napus* var. *napus*), (*Arabidopsis thaliana*), domates (*Solanum lycopersicum*) (Clara 1934, Wielke 1973, Fiori vd 1984, Alivizatos 1986, Kuwata ve Oikawa 1989, Colin 1996, Goumans ve Chatzaki 1998, Bogetzevska vd 1998, Aysan ve Yıldız 2000, Üstün ve Saygılı 2001, Yıldız ve Aysan 2002), patlıcan (Goumans ve Chatzaki 1998), soya (*Glycine max*) (Gonzalez vd 2012), blite (Goumans ve Chatzaki 1998), kirli hanım çiçeği (*Zinnia elegans*), tatlı soğan (*Allium cepa*) (Gitaitis vd 1991, Perez vd 2004), krizantem (*Chrysanthemum* spp.) (Goumans ve Chatzaki 1998) ve hasat sonrasında yam (*Calocasia esculenta*), tatlı patates (*Ipomoea batatas*), bal kabağı (*Cucurbita maxima*), chayote (*Sechium edule*), havuç (*Pastinaca sativa*) (Godfrey ve Marshall 2002, Macagnan vd 2007, Almeida vd 2013), Çin bektaşı üzümü (*Actinidia chinensis*), galce soğanı (*Allium fistulosum*), sarımsak (*Allium sativum*), kereviz (*Apium graveolens*, *Apium graveolens* var. *dulce*), Brüksel lahanası (*Brassica oleracea* var. *gemmifera*), Pot kadife çiçeği (*Calendula officinalis*), aspir (*Carthamus tinctorius*), hindiba (*Cichorium hindiba*), karpuz (*Citrullus lanatus*), turunç, kişniş (*Coriandrum sativum*), kavun (*Cucumis melo*) (Goumans ve Chatzaki 1998, Aysan 2003), salatalık (*Cucumis sativus*) (Liu vd 2010), bal kabağı (*Cucurbita maxima*), siklamen (*Siklamen persicum*), enginar (*Cynara* var. *cardunculus. scolymus*), Kaliforniya haşhaş (*Eschscholzia Californica*), soya (*Glycine max*), sümbül fasulyesi (*Lablab purpureus*), kuş ayak yonca (*Lotus corniculatus*), elma (*Malus domestica*) (Alimi vd 2011), balmumu ebegümeçi (*Malvaviscus arboreus*), yonca (*Medicago sativa*), yabani tütün (*Nicotiana rustica*), basil (*Ocimum basilicum*), haşhaş (*Papaver*), İzlanda haşhaş (*Papaver nudicaule*), çarkıfelek (*Passiflora edulis*), kavzakökü (*Pastinaca sativa*), maydanoz (*Petroselinum crispum*), fasulye (*Phaseolus vulgaris*), kayısı (*Prunus armeniaca*), Kiraz (*Prunus avium*), armut (*Pyrus communis*), Bahçe crowfoot (*Ranunculus asiaticus*), turp (*Raphanus sativus*), gül (*Rosae* spp.), sorgum (*Sorghum bicolor*), Sudan çimi (*Sorghum sudanense*), piretrum (*Tanacetum coccineum*), mor yonca (*Pratense*), yaban mersini (*Vaccinium corymbosium*), börülce (*Vigna unguiculata*), menekşe (*Viola*), Üzüm (*Vitis vinifera*), mısır (*Zea mays*) ve yabancı otlardan eşek hıyarı (*Ecballium elaterium*) (Billing 1970, Young vd 1988, Goumans ve Chatzaki 1998) bitkilerinde hastalık yapmaktadır (Almeida vd 2013, Anonim 2014-e).

*Pseudomonas viridiflava* etmeninin Yeni Zelanda'da domateslerde gövde nekrozuna neden olduğu tespit edilmiştir (Wilkie vd 1973). Daha sonraki çalışmalarda *P. viridiflava*'nın A.B.D (Lukezic vd 1983-a, Lukezic vd 1983-b), İtalya (Fiori vd 1984), Yunanistan (Alivizatos 1986), Japonya (Kuwata ve Oikawa 1989), Fas (Colin 1996), Bulgaristan (Bogetzevska vd 1998) ve ülkemizde (Aysan ve Yıldız 2000) domateslerde öz nekrozu hastalığına neden olduğu rapor edilmiştir. Ülkemizde domateslerde gövde nekrozuna neden olan etmenler araştırıldığında *Pseudomonas viridiflava* etmeninin neden olduğu Doğu Akdeniz bölgesinde Aysan ve Yıldız (2000), Ege bölgesinde Üstün ve Saygılı (2001) tarafından bildirilmiştir. Doğu Akdeniz bölgesinde domateslerde gövde nekrozuna neden olan *Pseudomonas* türlerinin %12'si *Pseudomonas viridiflava* olarak tanılanmıştır (Aysan ve Çınar 2001, Yıldız ve Aysan 2002).

*Pseudomonas viridiflava* Gram-negatif, çubuk şekilli, peritrik kamçılı, aerobik, genom büyüklüğü  $5.99 \times 10^9$  baz çifti, DNA'sının G-C içeriği %59,3 (Baltrus vd 2014), toprak kökenli, King's B (King vd 1954) ortamında floresan pigment üretir, NSA besi

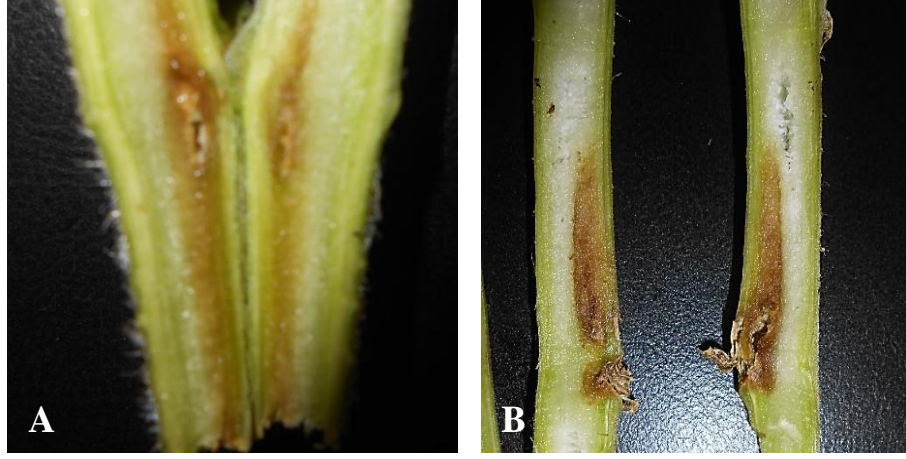
yerinde 4,5 mm çapında hafif kalkık yuvarlak koloniler oluşturur, sarımtırak mukoid koloniler oluşturur (Alvizatos 1986), jelatin hidrolizi pozitif, oksidaz negatif, sükröz kullanımı negatif, D(-)-tartarate kullanımı pozitif, eskulin reaksiyonu pozitif, 16S rRNA analizine göre *Pseudomonas syringae* patojeninden ayrılan ve hastalık meydana getirdiği konukçu aralığının geniş olmasıyla önem kazanan bir bakteridir (Palleroni 2005).



Şekil 2.15. Nutrient Agar besi ortamında *Pseudomonas viridiflava*'nın koloni gelişimi (Bu çalışmadan)

Toprak kökenli olup yara paraziti adıyla da anılan *Pseudomonas viridiflava* etmeni çalışmalar sonucunda eşek hıyarı (*Ecballium elaterium*) yabancı otunun da konukçusu olduğu ve bu bitkinin hastalık epidemiyolojisinde etkili olduğu saptanmıştır. Diğer yandan etmenin epifitik olarak hayatta kalabildiği rapor edilmiştir (Billing 1970, Young vd 1988, Goumans ve Chatzaki 1998).

Gövde nekrozuna neden olan etmenlerin oluşturduğu hastalık belirtileri genelde benzer olmasına rağmen dış belirtilerde bazı farklılıklar olduğu Üstün ve Saygılı (2001) tarafından bildirilmiştir. Domateste ciddi kayıplara neden olan gövde nekrozu etmenlerinden *Pseudomonas viridiflava*, alt yapraklarda solgunluk, yaprak sapında sararma, gövdede budama yerlerinde kahverengi-siyah lekeler, öz kısmında kahve rengi nekroz ve boşalmaya, bitki iletim demetlerinde meydana getirdiği stres koşullarına bağlı olarak gövde üzerinde siğil benzeri yan kök oluşumuna, ilerleyen aşamada bitkinin ölümüne neden olmaktadır. Goumans ve Moudofaris (1996) ile Goumans vd. (1999) *Pseudomonas viridiflava*'nın domates meyvelerinde yüzeysel, yuvarlak, 1,5-2 cm çapında gümüş renkli lekeler meydana getirdiğini tespit etmişlerdir.



Şekil 2.16. *Pseudomonas viridiflava*'nın neden olduğu domates bakteriyel öz nekrozu hastalığının domates bitkilerinin öz kısmındaki belirtisi (Bu çalışmadan)

*Pseudomonas viridiflava* etmeninin hasat sonrasında da hastalık meydana getirdiği rapor edilmiştir (Almeida vd 2013). Etmenin kültür ve yabancı bitkilerin yapraklarında herhangi bir semptom oluşturmadan yüksek miktarda kolonize olduğu tespit edilmiştir (Gitaitis vd 1992, Gitaitis vd 1998, Goumans ve Chatzaki 1998, Mariano ve McCarter 1993, Billing 1970, Burkholder 1930, Wilkie vd 1973). *P. viridiflava* ilk çalışmalarda zayıf parazit veya sekonder patojen olarak kabul edilmiş daha sonra primer bitki patojeni olduğu vurgulanarak bir çok konukçusu tespit edilmiştir (Wilkie vd 1973). Daha sonraki çalışmalarda etmenin bitkide stres yaratan koşullarda hastalık yapan bir fırsatçı olduğu saptanmıştır (Alippi ve Wolcan 2000, Gitaitis vd 1998, Goumans ve Chatzaki 1998, McCarter vd 1985, Young vd 1988, Lukezic vd 1983-a, Lukezic vd 1983-b, Jones vd 1984, Little ve Gilberton 1994, Basım ve Yılmaz 2005).

Lindow (1983), 6 farklı *Pseudomonas viridiflava* izolatını kullanarak yaptığı çalışmada buz çekirdek oluşum aktivitesinin bitkinin yaralanmasına neden olarak *P. viridiflava* etmeninin enfeksiyon yapmasına katkı sağladığını tespit etmiştir.

Yıldız ve Aysan (2002), domateslerde önemli hastalıklardan biri olan öz nekrozu hastalığını meydana getiren etmenlerden *Pseudomonas viridiflava*'ya karşı antogonistik etki gösteren mikroorganizmaların tespiti üzerine çalışma yapmışlardır. Çalışmalarında da domates bitki rizosferinden izole edilen patojen olmayan 18 bakteri ve 3 maya olmak üzere toplam 21 mikroorganizmanın *Pseudomonas viridiflava*'nın gelişimine antogonistik etkileri; *in vitro* petri denemeleri ve patojenin pektolitik aktivitesi üzerine olan etkileri patates dilimlerinde yarı *in vivo* denemelerle araştırmışlardır. *In vitro* çalışmalarda bir bakteri ve bir maya izolatı patojenin gelişimini engellemede başarılı olurken, yarı *in vivo* denemelerde altı adet bakteri ve bir maya olmak üzere toplam 7 antagonist izolatın patates dilimlerinde patojenin pektolitik enzim üretimini %100 oranında engellediğini saptamışlardır.

Jakob vd (2002), yaptıkları çalışmada farklı *Pseudomonas viridiflava* izolatlarıyla *Arabidopsis thaliana* bitkisinin interaksyonu sonucunda dayanıklılık ve toleransında varyasyonlar gözlemlemiştir. Bu farklılığın gen için gen teorisiyle

bağlantılı olduğunu, konukçu patojen ilişkilerini belirlediğini moleküler çalışmalarla tespit etmişlerdir. Bu çalışmaların gelecek dayanıklılık çalışmalarına kaynak oluşturmasını hedeflemişlerdir. Çalışmalarında etmenlerin bakteriyel gelişim eğrilerini çizmişler, LOPAT testleri ve moleküler çalışmalar yapmışlardır.

Gonzalez vd (2003), yaptıkları çalışmada fasülye (*Phaseolus vulgaris*), kivi (*Actinidia deliciosa*) ve marullarda (*Lactuca sativa*) ciddi kayıplara neden olan hastalığın tespiti amacıyla LOPAT testlerini ve moleküler yöntemlerden RFLP ve RAPD PCR yöntemini kullanmışlardır. Çalışmada *SacI* and *HinfI* restriksiyon enzimlerini, ve random primer S (TCACGATGCA) kullanmışlardır. Çalışma sonucunda hastalığı meydana getiren etmenin *Pseudomonas viridiflava* olduğunu rapor etmişlerdir.

Aysan vd (2003), yaptıkları çalışmada Adana bölgesinde yetiştirilen kavunların %10'unun da ciddi zararlara neden olan ve başlangıçta kotiledon yapraklarında küçük kahverengi düzensiz lekeler şeklinde simptom gösteren, sonunda bitkinin ölümüne kadar giden hastalığın *Pseudomonas viridiflava* bakteriyel etmeni tarafından oluştuğunu tespit etmişlerdir.

Yıldız vd (2004), domateslerde öz nekrozu hastalığına neden olan *Pseudomonas viridiflava* etmeninin primer inokulum kaynaklarının belirlenmesi üzerine yaptıkları çalışmada LOPAT, ELISA ve MIDI yöntemlerini kullanmışlar ve çalışmada *Pseudomonas viridiflava* patojeninin Akdeniz Bölgesi iklim koşulları altında bitki kalıntılarında, toprakta ve domates tohumlarında uzun süre yaşamını devam ettirebildiği ve hastalık meydana getirmede etkili olduğunu rapor etmişlerdir (Devash ve Okon 1980, Fatmi ve Schaad 2002). Etmenin sodium hipoklorit muamele edilmiş tohumda bulunmamış sonuçta hastalığı tohumun yüzeyinde bulunan epifitik populasyon tarafından meydana getirildiği tespit edilmiştir (Gitaitis vd 1998). Ayrıca etmenin çevre koşullarına karşı duyarlı olduğu en iyi düşük sıcaklık yüksek nem koşullarında (Mariano ve McCarter 1993, Jones vd 1984), Kasım ile Nisan ayı arasında çok hızlı enfeksiyon meydana getirdiklerini, yüksek sıcaklık, düşük nemin ise patojenin populasyon yoğunluğunu ciddi miktarda düşürdüğünü tespit etmişlerdir. (Devash ve Okon 1980, Fatmi ve Schaad 2002). Çalışma sonucunda yetiştirilecek ortam, bitki kalıntılarının temizliği ve temiz üretim materyali hastalıkla mücadelede etkin rol oynadığı kanıtlanmıştır.

Aysan vd (2004), domateslerde öz nekrozuna neden olan *P. viridiflava* etmeninin tespiti amacıyla LOPAT ve ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) yöntemini kullanarak etmene spesifik poliklonal antibody geliştirmişlerdir. Çalışma sonucunda geliştirilen poliklonal antibody diğer öz nekrozu patojenlerine karşıda test edilmiş ve *P.viridiflava* etmenine spesifik olduğunu bildirmiştir.

Marques vd (2008), yaptıkları çalışmada *Pseudomonas syringae* - *P. viridiflava* gruplarının içinde bulunduğu 120 bakteriyel türün tespitini Box-PCR metoduyla tespit etmişlerdir. Box-PCR sonucu yapılan bakteriyel türlerin karşılaştırılması sonucunda (cluster analys) türler arasında %72 oranında farklılık ortaya çıkmıştır.

Liu vd (2010), salatalık (*Cucumis sativus*) fidelerinde ciddi kayıplar veren yuvarlak beyaz haleyle çevrili leke şeklinde simptom gösteren hastalığın tespiti amacıyla morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve daha kısa sürede kesin sonuç vermesinden dolayı moleküler yöntemlerden PCR metodunu kullanmışlardır. Çalışma sonucunda sekans analizi yapılmış ve Genbank'tan homolojisine bakılmış ve hastalığı meydana getiren etmenin *Pseudomonas viridiflava* olduğunu tespit etmişlerdir.

Alimi vd (2011), elmaların çiçek ve yapraklarında yanıklık şeklinde simptom gösteren hastalığın tespitini yapmak amacıyla serolojik, biyokimyasal, patojenisite testleri ve moleküler yöntemleri kullanmışlardır. Yaptıkları çalışmada *Pseudomonas viridiflava* etmenine ait olan 16S rRNA bölgesindeki 180 bp'lık bölgeyi spesifik olarak çoğaltan PsV-F ve PsV-R primerlerini kullanmışlardır. PCR işlemi sonucunda elde edilen ürünün sekans analizi yapılmış ve sonuç Gen Bank'tan Blast yapılarak karşılaştırılmıştır. Dizi Blast sonucunda *Pseudomonas viridiflava* ile %97 homoloji göstermiştir. Bu çalışma *Pseudomonas viridiflava*'nın elmalarda yanıklığa sebep olduğuna dair ilk kayıttır. Ayrıca etmenin salgın meydana getirmesi uygun çevre koşullarıyla yakından ilişkili olduğu ve etmenin en iyi ilk baharda yağışları takiben ılık ve nemli koşullarda yaygın olarak görüldüğünü rapor etmişlerdir.

Gonzalez vd (2011), yaptıkları çalışmada *P.viridiflava* bakteriyel etmeninin *Arabidopsis thaliana* bitkisine inokulasyonu sonucunda bitki tarafından spermin birikiminin arttığını ve oksidasyon sonucunda bitki dayanıklılık gösterdiğini tespit etmişlerdir. Spermin birikimi *spms* geni tarafından kontrol edilmektedir. Spermine bağlı dayanıklılık mekanizmasının tam olarak açığa çıkarılması bitki koruma açısından dayanıklılık çalışmalarına kaynak oluşturmasında önem taşımaktadır.

Gonzalez vd (2012), soya fasülyesinde yaygın olarak görülen ve bitkinin meyve ve yapraklarında koyu kırmızı lekeler şeklinde simptom gösteren bakteriyel hastalığın yaptıkları biyokimyasal ve moleküler çalışmalar sonucunda *Pseudomonas viridiflava* etmeninden kaynaklandığını tespit etmişlerdir.

Heydari vd (2012), yapılan çalışmada alfafa (*Medicago sativa*) bitkilerinde ciddi kayıplar veren; bitki genelinde solma, kloroz, cüceleşme, yapraklarda sararma ve şekil bozukluklarının yanında, köklerde çürüme ve renk değişikliği şeklinde simptom gösteren hastalığın tespiti amacıyla serolojik, biyokimyasal, patojenisite testleri ve moleküler yöntemleri kullanmışlardır. İran'ın farklı bölgelerinden hastalıklı bitkilerden izole edilen strainlere 3 farklı primer seti (PVF/PVR, 7F/7R, 20F/20R) kullanarak yaptıkları PCR çalışmaları sonucunda etmenin *Pseudomonas viridiflava* olduğunu tespit etmişlerdir.

Lefort vd (2013), model bitki olan *Arabidopsis thaliana* bitkisinde patojenik olan *Pseudomonas viridiflava* UASWS38 strainin genomunu sekanslamışlardır. Çalışmanın mikroorganizma bitki interaksyonunun genetik olarak anlaşılmasına kaynak oluşturması amaçlanmıştır. Çalışma sonucunda *Pseudomonas viridiflava*'nın 5,910,810 bp'lık genomu dizisi elde edilmiştir.

Selvam vd (2013), *Pseudomonas viridiflava* etmeninin günümüzde bitki koruma amacıyla sıklıkla kullanılan ve çevre kirliliğine neden olan pestisitlerden Pyrethroid



grubu Fenvalerate pestisidinin biodegradasyonunda etkili olduğunu HPLC analizleriyle tespit etmişlerdir.

Heydari vd (2014), yaptıkları çalışmada İran'da yonca (*Medicago sativa*) yetiştiriciliği yapılan alanlarda ciddi kayıplara neden olan 97 *Pseudomonas viridiflava* izolatının patojenisite ve genetik çeşitliliğini araştırmışlardır. Çalışmalarında biyokimyasal, patojenisite, klasik PCR ve RAPD-PCR metotlarını kullanmışlardır. Çalışma sonucunda *Pseudomonas viridiflava* izolatları arasında patojenisite ve genetik açıdan varyasyonların olduğunu rapor etmişlerdir.

Son yıllarda nükleik asit temelli moleküler yöntemler diğer yöntemlere nazaran oldukça hızlı ve güvenilir olmasından dolayı önem kazanmaktadır. Dizisi bilinen bir DNA bölgesinin *in vitro* olarak çoğaltılmasını sağlayan ve DNA molekülünün kopyasını kısa zamanda çok miktarda çoğaltılmasına olanak sağlayan bir tekniktir (Saiki vd 1985). Bu teknoloji sayesinde hedef DNA dizisini çoğaltarak, bir patojenin tespiti çok daha kısa sürelerde ve kesin olarak yapılabilmektedir. Son yıllarda PCR reaksiyonlarında sıcaklık döngüleri sağlamak için kullanılan cihazların hassas ölçüm aletleriyle birleştirilmesi, Real-Time PCR olarak adlandırılan yeni bir yöntemin gelişmesini sağlamıştır. Real-Time PCR'da oluşan ürünlerin analizi, reaksiyon esnasında eş zamanlı izlenip değerlendirilebilmektedir. Bu gelişim sayesinde artık gen kopya ürünlerinin düzeylerini sayısal değerlere dönüştürerek ölçmek, eş zamanlı olarak reaksiyonun gidişine müdahale edebilmek ve PCR döngülerinin sayısı ile oynayabilmek de mümkündür (Huletsky vd 2004, Qin vd 2003). Bu yeni sistemde, agaroz jel elektroforezi, DNA bantlarının zararlı bir kimyasal olan Ethidium Bromide ile boyanmasına ve mor ötesi ışık altında görüntülenmesi gibi işlemlerin uygulanmasına gerek kalmamaktadır. Bu da yöntemin hızlı, güvenilir ve kolay uygulanmasına olanak sağlamaktadır. Real-Time PCR yönteminin avantajları tanı ve tespitin hızlı, güvenilir ve hassas bir şekilde gerçekleştirilebilmesinin yanında direkt hastalıklı bitki dokularından tespit yapılabilmesi ve patojenlerin kantitatif olarak tespit edebilmesi gibi avantajları da bu nükleik asit temelli moleküler yöntemin son yıllarda kullanımının yaygınlaşmasına katkı sağlamaktadır.

Real-Time PCR ürünlerinin kalitatif ve kantitatif analizlerinde, diziye özgün olmayan floresan boyalardan ya da diziye özgün problemlerden yararlanılmaktadır. 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 problemlerinden uzunluk olarak daha kısadır. Bu sayede prob dizisinin kendi içinde bağlanması olasılığını ortadan kaldırmakta ve amplifikasyon işleminin daha kısa sürede gerçekleşmesine imkan sağlamaktadır. LNA (Locked Nucleic Acid) probun kimyasal yapısı Real-Time PCR yönteminin daha spesifik olarak çalışılmasını ve alınan sonuçların daha hızlı ve güvenilir olmasını sağlamaktadır (Anonim 2014-b).



Schaad ve Frederick (2002), Amerika'nın Güney Bölgesinde ve Kaliforniya'da önemli derece ürün kayıplarına sebep olan *Xylella fastidiosa* patojeninin bitki dokusundan tespitini Real-Time PCR yöntemini kullanarak, bu yöntemin bitki patojenlerinin tanısında ve tespitinde kullanılabileceği bildirmiştir. Schaad ve Frederick (2002), diğer yöntemlere göre daha güvenilir, hassas ve patojene spesifik sonuç veren Real-Time PCR yönteminin fitopatojen bakteriyel, fungal ve viral etmenlerin tanısında kullanılabileceğini 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).

Li vd (2004), transgenik buğdaylarda, transfer edilen genin tespitinde kısa süre sayısal sonuçlar veren Kantitatif Real-Time PCR yöntemi geliştirilmiştir. Çalışmada kantitatif sonuçların elde edilmesinde housekeeping gen (referans alınan gen) olarak puroindoline-b kullanılmıştır. Çok sayıda örnekle çalışabilen bu yöntem sayesinde kısa sürede güvenilir sonuçlar alınmıştır.

Atallah ve Stevenson (2006), patates yumrularında patojen olan fungal hastalık etmenlerinden *Phytophthora infestans*, *Pythium ultimum*, *Phytophthora erythroseptica*, *Fusarium sambucinum* ve bakteriyel hastalık etmenlerinden *Erwinia carotovora*'nın tanısı için Real-Time PCR yöntemini geliştirmişlerdir. Patojenisitelerinden sorumlu özel gen bölgelerinden dizayn edilen primerler ve SYBR Green I kullanılarak tanı çalışmaları yapılmıştır. Çalışmada patates yumrularında patojenlerin tespitinde yöntemin kullanılabilirliğini göstermek hedeflenmiştir.

Berg vd (2006), lahanagillerde ciddi kayıplara neden olan *Xanthomonas campestris* bakteriyel patojenin tanısı ve tespitinin kısa sürede yapılması amacıyla multipleks Real-Time PCR yöntemini geliştirmişlerdir. Çalışmada *Xanthomonas campestris*'in *hrpF* genine *Brassica* spp.'deki 18S–25S Internal Transcribed Spacer (ITS) bölgesine göre primer ve prob setleri dizayn edilmiştir. *Xanthomonas campestris*'te DLH151 ve DLH152 primerleri 77 bp kısmı, DLH153 ve DHL154 primerleri ise hedef bölgede 78 bp'lik kısmı çoğaltmaktadır. Prob olarakda P7 (FAM-boya olarak BHQ1) kullanılmıştır. *Brassica* spp. için hedef 100 bp'lik kısmı çoğaltmada DLH155 ve DLH156 primerleri ve P8 probu (JOE-boya olarak BHQ1) kullanılmıştır.

Basım ve Basım (2007), fide döneminde ciddi kayıplara neden olan tohum kökenli domates bakteriyel benek hastalık etmeni *Pseudomonas tomato* (*syringae*) pv. *tomato*'nun tespit ve tanısını yapmak amacıyla patojene spesifik primerler ve prob geliştirmişlerdir. Geliştirilen primer ve prob setiyle direkt bakteriyel hücreden, tohumdan ve hastalıklı bitki dokularından patojenin tanısı ve tespitinin Real-Time PCR ve Real-Time Bio PCR yöntemleriyle kısa sürede ve hassas bir şekilde yapılabileceği ortaya çıkarılmıştır.

Hren vd (2007), Real-Time PCR yöntemini kullanarak asmalarda bulunan fitoplazmalardan *Flavescence doree* ve *Flavescence bois*'in TaqMan prob ve spesifik primer setlerini kullanarak Real-Time PCR'da tanısını yapmışlardır. Fitoplazmaların tanısında ve tespitinde yöntemin hassas ve hızlı olduğunu bildirmişlerdir.

Dreo vd (2007), bağlarda Bakteriyel Yanıklık Hastalık etmeni *Xylophilus ampelinus*'un tanısı için MGB-pobun kullanıldığı Real-Time PCR yöntemini geliştirmişlerdir. Hazırlanan bakteriyel süspansiyon *X. ampelinus* için dizayn edilen primerler ve probe kullanılarak Real-Time PCR yöntemiyle test edilmiştir. Primerler ve probun patojene spesifikliğı belirlendikten sonra hassasiyet çalışması yapılmıştır. *X. ampelinus* patojenine ait hazırlanan stok solüsyondan  $10^{-1}$ 'den  $10^{-8}$ 'e kadar seyreltmeler hazırlanmış, Nested PCR ve Real-Time PCR' da test edilmiştir. Hassasiyet çalışması ile Real-Time PCR yönteminin Nested PCR'a benzer hassasiyette çalıştığı belirlenmiştir. Fakat bitki materyallerinden tespitite yapılan çalışmada ise enfekteli kök, gövde ve yaprak kısımlarından hazırlanan solüsyonların tüm seyreltmelerinde Real-Time PCR ile *X. ampelinus*'un tespiti yapılırken, Nested PCR yönteminde bazı seyreltmeler çalışmamıştır. Çalışma sonucunda Real-Time PCR'ın patojenin tanısında ve bitki materyalinden tespitinde daha hassas ve güvenilir bir yöntem olduğu rapor edilmiştir.

Luo vd (2008), *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in tohumdan tespiti amacıyla canlı ve ölü bakterilerin, DNA'ya bağlanan ethidium monoazide (EMA) ve TaqMan prob kullanarak ayırımına dayalı Real-Time PCR yöntemi geliştirmişlerdir.

Basım ve Basım (2009), Asma'da ciddi kayıplara neden olan Pierce's Hastalık etmeni *Xylella fastidiosa* için geliştirdikleri EBXY1-EBXY2 primer çifti ve TaqMan probu kullanarak Real-Time PCR yöntemi ile oldukça kısa sürede direkt bakteriyel hücreden ve hastalıklı asma dokusundan patojenin tanısını ve tespitini yapmışlardır.

Basım ve Çaplık (2009), domates bakteriyel kanser hastalık etmeni *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* ve domates bakteriyel yaprak lekesi hastalık etmeni *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*'nın tanısı ve tespiti için *Cmm*'ye ait *pat-1* gen dizisi ve *Xav*'ye ait *hrp* gen dizisini kullanarak hassas ve seçici bir Real-Time PCR yöntemi geliştirilmiştir. Geliştirilen primer ve problemlerin spesifikliğı farklı bitki patojeni bakteriler kullanılarak test edilmiştir.

Basım ve Öztürk (2011), yapılan çalışmada, fasulye yetiştiriciliğinde sorun yaratan Bakteriyel Hale Yanıklık Hastalık etmeni *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, Bakteriyel Yaprak Yanıklık Hastalık etmeni *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. Farklı bitki patojeni bakteriler kullanılarak geliştirilen primer ve problemlerin spesifikliğı test edilmiştir. Geliştirilen Real-Time PCR yöntemi ile patojenlerin bakteriyel hücreden, tohumdan ve hastalıklı bitki materyallerinden hızlı ve hassas bir şekilde tespitinin ve tanısının yapılabildiğı ortaya çıkarılmıştır.

Basım ve Bozan (2011), yapılan çalışmada, yumuşak çekirdekli meyve ağaçlarında önemli kayıplara neden olan Ateş Yanıklığı Hastalık etmeni *Erwinia amylovora*'nın tespiti ve tanısını yapmak amacıyla Real-Time PCR yöntemini kullanmışlardır. Bakteriyel patojen, *Erwinia amylovora*'nın Real-Time PCR yöntemiyle tanısı için, patojenik bakterinin polisakkarit üretiminden sorumlu ve kromozomal *ams* gen'inin 1,6 kb'lik internal diziliminden LNA prob ve primerler dizayn etmişlerdir.

Geliştirilen prob ve primerler ile *Erwinia amylovora* genomundan, planlandığı gibi 63 bp'lik PCR ürünü çoğaltılmıştır. Prob ve primerlerin spesifikliğini belirlenmesi amacıyla farklı *Erwinia amylovora* strainleri ve farklı türlere ait bakteriyel izolatlar test edilmiştir. Ayrıca yapılan çalışma *Erwinia amylovora*'nın 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 populasyonlarının değişimlerinin tespit edilmesine olanak sağlamıştır.

Wang vd (2014), turunçgillerde ciddi kayıplara sebep olan stubborn hastalık etmeni *Spiroplasma citri*'nin kısa sürede tanı ve tespitini yapmak amacıyla Real-Time PCR yöntemini kullanmışlardır. Real-Time PCR yönteminde çalışmalarında geliştirdikleri *Spiroplasma citri*'nin prophage gen bölgesinden Php-orf1 ve Php-orf3 primerleri ile SYBR-green kullanmışlardır.

Gallelli vd (2014), kivi (*Actinidia deliciosa* ve *A. chinensis*) yetiştiriciliğinde Dünya genelinde pandemik olarak ciddi kayıplara sebep olan *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* tespiti ve tanısını yapmak amacıyla Real-Time PCR yöntemini kullanmışlardır. Bakteriyel patojen, *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*'nin Real-Time PCR yöntemiyle tanısı için, *hrpW* gen bölgesindeki 593 bp'lik internal diziliminden primerler dizayn etmişlerdir. Geliştirilen P3F/P5R1 primerleri 147 bp, P3F/P6R primerleri 158 bp'lik ampikon vermektedir. Prob ve primerlerin spesifikliğini belirlenmesi amacıyla farklı *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* strainleri ve farklı türlere ait bakteriyel izolatlar test edilmiştir. Ayrıca yapılan çalışmada, Kantitatif Real-Time PCR ile *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*'nin kivi bitkisindeki populasyon değişimlerinin tespit edilmesine olanak sağlamıştır.

### 3. MATERYAL ve METOT

#### 3.1. Çalışmada Kullanılan Bakteriyel Strainler

Bu çalışma kapsamında Akdeniz Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Fitopatoloji Anabilim Dalı, Bakteriyoloji Laboratuvarı'nda Prof. Dr. Hüseyin BASIM tarafından oluşturulmuş kültür stoklarında yer alan yerli ve yabancı *Dickeya chrysanthemi*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pseudomonas cichorii*, *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mediterranea* ve *Pseudomonas viridiflava* strainleri ve farklı cins ve türlere ait bitki patojeni bakteriler kullanılmıştır (Çizelge 3.1, Çizelge 3.2, Çizelge 3.3).

Çizelge 3.1. Real-Time PCR'da test edilen yerli *Dickeya chrysanthemi*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pseudomonas cichorii*, *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mediterranea* ve *Pseudomonas viridiflava* strainleri

İzolat	Bakteri Türü	Orijin	Referans
HBDC-1	<i>Dickeya chrysanthemi</i>	Türkiye	Basım 2003
HBDC-2	<i>Dickeya chrysanthemi</i>	Türkiye	Basım 2004
HBDC-3	<i>Dickeya chrysanthemi</i>	Türkiye	Basım 2005
HBDC-4	<i>Dickeya chrysanthemi</i>	Türkiye	Basım 2006
HBPC-1	<i>P. carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	Türkiye	Basım 2004
HBPC-2	<i>P. carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	Türkiye	Basım 2004
HBPC-3	<i>P. carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	Türkiye	Basım 2004
HBPC-4	<i>P. carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	Türkiye	Basım 2004
HBPCIC-1	<i>Pseudomonas cichorii</i>	Türkiye	Basım 2004
HBPCIC-2	<i>Pseudomonas cichorii</i>	Türkiye	Basım 2005
HBPCIC-3	<i>Pseudomonas cichorii</i>	Türkiye	Basım 2004
HBPCIC-4	<i>Pseudomonas cichorii</i>	Türkiye	Basım 2005
HBPC-1	<i>Pseudomonas corrugata</i>	Türkiye	Basım 2003
HBPC-2	<i>Pseudomonas corrugata</i>	Türkiye	Basım 2004
HBPF-1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Türkiye	Basım 2004
HBPF-2	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Türkiye	Basım 2005
HBPF-3	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Türkiye	Basım 2007
HBPM-1	<i>Pseudomonas mediterranea</i>	Türkiye	Basım 2003
HBPM-2	<i>Pseudomonas mediterranea</i>	Türkiye	Basım 2004
HBPV-1	<i>Pseudomonas viridiflava</i>	Türkiye	Basım 2003
HBPV-2	<i>Pseudomonas viridiflava</i>	Türkiye	Basım 2004

Çizelge 3.2. Real-Time PCR’da test edilen yabancı *Dickeya chrysanthemi*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pseudomonas cichorii*, *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mediterranea* ve *Pseudomonas viridiflava* strainleri

İzolat	Bakteri Türü	Orijin	Referans
DSM-4610	<i>Dickeya chrysanthemi</i>	Almanya	Burkholder 2005
DSM-30168	<i>P. carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	Almanya	Hellmers 2003
DSM-50259	<i>Pseudomonas cichorii</i>	Almanya	Stolp 2000
CFBP-2431	<i>Pseudomonas corrugata</i>	Fransa	Slade 1972
BPIC-870	<i>Pseudomonas corrugata</i>	Yunanistan	Malik 2003
ICMP-5819	<i>Pseudomonas corrugata</i>	İngiltere	Slade 1972
11.1-1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Makedonya	Kovacevic 2007
9.1-6	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Makedonya	Kovacevic 2007
CFBP-5404	<i>Pseudomonas mediterranea</i>	Iles Canaries	Lopez 2000
CFBP-5447	<i>Pseudomonas mediterranea</i>	İtalya	Catara 1994
DSM-16733	<i>Pseudomonas mediterranea</i>	İtalya	Catara 2002
LMG-2352	<i>Pseudomonas viridiflava</i>	İtalya	Burkholder 1981
LMG-2353	<i>Pseudomonas viridiflava</i>	UK	Billing 1967
DSM-11124	<i>Pseudomonas viridiflava</i>	İsviçre	Burkholder 1980

Çizelge 3.3. Real-Time PCR’da kullanılan farklı bitki patojeni bakteriler

Bakteri Türü	Orijin	Konukçu	Referans
<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i>	Türkiye	Karpuz	Basım 2008
<i>Bacillus subtilis</i>	Türkiye	Toprak	Basım 2008
<i>C. michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	Türkiye	Domates	Basım 2008
<i>Erwinia amylovora</i>	Türkiye	Armut	Basım 2011
<i>P. savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>	Türkiye	Zeytin	Basım 2000
<i>Pseudomonas tomato</i> pv. <i>tomato</i>	Türkiye	Domates	Basım 2003
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	Türkiye	Biber	Basım 2009
<i>Rhizobium vitis</i>	Türkiye	Asma	Argun 2001
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>	Türkiye	Fasülye	Güven 1994
<i>Xylella fastidiosa</i>	Türkiye	Asma	Basım 2009
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	Türkiye	Turunçgil	Basım 2008
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	Türkiye	Lahanagiller	Basım 2009

### 3.2. Primerler ve Problemlerin Tasarlanması

Öz nekrozu patojenlerinin Real-Time PCR yöntemiyle tanısı için *Dickeya chrysanthemi* *hrp/hrc* gen, *Pseudomonas cichorii* *hrcRST* gen, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* *pel* gen (pectate lyase gene), *Pseudomonas corrugata* RAPD PCR fragmentlerinin sekans analiz diziliminden, *Pseudomonas fluorescens* 16S-23S rRNA, *Pseudomonas mediterranea* RAPD PCR fragmentlerinin sekans analiz diziliminden ve *Pseudomonas viridiflava* 16S rRNA bölgelerine ait dizilerden prob ve primerler tasarlanmıştır.

Yerli ve yabancı *Dickeya chrysanthemi* strainleri; LF, LR (Li vd 2011), *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* strainleri; EXPCCR, EXPCCF ve nested PCR primerleri; INPCCR, INPCCF (Kang vd 2003), *Pseudomonas cichorii* strainleri; *hrp1a*, *hrp2a* (Cottyn vd 2011), *Pseudomonas corrugata* strainleri; PC5/1 ve PC5/2 (Catara vd 2000), *Pseudomonas fluorescens* strainleri; ITSIF, ITS2R (Rameshkumar vd 2002), *Pseudomonas mediterranea* strainleri; PC1/1 ve PC1/2 (Catara vd 2002), *Pseudomonas viridiflava* strainleri; PsV-F, PsV-R (Alimi vd 2011), primer setleri ile test edilmiştir (Çizelge 3.10). Tüm yerli ve yabancı *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* strainleri; EXPCCR, EXPCCF primerleri ile 550 bp'lik ve Nested PCR primerleri ile 400 bp'lik (Kang vd 2003), *Pseudomonas cichorii* strainleri; *hrp1a*, *hrp2a* 890 bp'lik (Cottyn vd 2011), *Pseudomonas corrugata* strainlerinin klasik PCR ile PC5/1 ve PC5/2 primerleri kullanılarak 1100 bp'lik, *Pseudomonas fluorescens* strainleri; ITSIF, ITS2R 560 bp'lik (Rameshkumar vd 2002), *Pseudomonas mediterranea* PC1/1 ve PC1/2 600 bp'lik (Catara vd 2002), *Pseudomonas viridiflava* strainleri; PsV-F, PsV-R 180 bp'lik (Alimi vd 2011), kısmı klasik PCR ile amplifiye edilmiştir (Çizelge 3.10, Şekil 4.1).

Öncelikle Klasik PCR yöntemi ile ilgili bölgeler amplifiye edilmiş, daha sonra amplifiye edilen bölgeler dizi analizi yapılarak dizi analizi sonuçları gen bankasında yer alan ilgili diziler ile bire bir örtüştüğü görülmüştür. Klasik PCR yöntemi ile amplifiye edilen dizilerden *Dickeya chrysanthemi*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pseudomonas cichorii*, *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mediterranea* ve *Pseudomonas viridiflava* patojenlerinin Real-Time PCR ile tanısı ve tespiti için özel primerler ve proplar tasarlanmıştır (Çizelge 3.10, Çizelge 3.11).

*Dickeya chrysanthemi* strainlerinin klasik PCR ile tanı ve tespitinin gerçekleştirilmesi amacıyla kullanılan PCR programı Çizelge 3.4'de, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* klasik ve Nested PCR ile tanı ve tespitinin gerçekleştirilmesi amacıyla kullanılan PCR programı Çizelge 3.5'de, *Pseudomonas cichorii* strainlerinin klasik PCR ile tanı ve tespitinin gerçekleştirilmesi amacıyla kullanılan PCR programı Çizelge 3.6'da, *Pseudomonas corrugata* strainlerinin klasik PCR ile tanı ve tespitinin gerçekleştirilmesi amacıyla kullanılan PCR programı Çizelge 3.7'de, *Pseudomonas fluorescens* ve *Pseudomonas viridiflava* strainlerinin klasik PCR ile tanı ve tespitinin gerçekleştirilmesi amacıyla kullanılan PCR programı Çizelge 3.8'de, *Pseudomonas mediterranea* strainlerinin klasik PCR ile tanı ve tespitinin gerçekleştirilmesi amacıyla kullanılan PCR programı Çizelge 3.9'da gösterilmiştir.

Çizelge 3.4. *Dickeya chrysanthemi* strainlerinin klasik PCR ile tanı ve tespitinin gerçekleştirilmesi amacıyla hazırlanan PCR programı

Aşama	Sıcaklık (°C)	Süre (Saniye)	Döngü Sayısı
<b>Ön Denatürasyon</b>	94	300	1
<b>Denatürasyon</b>	94	30	
<b>Bağlanma</b>	55	60	35
<b>Uzama</b>	72	90	
<b>Son Uzama</b>	72	300	1

Çizelge 3.5. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* strainlerinin klasik PCR ve Nested PCR ile tanı ve tespitinin gerçekleştirilmesi amacıyla hazırlanan PCR programı

Aşama	Sıcaklık (°C)	Süre (Saniye)	Döngü Sayısı
Ön Denatürasyon	94	300	1
Denatürasyon	94	60	
Bağlanma	60	60	30
Uzama	72	120	
Son Uzama	72	300	1

Çizelge 3.6. *Pseudomonas cichorii* strainlerinin klasik PCR ile tanı ve tespitinin gerçekleştirilmesi amacıyla hazırlanan PCR programı

Aşama	Sıcaklık (°C)	Süre (Saniye)	Döngü Sayısı
Ön Denatürasyon	94	300	1
Denatürasyon	94	60	
Bağlanma	66	60	35
Uzama	72	120	
Son Uzama	72	300	1

Çizelge 3.7. *Pseudomonas corrugata* strainlerinin klasik PCR ile tanı ve tespitinin gerçekleştirilmesi amacıyla hazırlanan PCR programı

Aşama	Sıcaklık (°C)	Süre (Saniye)	Döngü Sayısı
Ön Denatürasyon	94	300	1
Denatürasyon	94	30	
Bağlanma	58	60	30
Uzama	72	90	
Son Uzama	72	300	1

Çizelge 3.8. *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas viridiflava*, strainlerinin klasik PCR ile tanı ve tespitinin gerçekleştirilmesi amacıyla hazırlanan PCR programı

Aşama	Sıcaklık (°C)	Süre (Saniye)	Döngü Sayısı
Ön Denatürasyon	94	300	1
Denatürasyon	94	30	
Bağlanma	56	60	30
Uzama	72	90	
Son Uzama	72	300	1

Çizelge 3.9. *Pseudomonas mediterranea* strainlerinin klasik PCR ile tanı ve tespitinin gerçekleştirilmesi amacıyla hazırlanan PCR programı

Aşama	Sıcaklık (°C)	Süre (Saniye)	Döngü Sayısı
Ön Denatürasyon	94	300	1
Denatürasyon	94	30	
Bağlanma	62	60	30
Uzama	72	90	
Son Uzama	72	300	1

Klasik PCR işleminde kullanılan PCR karışımı; toplam hacim 50 µl olacak şekilde 4 µl bakteriyel süspansiyon, primerlerin her birinden 1 µl, 8 µl dNTP karışımı, 5 µl 10× tampon çözelti, 3 µl MgCl<sub>2</sub>, 0,25 µl *Taq* polimeraz ve 27,8 µl steril deiyonize saf su şeklindedir. Amplifikasyon için Techne TC-512 Gradient Thermal Cycler (Bibby Scientific Limited, Staffordshire, İngiltere) kullanılmıştır.

Elde edilen PCR ürünleri (15 µl), %2'lik agaroz jelde 80 voltta 120 dakika yürütülmüştür. Yürütme işleminde ve agaroz jelin hazırlanmasında TAE (Tris-Baz 4,84 g, Asetik Asit [Glasiyel] 1,02 ml, 0,5 M EDTA [pH: 8,0] 2 ml, ddH<sub>2</sub>O 1000 ml) kullanılmıştır.

Yürütme işlemi sonunda PCR ürünleri, etidyum bromür (0,5 µg/ml) ile 20 dakika boyanmış ve ultraviyole ışıkta görüntülenmiştir. Görüntüleme için Vilber Lourmat SR 12575 transillüminatör ve BioCapt Version 11.02 programı kullanılmıştır.

Klasik PCR işleminde kullanılan bakteriyel süspansiyonların hazırlanması için -86 °C de stoklanan *Dickeya chrysanthemi*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pseudomonas cichorii*, *P. corrugata*, *P. fluorescens*, *P. mediterranea* ve *P. viridiflava* strainleri NA besi ortamı içeren petrilere inoküle edilmiş ve 27 °C'de 72 saat boyunca geliştirilmiştir. Bu ortamda geliştirilen bakteriler steril deiyonize su ile süspansiyon edilmiş ve bakteriyel konsantrasyonun 1×10<sup>8</sup> cfu/ml olması sağlanmıştır. İnokulum konsantrasyonunun spektrofotometrik olarak saptanmasında Eppendorf Biophotometer 6131 kullanılmıştır. İnokulumun optik yoğunluğu 1×10<sup>8</sup> cfu/ml'ye karşılık gelen OD<sub>600</sub>=0,1 olacak şekilde ayarlanmıştır.



Çizelge 3.10. Klasik PCR yöntemi ile *Dickeya chrysanthemi*, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pseudomonas cichorii*, *P. corrugata*, *P. fluorescens*, *P. mediterranea* ve *Pseudomonas viridiflava* etmenlerinin tanısı için kullanılan primerler

Bakteri	Primerler	Dizi	Referans
<i>Dickeya chrysanthemi</i>	LF, LR	5'-TTCGTCTAGAGGCCAGGAC-3' 5'-TCAGCTTGTTCCGGATTGTT-3'	Li vd 2011
<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	EXPCCR, EXPCCF, INPCCF, INPCCR,	5'-GCCGTAATTGCCTACCTGCTTAAG-3' 5'-GAACTTCGCACCGCCGACCTTCTA-3' 5'-TTCGATCACGCAACCTGCATTACT-3' 5'-GGCCAAGCAGTGCCTGTATATCC-3'	Kang vd 2003
<i>Pseudomonas cichorii</i>	<i>hrp1a</i> , <i>hrp2a</i>	5'-CCGTTCATCGTCATCGACCT-3' 5'-CTGTCCCACATGATCTGGGT-3'	Cottyn vd 2011
<i>Pseudomonas corrugata</i>	PC5/1, PC5/2	5'-CCACAGGACAACATGTCCAC-3' 5'-CAGGCGCTTTCTGGAACATG-3'	Catara vd 2000
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	ITSIF, ITS2R	5'-AAGTCGTAACAAGGTAG-3' 5'-ACCATATATAACCCCAAG-3'	Rameshkumar vd 2002
<i>Pseudomonas mediterranea</i>	PC1/1, PC1/2	5'-GGATATGAGCCAGGTCTTCG-3' 5'-CGCTCAAGCGCGACTTCAG-3'	Catara vd 2002
<i>Pseudomonas viridiflava</i>	PsV-F, PsV-R	5'-GTAGGTGGTTTGTAAAGTTGAA-3' 5'-ACCTCAGTGTCTAGTATGAGC-3'	Alimi vd 2011

Çizelge 3.11. Real-Time PCR yöntemi ile *Dickeya chrysanthemi*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pseudomonas cichorii*, *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mediterranea* ve *Pseudomonas viridiflava*'nın tanısı için geliştirilmiş olan primerler

ETMEN	PRİMER	DİZİ	PCR ÜRÜNÜ
<i>Dickeya chrysanthemi</i>	HBDCI HBDCR	5' CATACCCGACAAGACACAACC 3' 5' ACGTGCTGACGCTGAAT 3'	65 bp
<i>P. carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	HBPCCL HBPCCR	5' ATCCGGGTCTGTTGATTTGA 3' 5' GCGGAAGAGATGGAAATCG 3'	63 bp
<i>Pseudomonas cichorii</i>	HBPCIL HBPCIR	5' TATCCAGCGTCCGGTCAG 3' 5' GGATCAGACCCTGCCATTC 3'	73 bp
<i>Pseudomonas corrugata</i>	HBPCL HBPCR	5' AAAGTGCCTCGTATCTGGA 3' 5' ACTCAGTCCCGCCACCTT 3'	70 bp
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	HBPFL HBPFR	5' GACGGTTCGATCCGGTTT 3' 5' TGGAATGCTCATTCTAAGCTTTAT 3'	70 bp
<i>Pseudomonas mediterranea</i>	HBPML HBPMR	5' ACCGACTCGGGAGCAATA 3' 5' CTCCGGTACCTGCTGCAT 3'	73 bp
<i>Pseudomonas viridiflava</i>	HBPVL HBPVR	5' GGGAACTGCATCCAAAACCTG 3' 5' TACGCATTCACCGCTACAC 3'	77 bp

Primerler ve problemlerin belirlenmesinde insan gen transkriptlerinin Real-Time PCR ile belirlenmesi için oluşturulan LNA (Locked Nucleic Acid) sistemi kullanılmıştır (Petersen ve Wengel 2003). Çalışmada kullanılan LNA prob, bugün Real-Time PCR sistemleri için sıklıkla kullanılan 25-30 nükleotitlik uzun problemlerden farklılık göstermektedir. LNA problemler 8-9 nükleotid uzunluğunda fakat sahip olduğu son

teknolojik özellikler nedeniyle uzun dizilere sahip probalar kadar güvenilir ve hassas sonuçlar elde edilmektedir. Bu çalışmada kullanılan probalar için raportör boya fluorescein amidit (FAM), baskılayıcı boya ise karboksitetrametilrodamindir (TAMRA).

Çizelge 3.12. Real-Time PCR yöntemi ile *Dickeya chrysanthemi*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pseudomonas cichorii*, *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mediterranea* ve *Pseudomonas viridiflava*'nın tanısı için geliştirilmiş olan probalar

ETMEN	PROB DİZİSİ
<i>Dickeya chrysanthemi</i>	5' CCAGCCAG 3'
<i>P. carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	5' TGCTGTCC 3'
<i>Pseudomonas cichorii</i>	5' GCAACCAG 3'
<i>Pseudomonas corrugata</i>	5' GAGCAGCA 3'
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	5' CTCCACCA 3'
<i>Pseudomonas mediterranea</i>	5' TGCCGCCG 3'
<i>Pseudomonas viridiflava</i>	5' TGGTGGAA 3'

TGCGCGATAACTGCCGCCGTTTCGCTGGCGGATACGTTACGCGCTCCGGTTCGCCTGCAATTTGAAAGCCG  
GGAGGATGAAGAATGATTCCGCTGGCTCAGACACTGCGACCGGTTCAGCCGGGCGCGGGCGGCACTCTCCC  
GTCAACTGGCGACGGCGCACCGCTTCGCCTTCATGCTGGATGGCCAGCCCGGCGAGTTGCGTTTTGCAATT  
GGCGCAGGAAGCCAAGCCCGACGCGCAGGAGAGCGGCTGGCGCTGCCACGCCGGAACGCTGTGGCTGGAC  
AACGCCGCCCGTTGCTGTGCTGTTTTCCGCCTGCCCGGCGCTGCTGCCCGGCCCGCATGACAGTGAAG  
ACGCCGTACACTGGTACTGGACCCACTACAATCATGCGCTCAGCCCGGCGCTGCGCGACCTGTTCCGGCGA  
GTTGCAACCGCTATTCCCGGCGCCAACGGGCCACTCAGC **CATACCCGACAAGACACAACC** GCCCATAACGAT  
TCAGA **CCAGCCAG** ACA **ATTCAGCGTCAGCAGCGT** CAGCGGCGTCAGCGGCGTCACCTCATCCGGCACCAT  
CCGACGCTCAGCGCGCCGGCCGAGGTAACGCTGTGGCTGGACGCCAGCCGGGGTGATTTCCGGGTGCGCAG  
CCGGTTGCGTACCTCGCACAGACCTTGCAACAATGGTTAAGTCCGGCCGGGGTGGTCCGGCCCCGCGCTAT  
CCGCTACCCGGTCATCTGGCGATAAGGGTGCCGTTAATACTGGCGGAAGTGACGTTGTACATAAACAAT  
TAACCCATTTGGAGCCGGGCGACCTGATCTGTCCACTCAACAGTACTTTTTACCCGAGGGGCGACGGCAG  
TATCACGCTGGCCGACCGGGGTTGACCGGGCAGCTCAGGATGGACGTGCTCGCCCCCTTACTGGTTTACC  
GTGACAGAACTGGAGGAATGTCCCCTGACAACACCTTTTGACGACACCGCCGTTTTTCGATAATACCGCCG

Şekil 3.1. Real-Time PCR'da *Dickeya chrysanthemi*'nin tanısı için kullanılan HBDCL ve HBDCR primerlerinin ve probun gen üzerindeki bağlanma yerleri (Yeşil renk: Real-Time PCR primerlerini, Kırmızı renk: Probu temsil etmektedir)

CTGTAT **ATCCGGGTCTGTTGATTTGA** GTT **TGCTGTCC** ACGTTCTGCTGGC **CGATTTCATCTCTTCCGG** G  
TTGAACGTGGCATAACACCACCCATTTACGATGTCGTACCCTGGTTCGTCACCCTGACGGACTGCCATTG  
CCAACGGCTCTTTTGTAGTAAATCCCGGTAGAATGACGTGGTCAGAGGGCTTTTCCGCGTCGAAGGTGCG  
CACGCCGGGACGCGCCACTTTATCGCGGGCAATGACATCGCAGCGTCCAGACAGGTAGGCTGCGACGTAC  
TCTTTATTGTTCTCGATGACGACCG

Şekil 3.2. Real-Time PCR'da *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*'un tanısı için kullanılan HBPCCL ve HBPCR primerlerinin ve probun gen üzerindeki bağlanma yerleri (Yeşil renk: Real-Time PCR primerlerini, Kırmızı renk: Probu temsil etmektedir)

---

TAACTGTCCACATGATCTGGGTCAGGCTGGCGTAACCGCCGCCAGGATCATCAGCAGGATCATGACCT  
GCTTGAGCATGTGGCCAGTTCCGAGGTGTTGTGCGCCAGTGCCGGGTTGATCTGGCCACCCACCAGCGC  
GCCACGCTGGTTGTGCAACAGGCAGCCGATGGA CTGAAACAGCCAGAAGGGCATGGCCAGCAACAGGCC  
AGCAGCAGACCGATGATGCTTTCCCTTGAGCAGCAGCGCCGTCAGGTCCAGCCAGTCGAGGGTCTGGCCGG  
TGAGGGACGCACGAATGCTGGGCATCGGGAACAGGGCCAGGGCCAGCAGCATGGTGTGCCGAGCATGCC  
TTTGAGTTCCGGTGAACGCGAACGCCGAATCAGGAACAGGCACGGGTACAGCCGTGCCATGCCGATGGTC  
AGGGCAATGATCGATTGCTGACTTCCCTTGAACGGGAGTTCGAACATCTCAAGGCCCTGCTCTGACCGATC  
ATGTTGAAAGACAGGTAGGCCAGTTGCATGAGTTCGATAACC **TATCCAGCGTCCGGTCAG**CGCCAGTGCCA  
CGCCTACG **GCAACCAG**CTTGATGGC **GAATGGCAGGGTCTGATCC**TGCAACTGCATCACCGCCCTGCAGCAG  
CGAGGTGATGACACCGACAATCACCGCCACGATCAGCGCCGGAGCGGACAGCACCACCACCAGCAACATG  
GCCTGCTTGAAAAGCGTCAGGGTTTTCCATAAAGCCTCGGCGGATCACATGTAGCTGTAGAAGAGCCCGTC  
GAGCAGGCGGGTCCAGCCATCCACCAGCAGCAACAGGAGGATTTTCAGCGGTAGCGAGATGGTCATCGGC  
GCAACCATCTGCATGCCCAGGGCCAGCAGAATGTTGAGACGATCAGGTGATGACGATGAACGGGATAT  
AGATCAGGAAGCCGATCTGAAAACCGGCCCTGCAACTCGGACAGCAGCAAGGCCGGCACCACCAGCAACAG  
GTCATCGCGGGTGGCCTGGGACGACATTTCCCTTGGGCCACATGCGCTGGGTGTTTTCAAGCAGGTGGGTC  
TGGATGTCCGGATCGATGTTGCGGGTCATGAACAGGCGCAGCGGTTGATCAGATGTTTGCCGGCGCTTT  
CCATGGCGGCAAGTTGTCCAGCCGATCGGGGAGTTTCTTGACCCGTTGCCCCATTTGCTTGAACACCGG  
CGCCATGATGAACAGGGTGGCGGCCAGGGCAATGCCATACAGCGCCATGTTGCGCGGCGCCTGCTG

---

Şekil 3.3. Real-Time PCR’da *Pseudomonas cichorii*’nin tanısı için kullanılan HBPCIL ve HBPCIR primerlerinin ve probun gen üzerindeki bağlanma yerleri (Yeşil renk: Real-Time PCR primerlerini, Kırmızı renk: Probu temsil etmektedir)

---

ACTGCTGAAACTGATCGGCAGCATTTCGCTGATTGAAAATGGGCGACCCCTGGATCCTGAAATCGCCT  
CGGTGCCATGATCAGCAAAACGCATTTTCGAT **AAAGTGCCTCGTATCTGGA**ATTGGCCGCC **GAGCAGCA**A  
CTCAACGTGACGC **AAGGTGGCGGGACTGAGT**CCGGCGTCTTCGTCCAGCCGACGATCATCGACGGAGTCG  
AACGTGAAAGTCGCCTGTTTATCGAAGAGATCTTCGGGCCGGTACTGAGTGTACCCAGCTTCAGTACTCT  
CGACGAAGCCATAGA ACTTGCCAACGACACCGTCTACGGCCTGGCGGCATCCGCCATACCCGGCAGCCCTG  
CGTAATGCCTTGCGCCTGTGCGGGGAGATTCGTGCGGGCGTGG

---

Şekil 3.4. Real-Time PCR’da *Pseudomonas corrugata*’nın tanısı için kullanılan HBPCIL ve HBPCR primerlerinin ve probun gen üzerindeki bağlanma yerleri (Yeşil renk: Real-Time PCR primerlerini, Kırmızı renk: Probu temsil etmektedir)

---

CTGTTTTTATTTGTTGTACACATAGCCGTAGGGGAACCTGCGGCTGGATCACCTCCTTAATCGACGACAT  
CAGCTGCTCCATAAGTTCCACACGAATTGCTTGATTCATTGAAGAAGACGAAAAGAAGCAGCCCGAAAT  
TGGGTCTGTAGCTCAGTTGGTTAGAGCGCACCCCTGATAAGGGTGAGGTCCGGCAGTTCGAATCTGCCAG  
ACCCACCAATTTTGTGTGGGAAACGCCTGTAGAAAATACGGGGCCATAGCTCAGCTGGGAGAGCGCCTGCC  
TTGCACGCAGGAGGTC **GACGGTTCGATCCGGTTT**GG **CTCCACCA**CTACTGCTTCTGTTTGT **ATAAAGCTT**  
**AGAAATGAGCATTCCA**TCGTTGTGATGGTGAATGTTGATTTCTAGTCTTTGACTAGTTTCGTTCTTTAAAA  
ATTTGGGTATGTGATAGAAAGATAGACTGAACGTTACTTTACTGGTAACGGATCAGGCTAAGGTAAAAAT  
TTGTGAGTTCTCTTA ACTGAGAAATTCGAATTTTCGGCGAGTGTGCTTTCACAGTATAACCAGATTGCT  
TGGGGTTATATGGTCAAGTGAAGAAGCGCATAACGGTGGAGCTTGTGTGCAAAAACAAA

---

Şekil 3.5. Real-Time PCR’da *Pseudomonas fluorescens*’in tanısı için kullanılan HBPFIL ve HBPFIR primerlerinin ve probun gen üzerindeki bağlanma yerleri (Yeşil renk: Real-Time PCR primerlerini, Kırmızı renk: Probu temsil etmektedir)

CGCCGCGTTCGACCGACGTGGCCTCAAGCAGATCATCCAGCACC GGCTCGACTCGCCGGTCCAGCGGATGA  
 GCGGGCGTCCGATCGTCTCGGACGGCGGTGCACGGTTTCG **ACCGACTCGGGAGCAATA**GC **TGCCGCCG**  
 ACTCTTCCGTCGCCACGAAAGCGCCAG **ATGCAGCAGGTACCGGAG**ATTTCAGGCAATTCCTTGTAAATTGAA  
 GGAATTCCTCATCTCGATATAGCTGGCCGCACTCTCTCCGAACCTGCTCATCAGGTTGTCAATATCATT  
 GTCCGATTATAAGCACTTCACG

Şekil 3.6. Real-Time PCR’da *Pseudomonas mediterranea*’nın tanısı için kullanılan HBPMML ve HBPMR primerlerinin ve probun gen üzerindeki bağlanma yerleri (Yeşil renk: Real-Time PCR primerlerini, Kırmızı renk: Probu temsil etmektedir)

TAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGAT  
 GATCAGTCACACTGGAAC TGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGATATTGGACAAT  
 GGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTG  
 GGAGGAAGGGCAGTAACCTAATACGTTATTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACC GGCTAACTCTG  
 TGCCAGCAGCCGCGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCTAGG  
 TGGTTTGTAAAGTTGAATGTGAAATCCCGGGCTCAACCT **GGGAAGTGCATCCAAAAGT**GCAAGCTAGA  
 GTAGGGCAGAGGG **TGGTGG**AATTCCT **GTGTAGCGGTGAAATGCGTA**GATATAGGAAGGAACACCAGTGG  
 CGAAGGGCACCACCTGGGCTCATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAC  
 CCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCAACTAGCCGTTGGAATCCTTGAGATTTTAGTGGCGCAGCTAA  
 CGCATTAAAGTTGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAAC TCAAATGAATTGACGGGGGGCCCGCA  
 CAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGCCTTGACATCCAA

Şekil 3.7. Real-Time PCR’da *P. viridiflava*’nın tanısı için kullanılan HBPVL ve HBPVR primerlerinin ve probun gen üzerindeki bağlanma yerleri (Yeşil renk: Real-Time PCR primerlerini, Kırmızı renk: Probu temsil etmektedir)

### 3.3. Real-Time PCR Optimizasyonu

*Dickeya chrysanthemi*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pseudomonas cichorii*, *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mediterranea* ve *Pseudomonas viridiflava*’nın Real-Time PCR ile kısa sürede tanılarının gerçekleştirilmesi amacıyla Real-Time PCR programı Çizelge 3.20, Çizelge 3.21, Çizelge 3.22’de verilmiştir. Her bir Real-Time PCR işleminde, toplam hacim 27,6 µl olacak şekilde 2 µl bakteriyel süspansiyon ya da kalıp DNA, primerlerin herbirinden 1,2 µl, 0,3 µl TaqMan 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 kullanılmıştır. Çalışmada Cepheid Smart Cycler II Real-Time PCR cihazı ve Cepheid Smart Cycler Software V.2.0c programı kullanılmıştır.

Çizelge 3.13. Real-Time PCR optimizasyonu sonucunda *Dickeya chrysanthemi*, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pseudomonas corrugata*, *P. fluorescens* ve *P. viridiflava* için oluşturulan Real-Time PCR programı

Aşama	Sıcaklık (°C)	Süre (Saniye)	Döngü Sayısı
Ön Denatürasyon	95	120	1
Denatürasyon	94	15	
Bağlanma	58	20	35
Uzama	72	15	
Son Uzama	72	120	1

Çizelge 3.14. Real-Time PCR optimizasyonu sonucunda *Pseudomonas cichorii* için oluşturulan Real-Time PCR programı

Aşama	Sıcaklık (°C)	Süre (Saniye)	Döngü Sayısı
Ön Denatürasyon	95	120	1
Denatürasyon	94	15	
Bağlanma	65	20	35
Uzama	72	15	
Son Uzama	72	120	1

Çizelge 3.15. Real-Time PCR optimizasyonu sonucunda *Pseudomonas mediterranea* için oluşturulan Real-Time PCR programı

Aşama	Sıcaklık (°C)	Süre (Saniye)	Döngü Sayısı
Ön Denatürasyon	95	120	1
Denatürasyon	94	15	
Bağlanma	60	20	35
Uzama	72	15	
Son Uzama	72	120	1

#### 3.4. Primerler ve Probların *Dickeya chrysanthemi*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pseudomonas cichorii*, *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mediterranea* ve *Pseudomonas viridiflava* Strainlerine Spesifikliğinin Belirlenmesi

*Dickeya chrysanthemi*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pseudomonas cichorii*, *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mediterranea* ve *Pseudomonas viridiflava* patojenlerine özel tasarlanan primerler ve problar kullanılarak kültür koleksiyonunda bulunan *Dickeya chrysanthemi*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pseudomonas cichorii*, *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mediterranea* ve *Pseudomonas viridiflava* strainlerinin tanısı ve tespiti gerçekleştirilmiştir. Çalışmada Real-Time PCR işleminde kullanılan bakteriyel süspansiyonun hazırlanması için -86°C de stoklanan *Dickeya chrysanthemi*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pseudomonas cichorii*, *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mediterranea* ve *Pseudomonas viridiflava* strainleri, NA besi ortamı içeren petrilere inoküle edilmiş ve 27°C'de 72 saat boyunca geliştirilmiştir. NA besi ortamında geliştirilen bakteriler steril deiyonize su ile süspansiyon edilmiş ve bakteriyel konsantrasyonun  $1 \times 10^8$  cfu/ml olması sağlanmıştır. Süspansiyon konsantrasyonunun spektrofotometrik olarak saptanmasında Eppendorf Biophotometer 6131 (Eppendorf AG, Hamburg, Almanya) kullanılmıştır. Süspansiyonun optik yoğunluğu  $1 \times 10^8$  cfu/ml'ye karşılık gelen OD<sub>600</sub>=0,1 olacak şekilde ayarlanmıştır. Her strainden elde edilen süspansiyondan 2 µl alınarak Real-Time PCR işlemi gerçekleştirilmiştir.

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

*Dickeya chrysanthemi*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pseudomonas cichorii*, *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mediterranea* ve *Pseudomonas viridiflava* etmenlerinin Real-Time PCR ile tespit edilecek en düşük DNA miktarının tespiti için saf DNA'dan hassasiyet çalışması yapılmıştır. Çalışma için kültür koleksiyonunda yer alan *Dickeya chrysanthemi* DSM-4610, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* DSM-30168, *Pseudomonas cichorii* DSM-50259, *Pseudomonas corrugata* ICMP-5819, *Pseudomonas fluorescens* 9.1.6 Makedonya, *Pseudomonas mediterranea* DSM-16733 ve *Pseudomonas viridiflava* DSM-11124 strainlerinden faydalanılmıştır. DNA izolasyonunda Thermo FastPrep FP120A-230 multi tüp homojenizatör (Thermo Scientific, Massachusetts, ABD) ve Qbiogene/BIO101 FastDNA moleküler izolasyon kitini (MP Biomedicals, Kaliforniya, ABD) ihtiva eden kombine sistem kullanılmıştır. *Dickeya chrysanthemi*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pseudomonas cichorii*, *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mediterranea* ve *Pseudomonas viridiflava* strainlerinden izole edilen DNA'nın saflığı ve nanogram düzeyinde konsantrasyonun belirlenmesinde Thermo NanoDrop ND-1000 spektrofotometre (Thermo Scientific, Massachusetts, ABD), pikogram düzeyinde konsantrasyonun belirlenmesinde Invitrogen Qubit florometre (Invitrogen, Kaliforniya, ABD) kullanılmıştır. Real-Time PCR yönteminin hassasiyetinin belirlenmesinde *Dickeya chrysanthemi* için 55 pg, 42 pg, 32 pg, 21 pg ve 12 pg DNA seviyeleri, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* için 51 pg, 43 pg, 34 pg, 22 pg ve 11 pg DNA seviyeleri, *Pseudomonas cichorii* için 52 pg, 41 pg, 34 pg, 23 pg ve 14 pg DNA seviyeleri, *Pseudomonas corrugata* için 55 pg, 43 pg, 31 pg, 22 pg ve 14 pg DNA seviyeleri, *Pseudomonas fluorescens* için 54 pg, 44 pg, 33 pg, 21 pg ve 14 pg DNA seviyeleri, *Pseudomonas mediterranea* için 50 pg, 42 pg, 34 pg, 21 pg ve 13 pg DNA seviyeleri ve *Pseudomonas viridiflava* için 54 pg, 43 pg, 35 pg, 22 pg ve 12 pg DNA seviyeleri test edilmiştir. Pikogram düzeyine kadar seyreltmeler için steril deiyonize su kullanılmıştır. Elde edilen her bir seviyedeki DNA'lardan 2 µl alınarak Real-Time PCR işlemi gerçekleştirilmiştir.

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

Bakteriyel patojenler *Dickeya chrysanthemi*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pseudomonas cichorii*, *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mediterranea* ve *Pseudomonas viridiflava* Real-Time PCR ile tespit edilecek en düşük bakteri sayısının tespiti için, patojenler kültür koleksiyonundan alınıp NA besi ortamında geliştirilmiş, kolonilerden yoğun bir stok çözelti hazırlanmıştır. Oluşturulan stok çözeltilerden  $10^{-1}$ 'den  $10^{-10}$ 'a kadar 10'un katları şeklinde seyreltmeler 3 tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiş ve bunlar ayrı ayrı tüplere konulmuştur. Elde edilen her bir solüsyondan 2 µl alınıp Real-Time PCR işlemi için kullanılmıştır. Bu aşamada Real-Time PCR ile tespit edilecek en düşük bakteri sayısının tespiti hedeflendiğinden  $10^{-1}$ 'den  $10^{-10}$ 'a kadar seyreltilen ve ayrı tüplere alınan süspansiyonlardan 2 µl alınıp 50 µl steril deiyonize su içerisinde karıştırılmış ve NA besi ortamlarına steril yayma çubuk ile inokule edilmiştir. İnokulasyondan sonra besi

ortamlarında gelişen bakteri sayılarını tespit etmek için petriler 4 gün boyunca 27 °C'de inkübasyona bırakılmıştır.

### 3.7. Primerler ve Problemlerin Seçiciliğinin Belirlenmesi

*Dickeya chrysanthemi*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pseudomonas cichorii*, *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mediterranea* ve *Pseudomonas viridiflava* için geliştirilen primer ve problemlerin özgüllüğünü belirlemek için her primer prob seti ilk olarak diğer öz nekrozu patojenlerine karşı test edilmiş daha sonra farklı diğer bitki patojeni bakteri türleri kullanılmıştır (Çizelge 3.2 ve Çizelge 3.3). Real-Time PCR işleminde kullanılan bakteriyel süspansiyonların hazırlanması için -86 °C de stoklanan; *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *P. savastanoi* pv. *savastanoi*, *Pseudomonas tomato* pv. *tomato*, *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*, *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* strainleri NA (Nutrient Agar), *Bacillus subtilis* straini PDA, *Erwinia amylovora* straini NSA (Nutrient Sükroz Agar), *Rhizobium vitis* straini RS (Roy& Sasser) besi ortamlarını içeren petrilere inoküle edilmiş ve 27 °C'de 72 saat boyunca geliştirilmiştir. Bu ortamlarda geliştirilen kolonilerden biri seçilerek steril deiyonize su ile süspansiyon edilmiştir. Bakteriyel konsantrasyonun  $1 \times 10^8$  cfu/ml olması sağlanmıştır. Süspansiyonun konsantrasyonunun spektrofotometrik olarak saptanmasında Eppendorf Biophotometer 6131 kullanılmıştır. Süspansiyonun optik yoğunluğu  $1 \times 10^8$  cfu/ml'ye karşılık gelen  $OD_{600}=0,1$  olacak şekilde ayarlanmıştır. Her strainden elde edilen süspansiyondan 2 µl alınarak Real-Time PCR işlemi gerçekleştirilmiştir.

### 3.8. *Dickeya chrysanthemi*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pseudomonas cichorii*, *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mediterranea* ve *Pseudomonas viridiflava*'nın Hastalıklı Bitki Dokularından Tespiti

Real-Time PCR ile hastalıklı bitki dokularından *Dickeya chrysanthemi*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pseudomonas cichorii*, *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mediterranea* ve *Pseudomonas viridiflava*'nın doğrudan tespiti için Klass F1 domates fidelerine patojenlerin inokulasyonu üç tekerrürlü olarak yapılmıştır. Çalışmada -86°C de stoklanan *Dickeya chrysanthemi*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pseudomonas cichorii*, *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mediterranea* ve *Pseudomonas viridiflava* strainleri NA besi ortamı içeren petrilere inoküle edilmiş ve 27°C'de 72 saat boyunca geliştirilmiştir. Bu ortamda geliştirilen bakteriler steril deiyonize su ile süspansiyon edilmiş ve bakteriyel konsantrasyonun  $1 \times 10^8$  cfu/ml olması sağlanmıştır. İnokulum konsantrasyonunun spektrofotometrik olarak saptanmasında Eppendorf Biophotometer 6131 kullanılmıştır. İnokulum optik yoğunluğu  $1 \times 10^8$  cfu/ml'ye karşılık gelen  $OD_{600}=0,1$  olacak şekilde ayarlanmış ve sağlıklı bitki gövdelerine injekte edilmiştir. Bitkiler, hastalığın düzgün seyri için geliştirme odalarına (Bitki Koruma Bölümü kontrollü iklim odaları) aktarılmıştır. İnoküle edilen bitkiler, semptomların gelişmesi için ortam sıcaklığı  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  sıcaklıkta %50-70 nisbi nemde inkübe edilmiştir. Bitkiler inkübasyon sürecinde, günde 12 saat

boyunca aydınlatılmıştır. Aydınlatmada her biri 3050 lümen gücünde 10 adet floresan lamba kullanılmıştır.

Öz nekrozu hastalığı belirtilerin gözlenmesi etmenlere göre değişiklik göstermiştir. Öz nekrozu hastalığının gelişiminin gözlenmesinin ardından, inokulasyondan bir ay sonra gövde %70'lik etanol ile yüzey sterilizasyonuna tabi tutulmuştur. Öz bölgesi steril bir ortamda fosfat tampon eşliğinde ezilerek parçalanmış, patojenlerin fosfat tampona (NaCl 7,2 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,48 g, K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,43 g, ddH<sub>2</sub>O 1000 ml) geçmesi sağlanarak hastalıklı bitki dokularından tespitite kullanılacak stok solüsyonlar hazırlanmıştır. Hazırlanan stok solüsyonlarda bitki kaynaklı PCR inhibitörü maddelerin konsantrasyonları uygulanacak PCR işlemlerinin başarılarını etkileyebileceğinden stok solüsyonlar on kat seyreltilerek birer solüsyon daha hazırlanmıştır. Her solüsyondan 2µl alınarak Real-Time PCR işlemleri yapılmıştır.

Bitki total DNA'sı ile tasarlanan primer ve problemlerin herhangi bir amplifikasyon oluşturup oluşturmadığını kontrol etmek için sağlıklı bitkiden örnek alınarak bitki total genomik DNA izolasyonu yapılmış ve çalışmada bitki total genomik DNA'sı da kontrol edilmiştir. Bitkilerden DNA izolasyonunda Thermo FastPrep FP120A-230 multi tüp homojenizatör ve Qbiogene/BIO101 FastDNA moleküler izolasyon kitini ihtiva eden kombine sistem kullanılmıştır. Domates bitkilerinden izole edilen DNA'nın saflığı ve nanogram düzeyinde konsantrasyonun belirlenmesinde Thermo NanoDrop ND-1000 spektrofotometre kullanılmış ve bitki DNA konsantrasyonu yaklaşık 100-150 ng/µl olacak şekilde seyreltilmiştir.

### **3.9. Real-Time Bio-PCR**

Real-Time PCR işlemi nükleik asit temelli çalışan bir yöntem olduğundan hastalıklı bitki materyalinde var olan ölü bakterilerin de tespiti mümkün olabilmektedir. Real-Time Bio-PCR yöntemi sadece canlı bakteriyi test etmeyi hedefleyen bir yöntemdir.

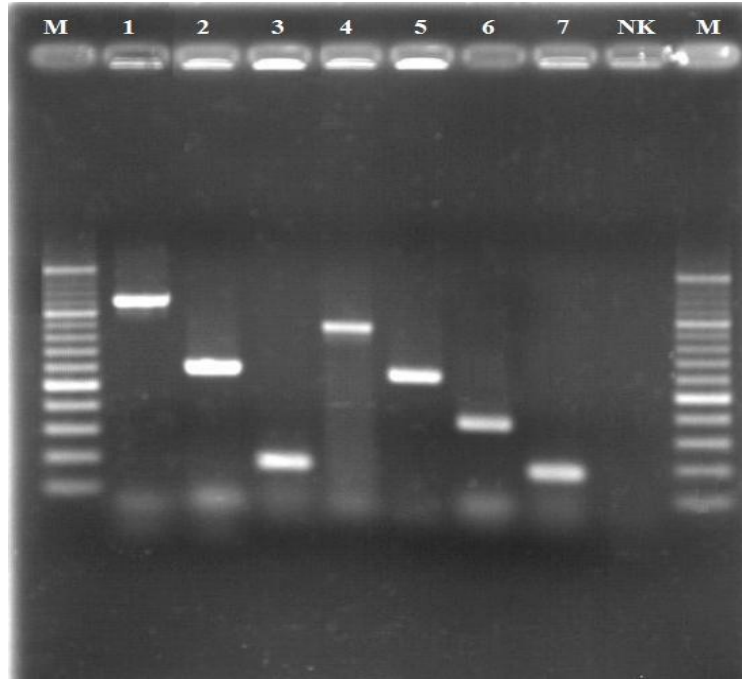
Bu amaçla öncelikle, bir bakteriyel süspansiyon hazırlanmış ve bu solüsyon 10<sup>-1</sup> den 10<sup>-3</sup>'e kadar 10'un katları şeklinde seyreltilmiştir. Tüplerdeki örneklerden 2 µl alınıp 50 µl steril deiyonize su içerisinde karıştırılarak NA besi ortamlarına steril yayma çubuğu ile inokule edilmiş ve 8 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra petrilere 1 ml steril deiyonize su eklenerek canlı olan bakterilerin suya geçmesi sağlanmıştır. Elde edilen stok bakteriyel süspansiyonlardan 2 µl alınarak Real-Time PCR işlemi gerçekleştirilmiştir.



## 4. BULGULAR

### 4.1. *Dickeya chrysanthemi*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pseudomonas cichorii*, *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mediterranea* ve *Pseudomonas viridiflava*'nın Klasik PCR ile Tanısı

*Dickeya chrysanthemi*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pseudomonas cichorii*, *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mediterranea* ve *Pseudomonas viridiflava*'nın Klasik PCR ile tanısını gerçekleştirmek için *Dickeya chrysanthemi* strainleri; LF, LR (Li vd 2011), *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* strainleri; EXPCCR, EXPCCF ve Nested PCR primerleri INPCCF, INPCCR (Kang vd 2003), *Pseudomonas cichorii* strainleri; *hrp1a*, *hrp2a* (Cottyn vd 2011), *Pseudomonas corrugata* strainleri; PC5/1 ve PC5/2 (Catara vd 2000), *Pseudomonas fluorescens* strainleri; ITSIF, ITS2R (Rameshkumar vd 2002), *Pseudomonas mediterranea* strainleri; PC1/1 ve PC1/2 (Catara vd 2002) ve *Pseudomonas viridiflava* strainleri; PsV-F, PsV-R (Alimi vd 2011) primer setleri ile test edilmiştir (Çizelge 3.5, Şekil 4.1).

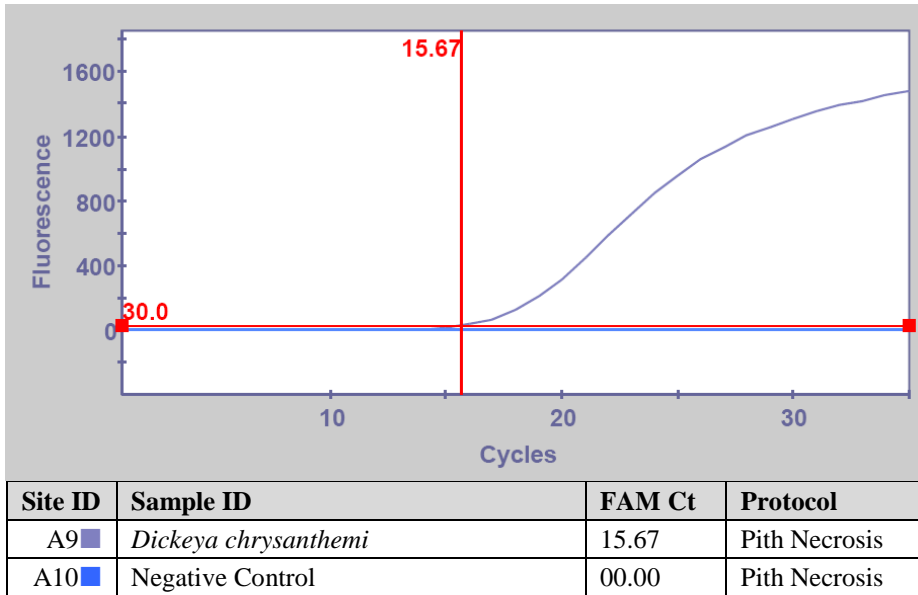


Şekil 4.1. 1-*Pseudomonas corrugata* (1100-bp), 2-*Pseudomonas mediterranea* (600-bp), 3-*Pseudomonas viridiflava* (180-bp), 4-*Pseudomonas cichorii* (890-bp), 5-*Pseudomonas fluorescens*(560-bp), 6-*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (400-bp) ve 7-*Dickeya chrysanthemi* (171-bp)'nin Klasik PCR ile Tanısı. M, markeri; NK, Negatif kontrolü sembolize etmektedir.

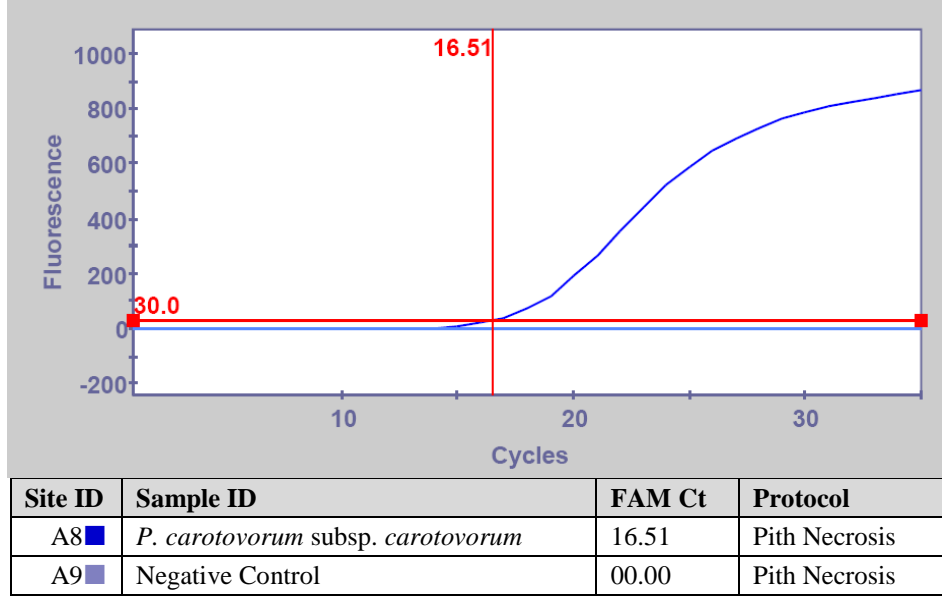
#### 4.2. *Dickeya chrysanthemi*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pseudomonas cichorii*, *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mediterranea* ve *Pseudomonas viridiflava*'nın Real-Time PCR ile Tanısı

*Dickeya chrysanthemi*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pseudomonas cichorii*, *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mediterranea* ve *Pseudomonas viridiflava*'nın Real-Time PCR ile tanılarını gerçekleştirmek için Akdeniz Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Fitopatoloji Anabilim Dalı'na ait kültür koleksiyonunda yer alan Type strainlerden kullanılarak primer-probların ve Real-Time PCR programlarının kontrolü yapılmıştır (Şekil 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.4, Şekil 4.5, Şekil 4.6, Şekil 4.7, Şekil 4.8).

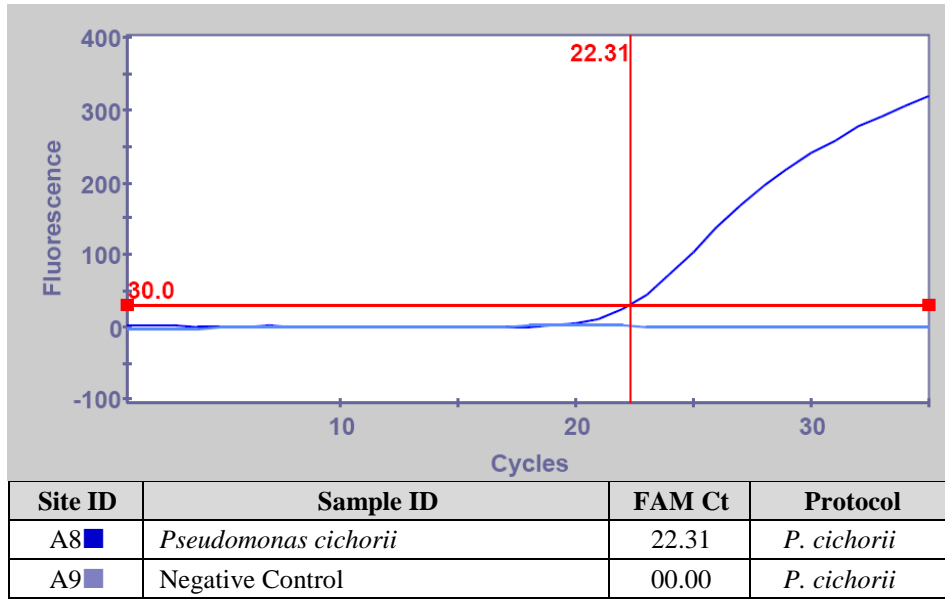
*Dickeya chrysanthemi*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pseudomonas cichorii*, *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mediterranea* ve *Pseudomonas viridiflava*'nın tanısında kullanılan primerler ve SYBR Green kullanılarak Real-Time PCR ile tek bir pik eğrisinin elde edildiğini göstermek amacıyla Thermal Melting (Erime Eğrisi) eğrisi elde edilmiştir. *Dickeya chrysanthemi* için kullanılan primerlerin maximum erime sıcaklığı 85.36 °C, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* için 84.12°C, *Pseudomonas cichorii* için 87.97°C, *Pseudomonas corrugata* 87.8°C, *Pseudomonas fluorescens* için 85.73°C, *Pseudomonas mediterranea* için 89.31°C ve *Pseudomonas viridiflava* için 84.7°C için olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.9, Şekil 4.10, Şekil 4.11, Şekil 4.12, Şekil 4.13, Şekil 4.14, Şekil 4.15).



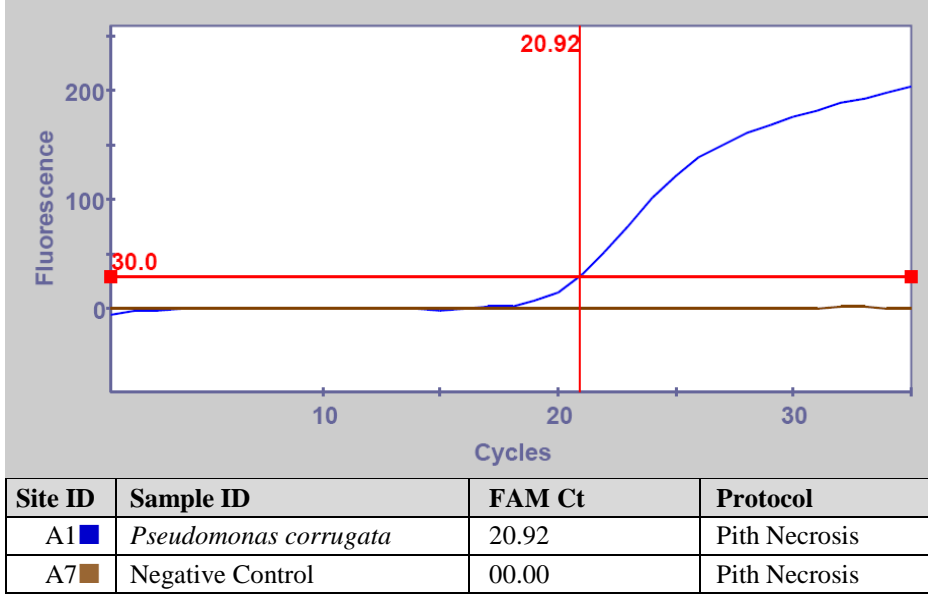
Şekil 4.2. *Dickeya chrysanthemi*'nin Real-Time PCR ile tanısı



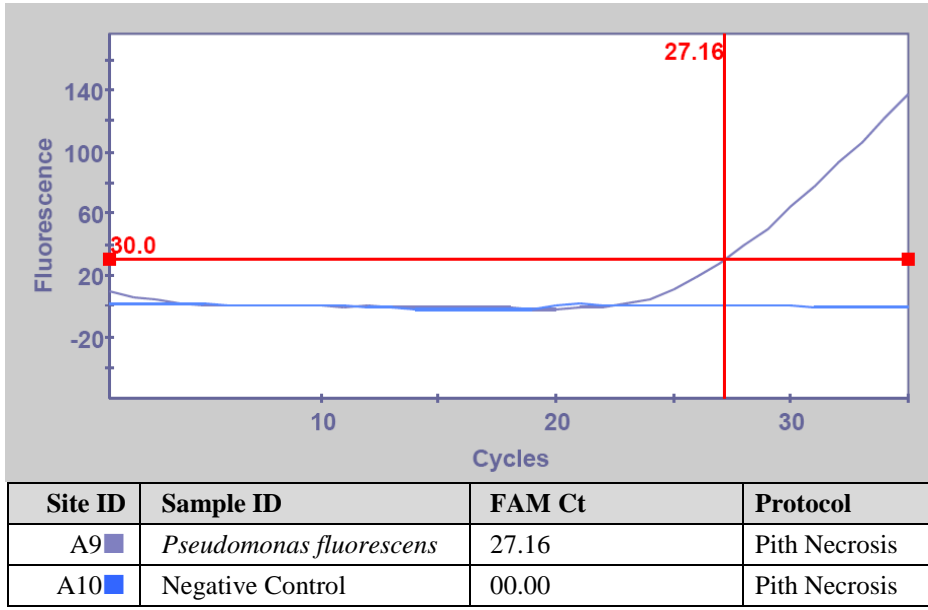
Şekil 4.3. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*'un Real-Time PCR ile tanısı



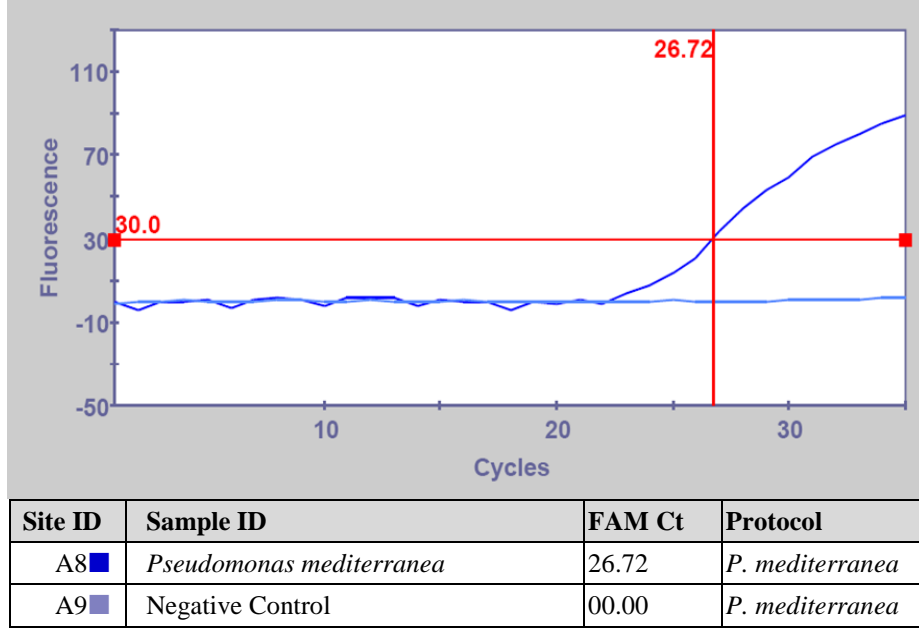
Şekil 4.4. *Pseudomonas cichorii*'nin Real-Time PCR ile tanısı



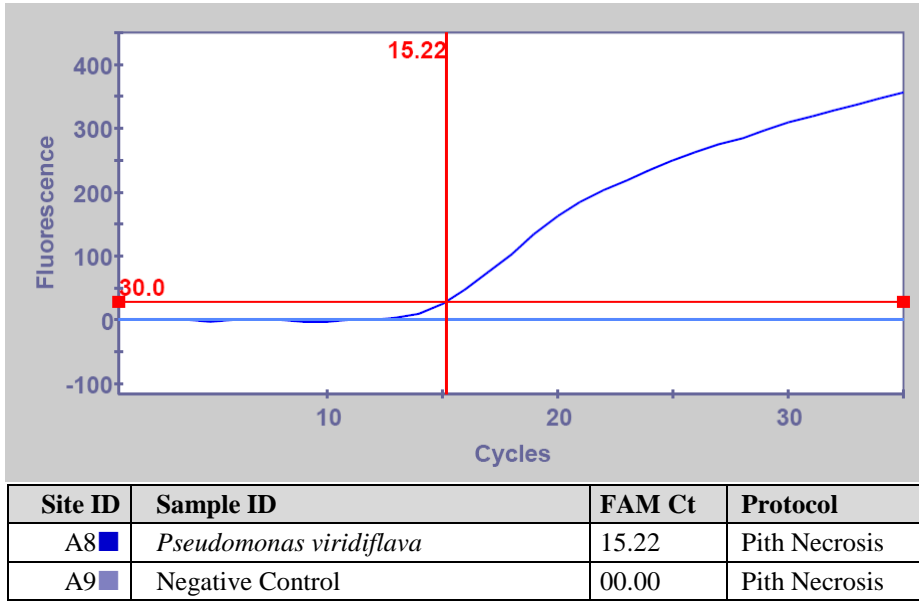
Şekil 4.5. *Pseudomonas corrugata*'nın Real-Time PCR ile tanısı



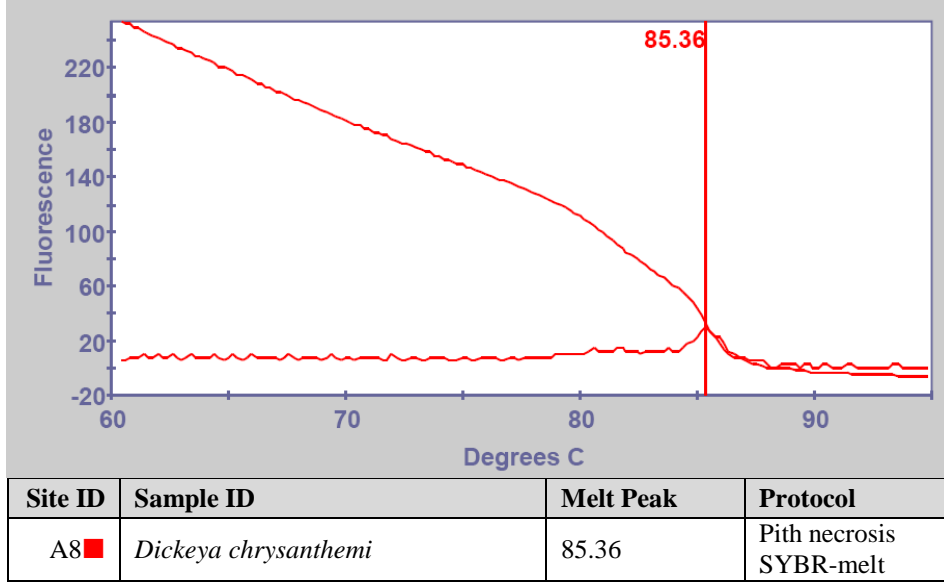
Şekil 4.6. *Pseudomonas fluorescens*'in Real-Time PCR ile tanısı



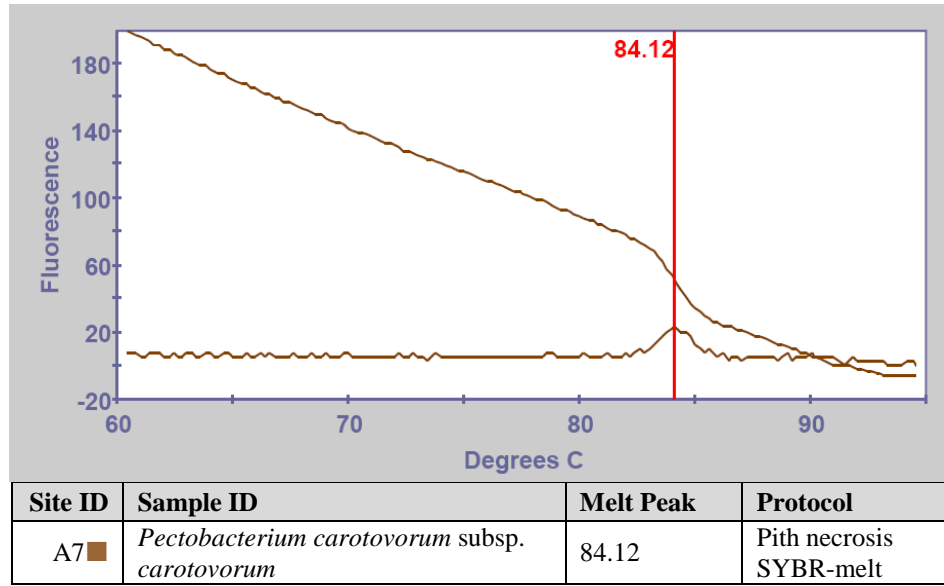
Şekil 4.7. *Pseudomonas mediterranea*'nin Real-Time PCR ile tanısı



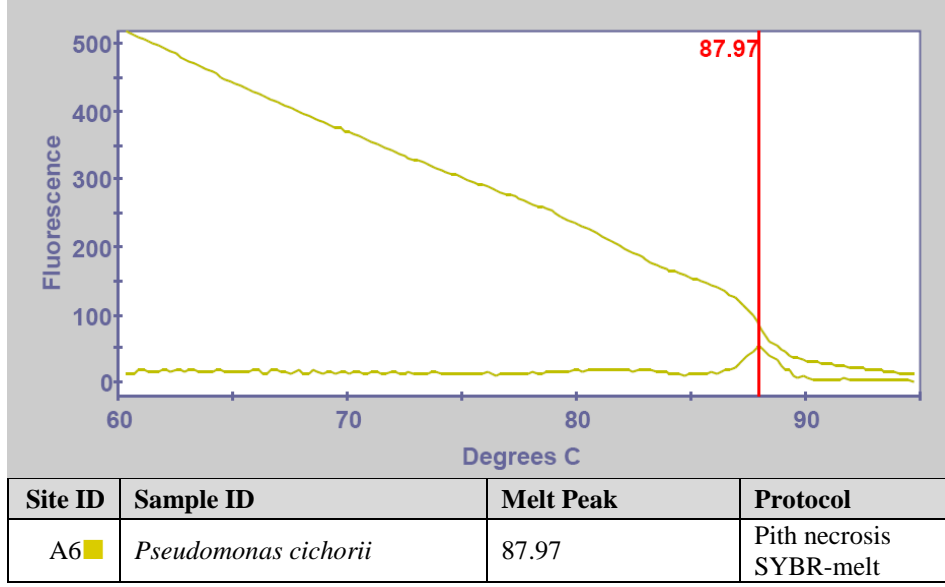
Şekil 4.8. *Pseudomonas viridiflava*'nin Real-Time PCR ile tanısı



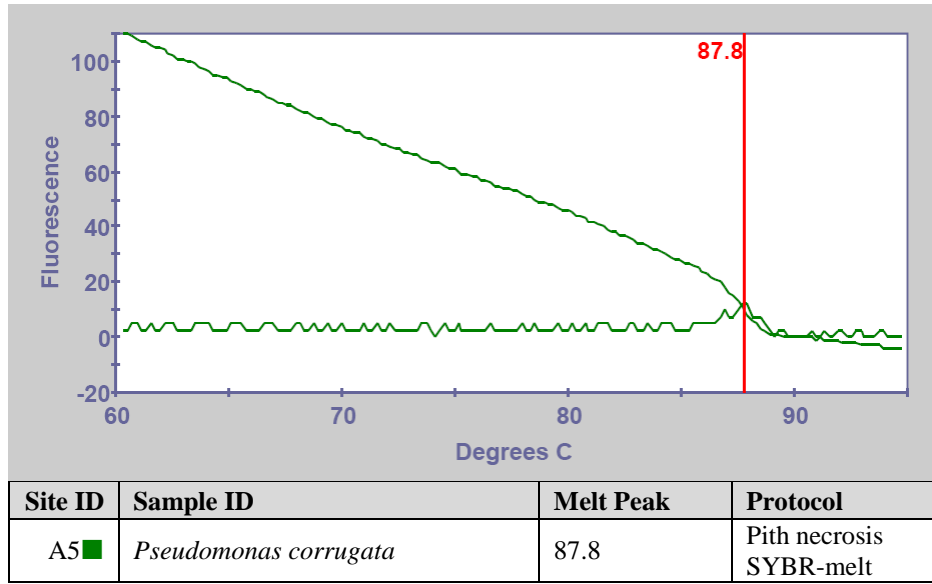
Şekil 4.9. *Dickeya chrysanthemi*'nin SYBR Green-melt grafiği



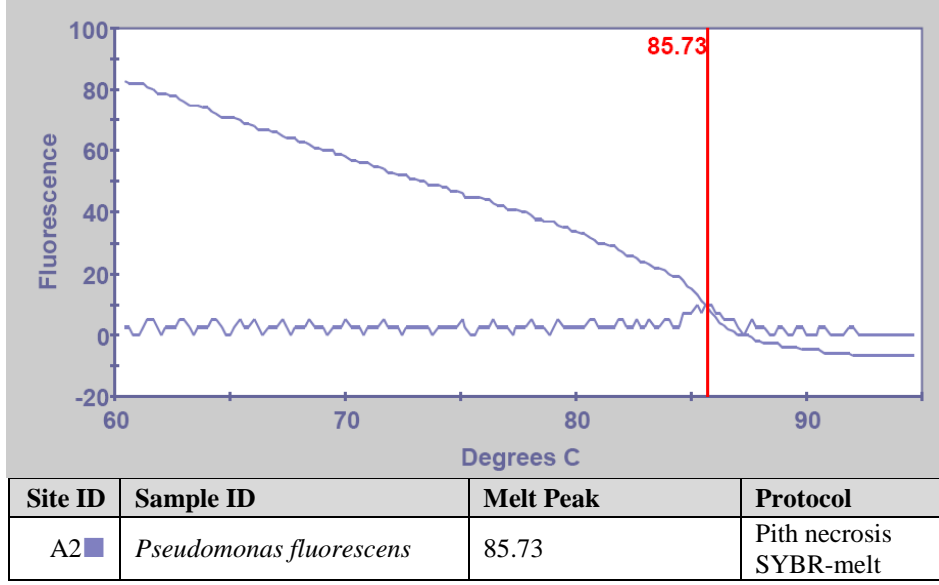
Şekil 4.10. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*'un SYBR Green-melt grafiği



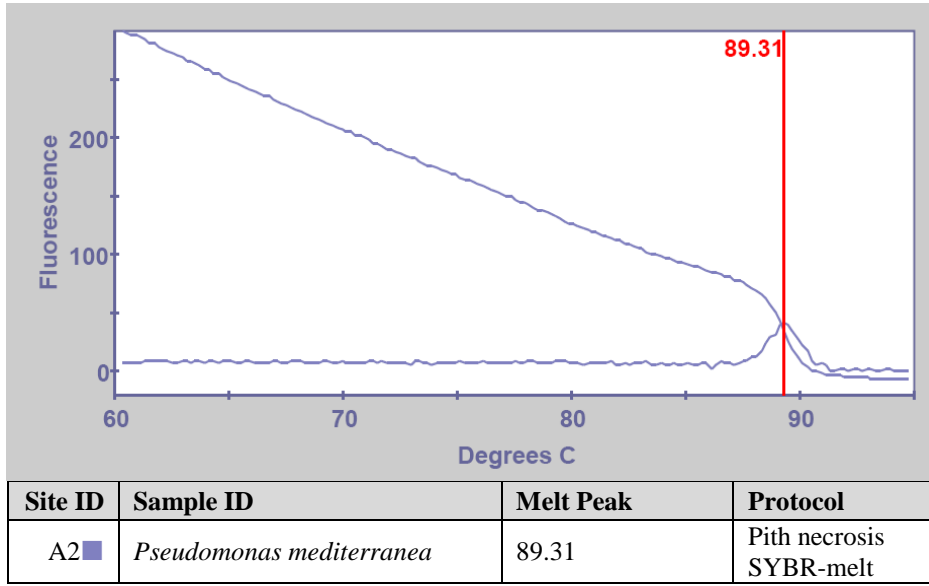
Şekil 4.11. *Pseudomonas cichorii*'nin SYBR Green-melt grafiği



Şekil 4.12. *Pseudomonas corrugata*'nın SYBR Green-melt grafiği

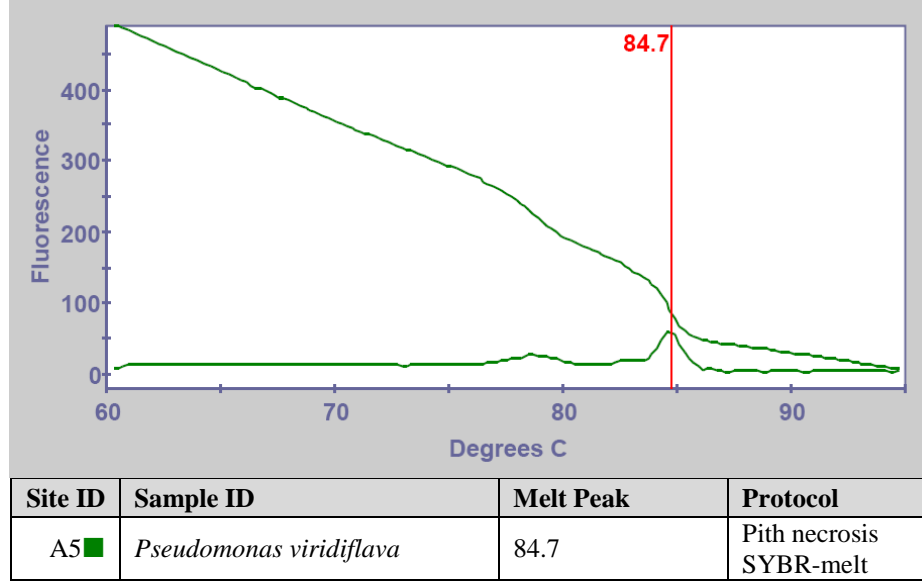


Şekil 4.13. *Pseudomonas fluorescens*'in SYBR Green-melt grafiği



Şekil 4.14. *Pseudomonas mediterranea*'nın SYBR Green-melt grafiği

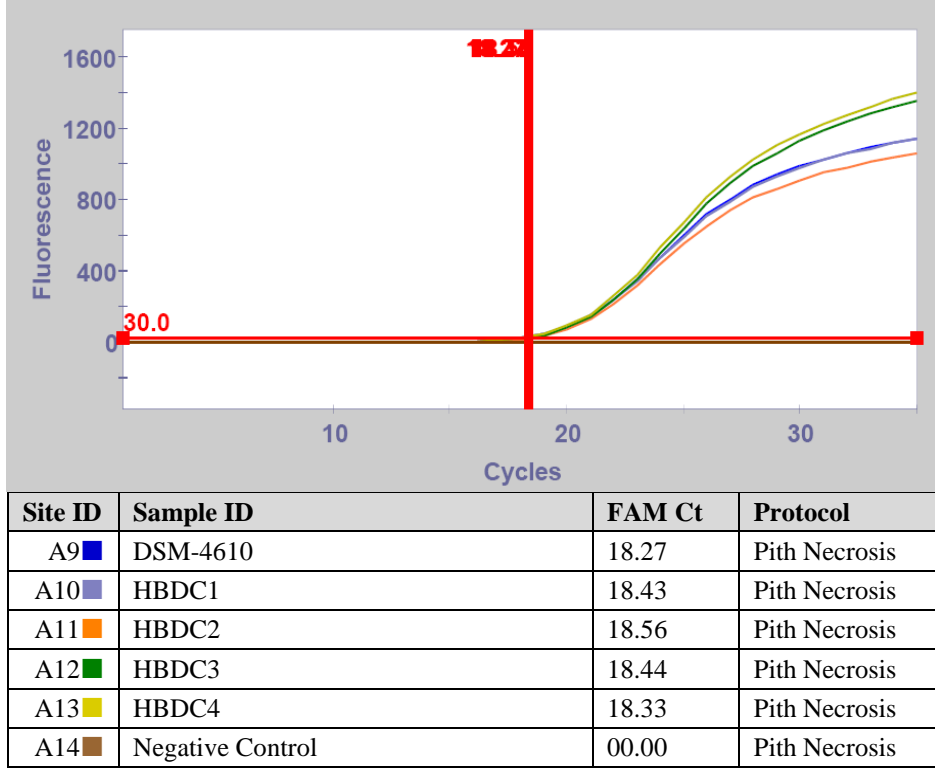




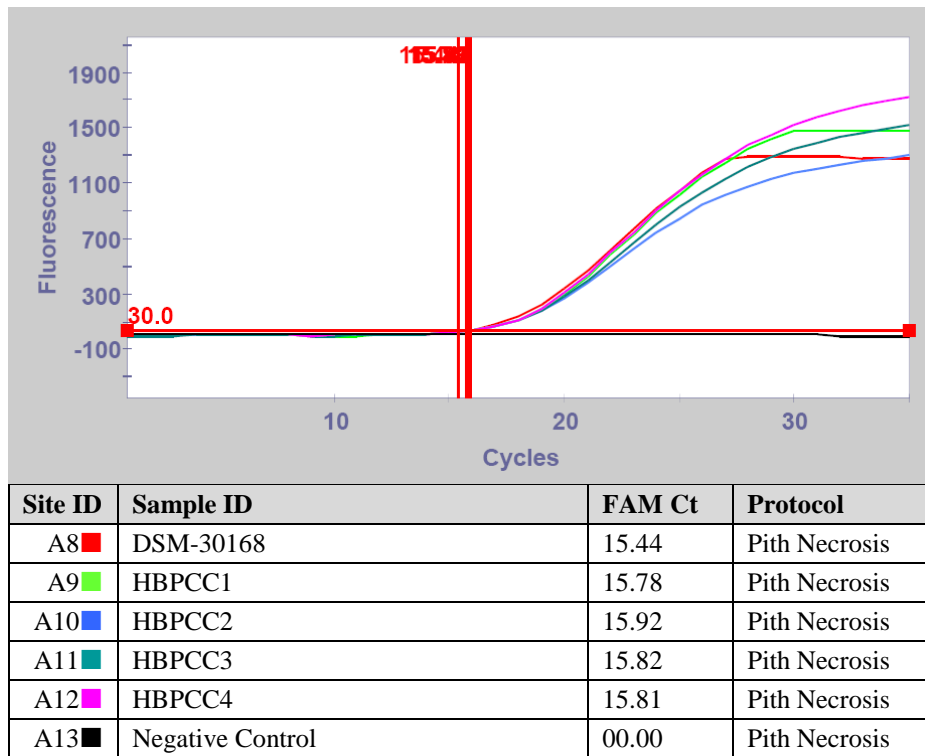
Şekil 4.15. *Pseudomonas viridiflava*'nın SYBR Green-melt grafiği

#### 4.3. Real-Time PCR ile *Dickeya chrysanthemi*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pseudomonas cichorii*, *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mediterranea* ve *Pseudomonas viridiflava* Strainlerinin Tanısı

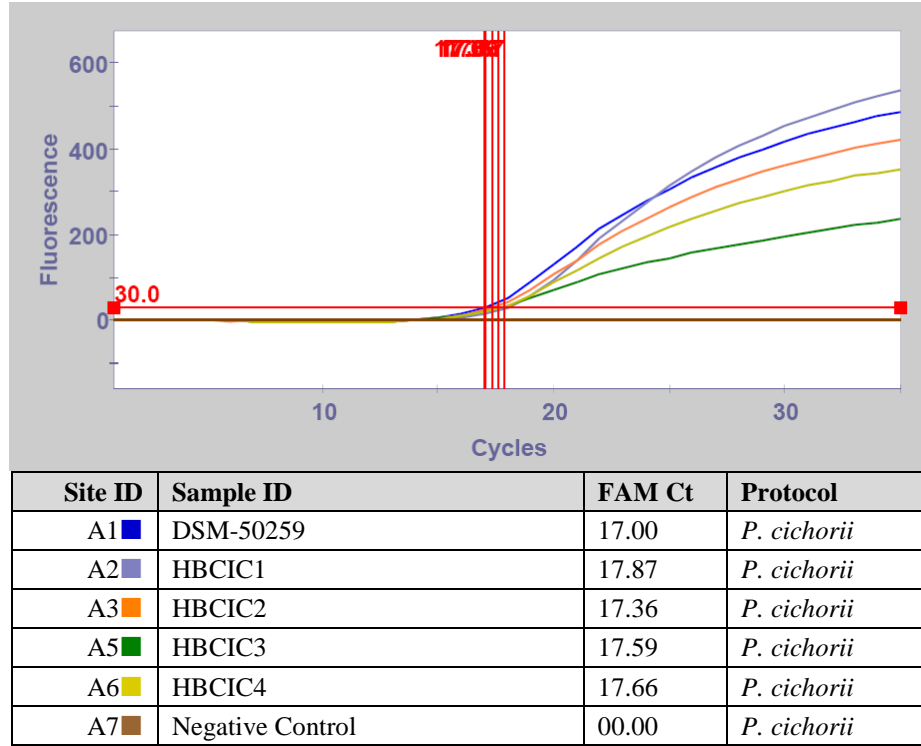
*Dickeya chrysanthemi*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pseudomonas cichorii*, *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mediterranea* ve *Pseudomonas viridiflava*'nın Real-Time PCR ile tanısını gerçekleştirmek için kültür koleksiyonunda yer alan yerli ve yabancı *Dickeya chrysanthemi*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pseudomonas cichorii*, *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mediterranea* ve *Pseudomonas viridiflava* strainleri kullanılarak primerler ve problemlerin strainlere spesifikliği test edilmiştir. Tasarlanan primerler ve problemlerin *Dickeya chrysanthemi*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pseudomonas cichorii*, *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mediterranea* ve *Pseudomonas viridiflava*'nın farklı strainlerine de spesifik olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.16, Şekil 4.17, Şekil 4.18, Şekil 4.19, Şekil 4.20, Şekil 4.21, Şekil 4.22).



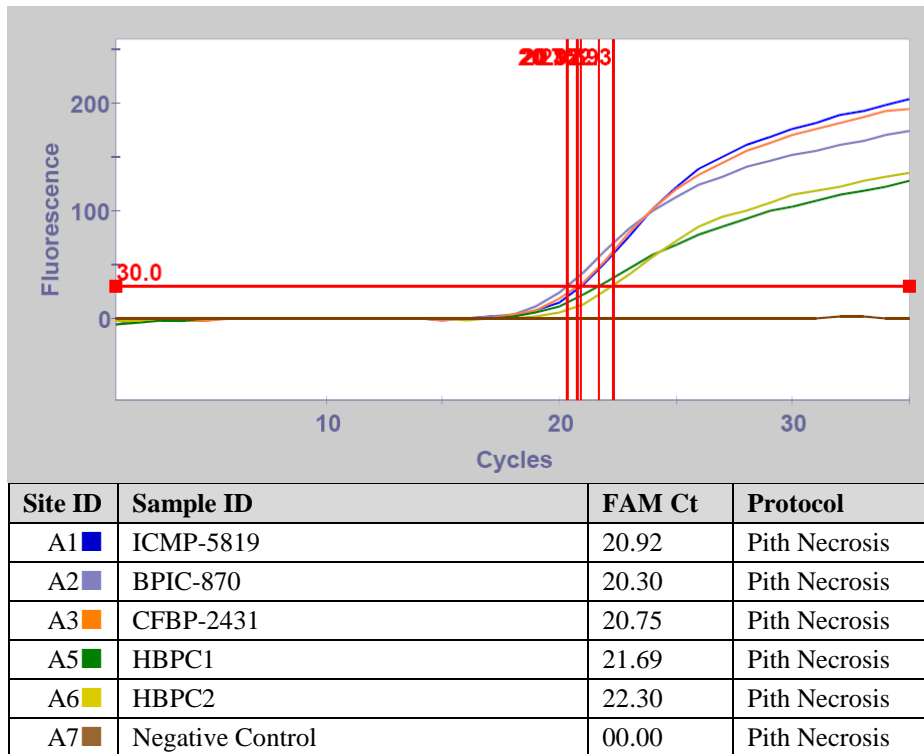
Şekil 4.16. *Dickeya chrysanthemi* Strainlerinin Real-Time PCR ile tanısı



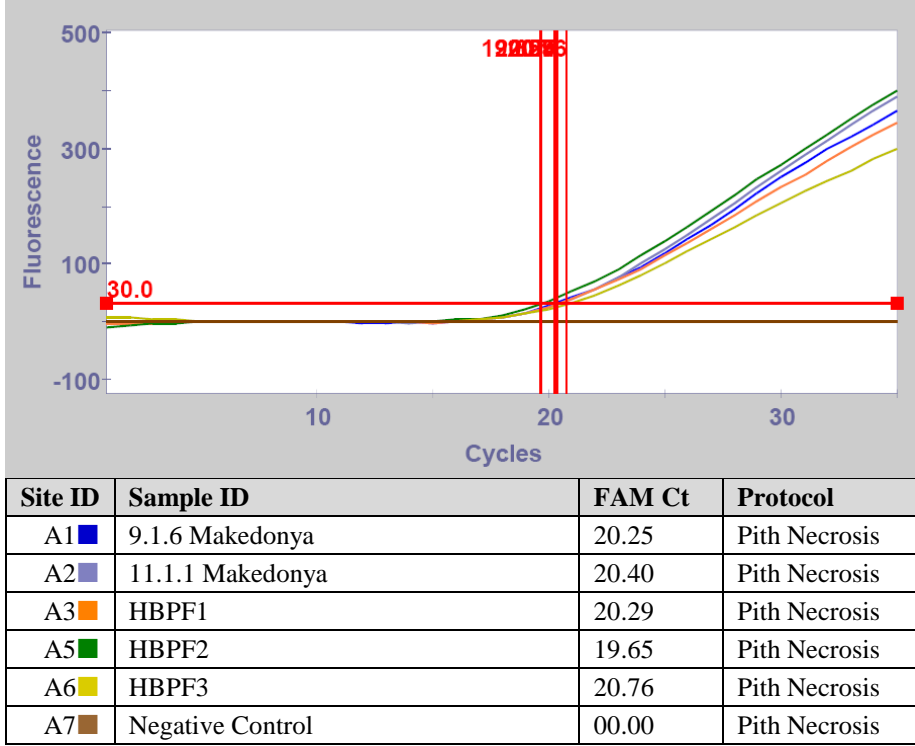
Şekil 4.17. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* Strainlerinin Real-Time PCR ile tanısı



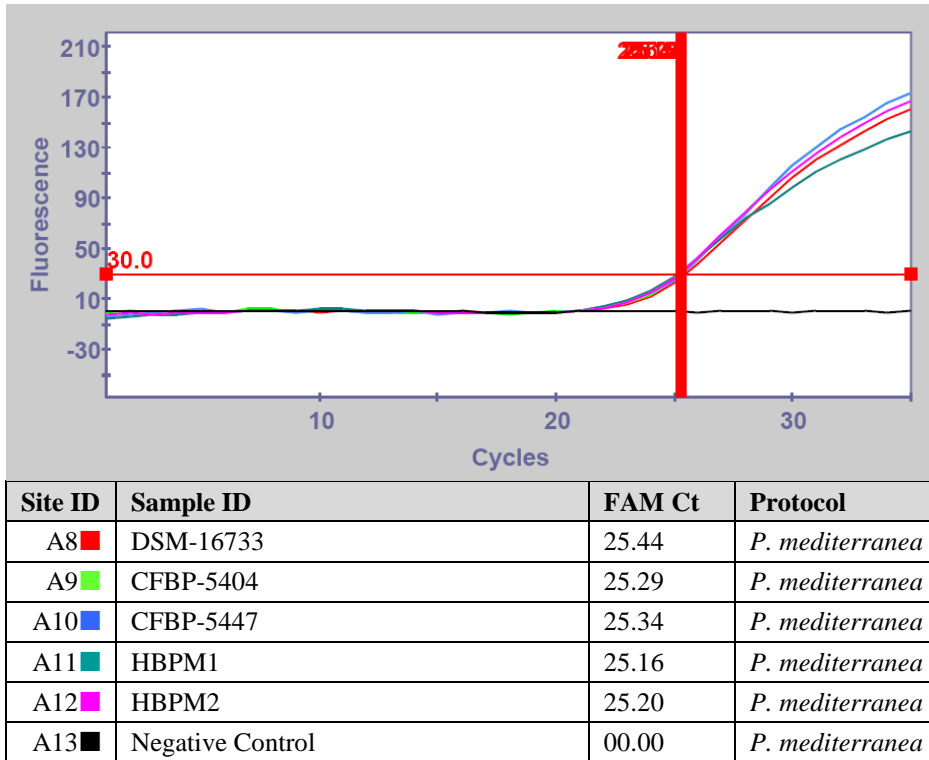
Şekil 4.18. *Pseudomonas cichorii* Strainlerinin Real-Time PCR ile tanısı



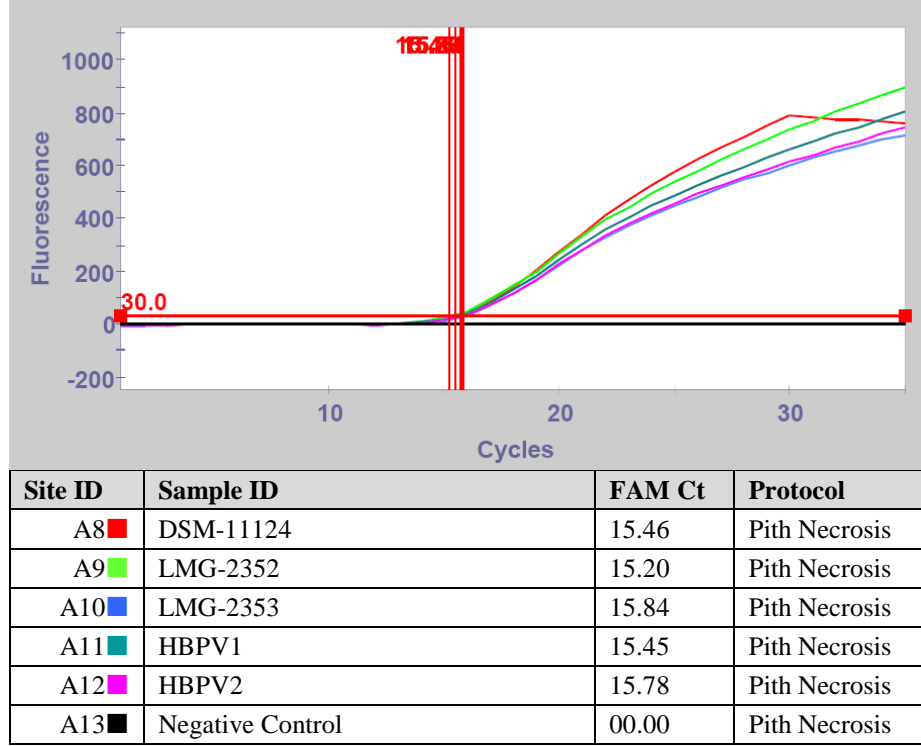
Şekil 4.19. *Pseudomonas corrugata* Strainlerinin Real-Time PCR ile tanısı



Şekil 4.20. *Pseudomonas fluorescens* Strainlerinin Real-Time PCR ile tanısı



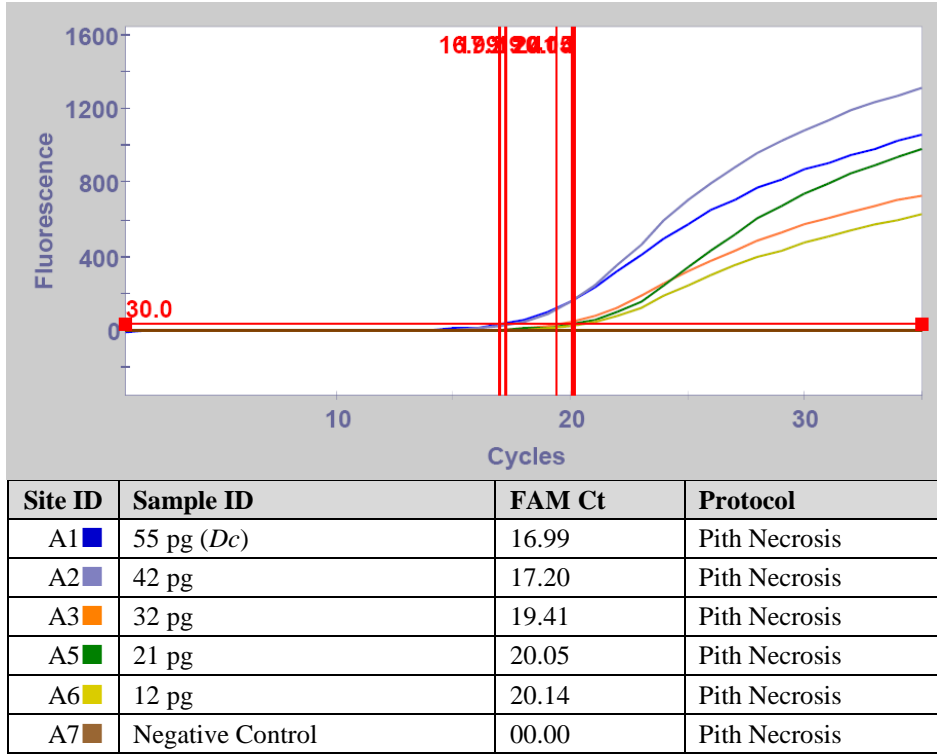
Şekil 4.21. *Pseudomonas mediterranea* Strainlerinin Real-Time PCR ile tanısı



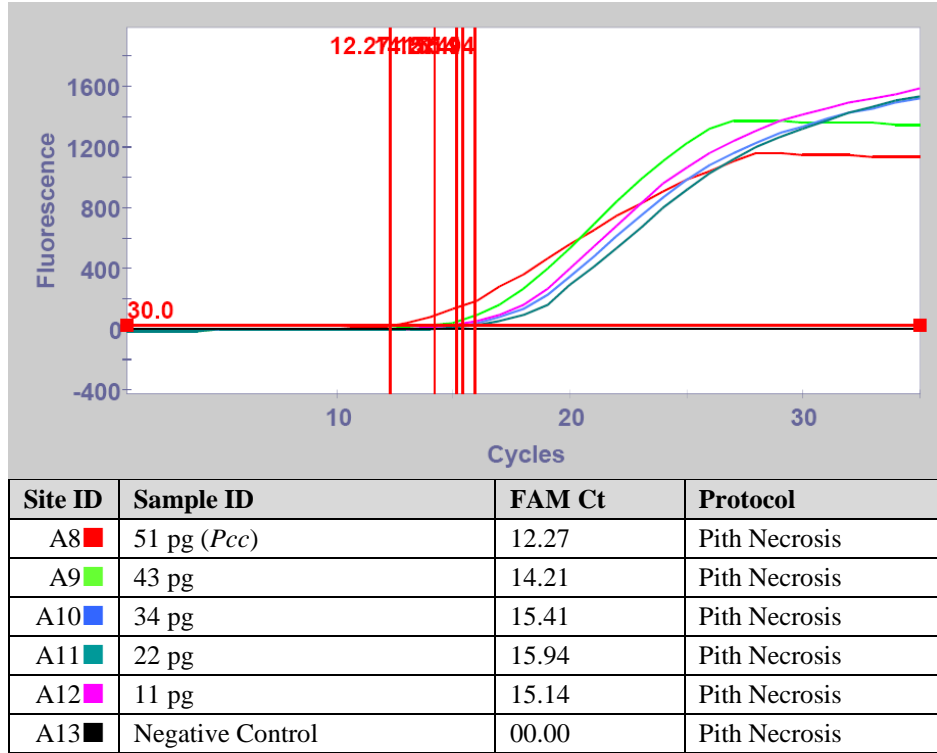
Şekil 4.22. *Pseudomonas viridiflava* Strainlerinin Real-Time PCR ile tanısı

#### 4.4. Primerler ve Probların Saf DNA'dan Hassasiyeti

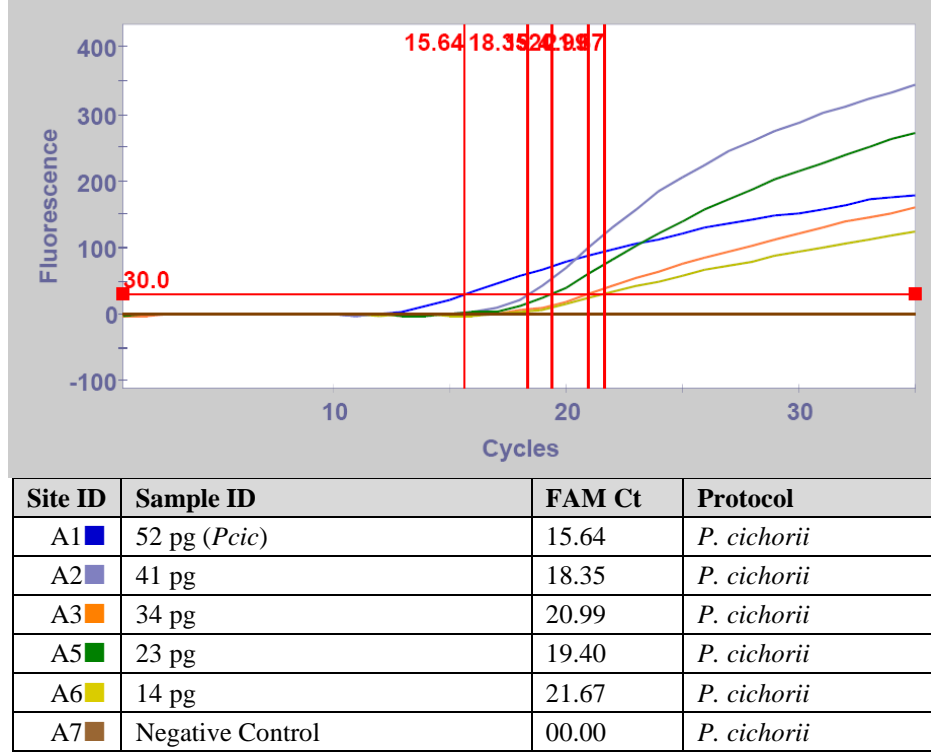
Real-Time PCR ile primerler ve probların genomik DNA'dan hassasiyetini belirlemek için *Dickeya chrysanthemi*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pseudomonas cichorii*, *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mediterranea* ve *Pseudomonas viridiflava*'dan izole edilen genomik DNA'nın önce nanogram düzeyinde devamında pikogram düzeyinde ölçümleri yapılmıştır. Pikogram düzeyindeki ölçümlerde yaklaşık 50 pg, 40 pg, 30 pg, 20 pg ve 10 pg olacak şekilde seyreltmeler yapılmıştır. Yapılan çalışma sonucunda patojenlerin tespitinde kullanılan primer ve prob setlerinin genomik DNA'dan tespit limiti *Dickeya chrysanthemi* için 12 pg, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* için 11 pg, *Pseudomonas cichorii* için 14 pg, *Pseudomonas corrugata* için 14 pg, *Pseudomonas fluorescens* için 14 pg, *Pseudomonas mediterranea* için 13 pg ve *Pseudomonas viridiflava* için 12 pg olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.23, Şekil 4.24, Şekil 4.25, Şekil 4.26, Şekil 4.27, Şekil 4.28, Şekil 4.29).



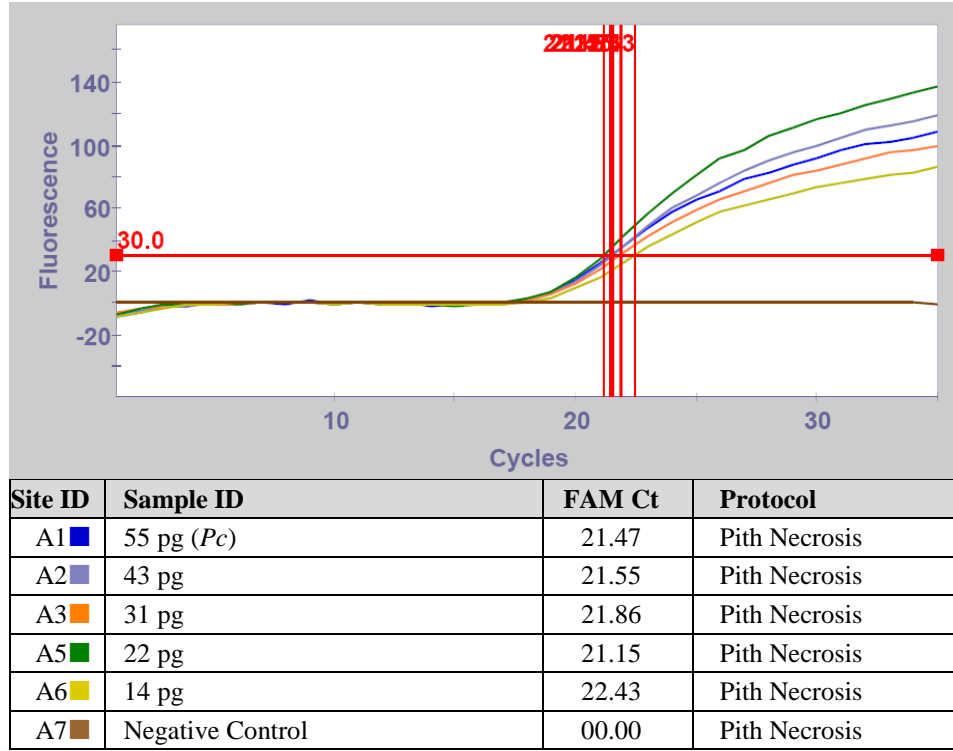
Şekil 4.23. *Dickeya chrysanthemi*'nin tespitinde kullanılan primer ve prob setinin saf DNA'dan hassasiyeti



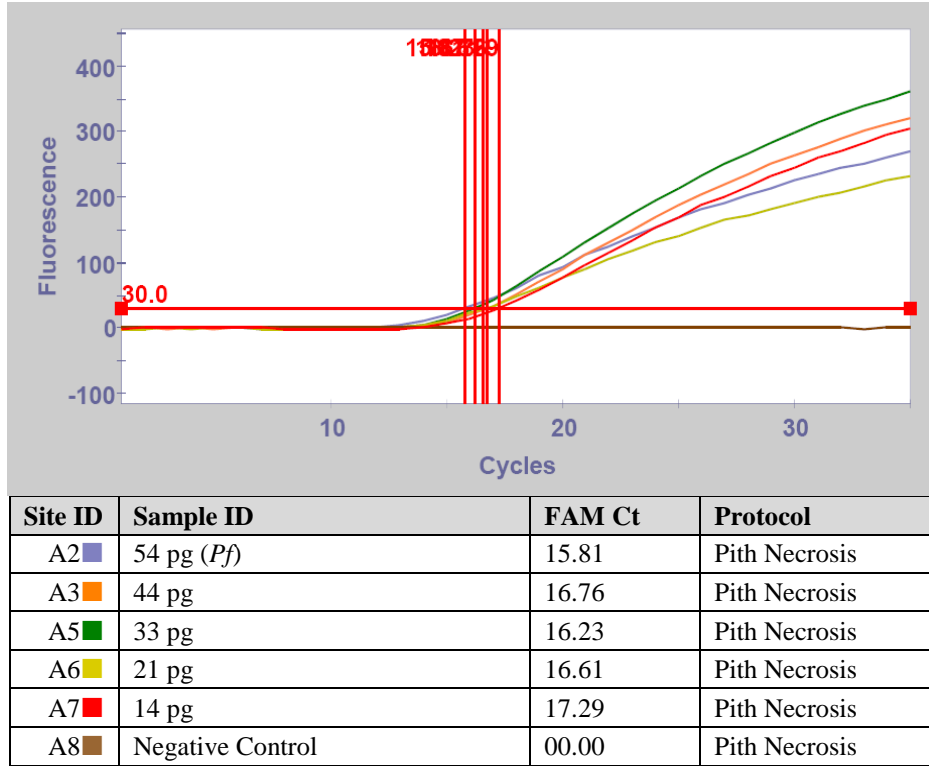
Şekil 4.24. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*'un tespitinde kullanılan primer ve prob setinin saf DNA'dan hassasiyeti



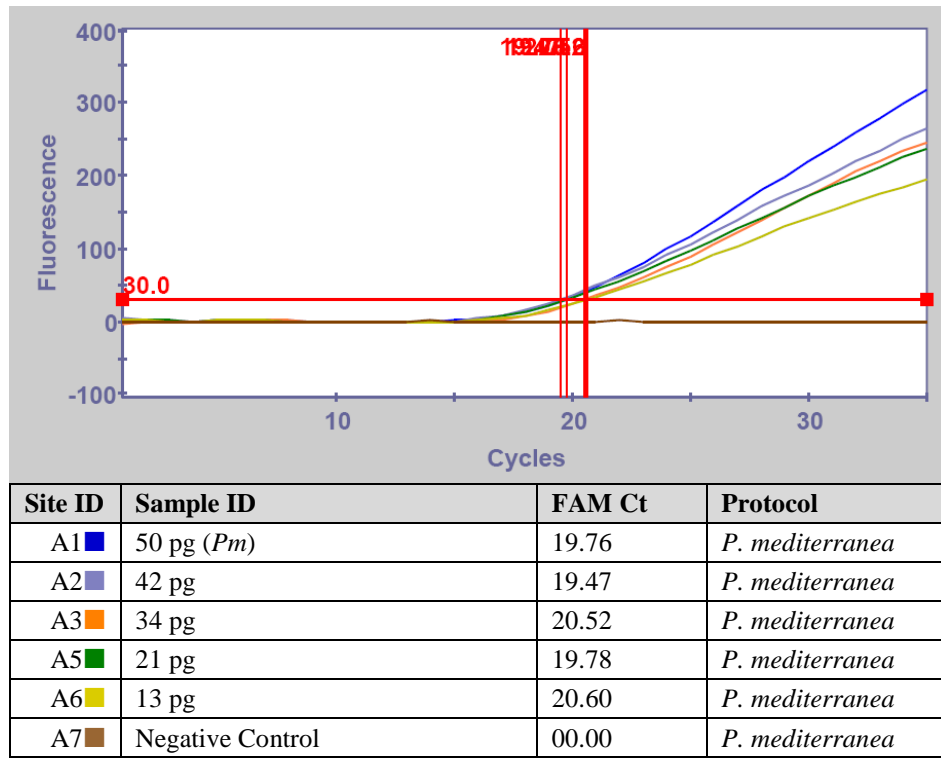
Şekil 4.25. *Pseudomonas cichorii*'nin tespitinde kullanılan primer ve prob setinin saf DNA'dan hassasiyeti



Şekil 4.26. *Pseudomonas corrugata*'nın tespitinde kullanılan primer ve prob setinin saf DNA'dan hassasiyeti

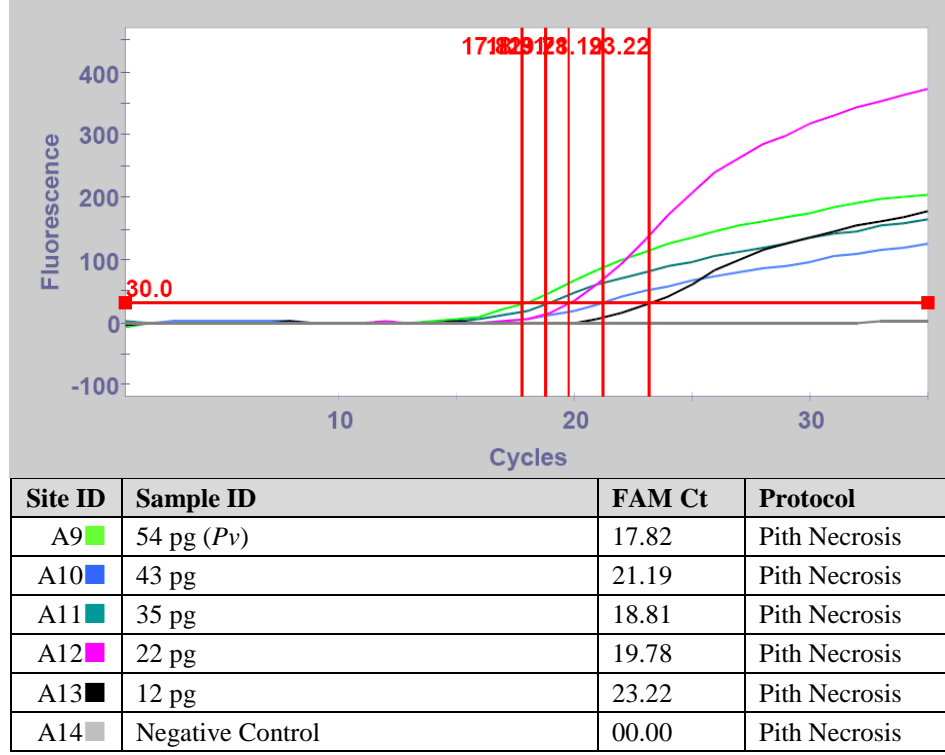


Şekil 4.27. *Pseudomonas fluorescens*'in tespitinde kullanılan primer ve prob setinin saf DNA'dan hassasiyeti



Şekil 4.28. *Pseudomonas mediterranea*'nın tespitinde kullanılan primer ve prob setinin saf DNA'dan hassasiyeti





Şekil 4.29. *Pseudomonas viridiflava*'nın tespitinde kullanılan primer ve prob setinin saf DNA'dan hassasiyeti

#### 4.5. Direkt Bakteriden Primerler ve Probların Hassasiyeti

Direkt bakteriden yapılan hassasiyet çalışmasında çalışma sonucunda, Real-Time PCR ile *Dickeya chrysanthemi*'nin direkt bakteriyel hücreden tespit limiti 2 hücre olarak bulunurken *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*'un 4 hücre, *Pseudomonas cichorii*'nin 4 hücre, *Pseudomonas corrugata*'nın 4 hücre, *Pseudomonas fluorescens*'in 5 hücre, *Pseudomonas mediterranea*'nın 5 hücre ve *Pseudomonas viridiflava*'nın 2 hücre (Çizelge 4.1, Çizelge 4.2, Çizelge 4.3, Çizelge 4.4, Çizelge 4.5, Çizelge 4.6, Çizelge 4.7) olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.32, Şekil 4.33, Şekil 4.34, Şekil 4.35, Şekil 4.36, Şekil 4.37, Şekil 4.38).

Bu işleme eş zamanlı olarak NA besisi ortamına yapılan inokülasyon sonrası *Dickeya chrysanthemi*'nin tespit limiti mililitrede 2 canlı bakteri hücresi, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*'un 4, *Pseudomonas cichorii*'nin 4, *Pseudomonas corrugata*'nın 4, *Pseudomonas fluorescens*'in 5, *Pseudomonas mediterranea*'nın 5 ve *Pseudomonas viridiflava*'nın 2 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.30, Şekil 4.31).

Çizelge 4.1. Real-Time PCR ile *Dickeya chrysanthemi*'nin direkt bakteriyel hücreden tespiti ve hassasiyet limitlerinin belirlenmesi

Konsantrasyon	RT-PCR Sonucu FAM (Ct)		Bakteri sayıları (cfu/ml)				
	<i>Dickeya chrysanthemi</i>	<i>Dickeya chrysanthemi</i>	$\bar{x}$	std	P/N		
Stok	15.47	*	*	*	-	-	+
10 <sup>-1</sup>	17.71	*	*	*	-	-	+
10 <sup>-2</sup>	20.25	*	*	*	-	-	+
10 <sup>-3</sup>	19.93	*	*	*	-	-	+
10 <sup>-4</sup>	20.36	<b>1100</b>	<b>1108</b>	<b>1104</b>	<b>1104</b>	<b>3.26</b>	+
10 <sup>-5</sup>	19.80	<b>176</b>	<b>182</b>	<b>178</b>	<b>178.6</b>	<b>2.49</b>	+
10 <sup>-6</sup>	20.16	<b>10</b>	<b>15</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>2.16</b>	+
10 <sup>-7</sup>	20.09	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>1.6</b>	<b>0.47</b>	+
10 <sup>-8</sup>	00.00	0	0	0	0	0	-
10 <sup>-9</sup>	00.00	0	0	0	0	0	-
10 <sup>-10</sup>	00.00	0	0	0	0	0	-
<b>Negatif Kontrol</b>	00.00	0	0	0	0	0	-

\*: Petride yoğun bakteri gelişimi nedeniyle sayılamadı

std: Standart sapma

P/N: Pozitif/Negatif

$\bar{x}$ : Aritmetik ortalama

Çizelge 4.2. Real-Time PCR ile *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*'un direkt bakteriyel hücreden tespiti ve hassasiyet limitlerinin belirlenmesi

Konsantrasyon	RT-PCR Sonucu FAM (Ct)		Bakteri sayıları (cfu/ml)				
	<i>P. carotovorum</i> <i>carotovorum</i>	subsp. <i>P. carotovorum</i> <i>carotovorum</i>	$\bar{x}$	std	P/N		
Stok	13.36	*	*	*	-	-	+
10 <sup>-1</sup>	16.16	*	*	*	-	-	+
10 <sup>-2</sup>	17.43	*	*	*	-	-	+
10 <sup>-3</sup>	17.44	*	*	*	-	-	+
10 <sup>-4</sup>	17.60	<b>1435</b>	<b>1431</b>	<b>1439</b>	<b>1435</b>	<b>3.31</b>	+
10 <sup>-5</sup>	17.53	<b>152</b>	<b>145</b>	<b>150</b>	<b>149</b>	<b>2.94</b>	+
10 <sup>-6</sup>	17.78	<b>24</b>	<b>20</b>	<b>25</b>	<b>23</b>	<b>2.16</b>	+
10 <sup>-7</sup>	17.60	<b>5</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4.3</b>	<b>0.47</b>	+
10 <sup>-8</sup>	00.00	0	0	0	0	0	-
10 <sup>-9</sup>	00.00	0	0	0	0	0	-
10 <sup>-10</sup>	00.00	0	0	0	0	0	-
<b>Negatif Kontrol</b>	00.00	0	0	0	0	0	-

\*: Petride yoğun bakteri gelişimi nedeniyle sayılamadı

std: Standart sapma

P/N: Pozitif/Negatif

$\bar{x}$ : Aritmetik ortalama

Çizelge 4.3. Real-Time PCR ile *Pseudomonas cichorii*'nin direkt bakteriyel hücreden tespiti ve hassasiyet limitlerinin belirlenmesi

Konsantrasyon	RT-PCR Sonucu	Bakteri sayıları (cfu/ml)					
	FAM (Ct)	<i>Pseudomonas cichorii</i>	<i>Pseudomonas cichorii</i>	<i>Pseudomonas cichorii</i>	$\bar{x}$	std	P/N
Stok	18.19	*	*	*	-	-	+
10 <sup>-1</sup>	20.75	*	*	*	-	-	+
10 <sup>-2</sup>	27.83	*	*	*	-	-	+
10 <sup>-3</sup>	23.54	*	*	*	-	-	+
10 <sup>-4</sup>	30.59	2145	2138	2150	2144.3	4.92	+
10 <sup>-5</sup>	22.64	267	253	265	261.7	6.18	+
10 <sup>-6</sup>	23.20	26	25	28	26.3	4.67	+
10 <sup>-7</sup>	31.86	4	4	5	4.3	0.47	+
10 <sup>-8</sup>	00.00	0	0	0	0	0	-
10 <sup>-9</sup>	00.00	0	0	0	0	0	-
10 <sup>-10</sup>	00.00	0	0	0	0	0	-
<b>Negatif Kontrol</b>	00.00	0	0	0	0	0	-

\*: Petride yoğun bakteri gelişimi nedeniyle sayılamadı

std: Standart sapma

P/N: Pozitif/Negatif

$\bar{x}$ : Aritmetik ortalama

Çizelge 4.4. Real-Time PCR ile *Pseudomonas corrugata*'nın direkt bakteriyel hücreden tespiti ve hassasiyet limitlerinin belirlenmesi

Konsantrasyon	RT-PCR Sonucu	Bakteri sayıları (cfu/ml)					
	FAM (Ct)	<i>Pseudomonas corrugata</i>	<i>Pseudomonas corrugata</i>	<i>Pseudomonas corrugata</i>	$\bar{x}$	std	P/N
Stok	21.87	*	*	*	-	-	+
10 <sup>-1</sup>	22.12	*	*	*	-	-	+
10 <sup>-2</sup>	22.61	*	*	*	-	-	+
10 <sup>-3</sup>	24.70	*	*	*	-	-	+
10 <sup>-4</sup>	22.93	917	922	913	917.3	3.68	+
10 <sup>-5</sup>	22.92	95	98	92	95	2.44	+
10 <sup>-6</sup>	22.41	18	21	15	18	2.44	+
10 <sup>-7</sup>	22.78	4	5	4	4.3	0.47	+
10 <sup>-8</sup>	00.00	0	0	0	0	0	-
10 <sup>-9</sup>	00.00	0	0	0	0	0	-
10 <sup>-10</sup>	00.00	0	0	0	0	0	-
<b>Negatif Kontrol</b>	00.00	0	0	0	0	0	-

\*: Petride yoğun bakteri gelişimi nedeniyle sayılamadı

std: Standart sapma

P/N: Pozitif/Negatif

$\bar{x}$ : Aritmetik ortalama

Çizelge 4.5. Real-Time PCR ile *Pseudomonas fluorescens*'in direkt bakteriyel hücreden tespiti ve hassasiyet limitlerinin belirlenmesi

Konsantrasyon	RT-PCR Sonucu	Bakteri sayıları (cfu/ml)					
	FAM (Ct)	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	$\bar{x}$	std	P/N	
Stok	00.00	*	*	*	-	-	-
10 <sup>-1</sup>	15.50	*	*	*	-	-	+
10 <sup>-2</sup>	16.61	*	*	*	-	-	+
10 <sup>-3</sup>	16.84	*	*	*	-	-	+
10 <sup>-4</sup>	17.68	2440	2421	2433	2431.3	7.84	+
10 <sup>-5</sup>	17.60	354	348	357	353	3.74	+
10 <sup>-6</sup>	16.73	42	36	47	41.6	4.49	+
10 <sup>-7</sup>	17.89	5	4	5	4.6	0.48	+
10 <sup>-8</sup>	00.00	0	0	0	0	0	-
10 <sup>-9</sup>	00.00	0	0	0	0	0	-
10 <sup>-10</sup>	00.00	0	0	0	0	0	-
<b>Negatif Kontrol</b>	00.00	0	0	0	0	0	-

\*: Petride yoğun bakteri gelişimi nedeniyle sayılamadı

std: Standart sapma

P/N: Pozitif/Negatif

$\bar{x}$ : Aritmetik ortalama

Çizelge 4.6. Real-Time PCR ile *Pseudomonas mediterranea*'nın direkt bakteriyel hücreden tespiti ve hassasiyet limitlerinin belirlenmesi

Konsantrasyon	RT-PCR Sonucu	Bakteri sayıları (cfu/ml)					
	FAM (Ct)	<i>Pseudomonas mediterranea</i>	<i>Pseudomonas mediterranea</i>	$\bar{x}$	std	P/N	
Stok	24.63	*	*	*	-	-	+
10 <sup>-1</sup>	24.29	*	*	*	-	-	+
10 <sup>-2</sup>	25.24	*	*	*	-	-	+
10 <sup>-3</sup>	24.37	*	*	*	-	-	+
10 <sup>-4</sup>	25.68	1987	1979	1985	1983	3.46	+
10 <sup>-5</sup>	25.19	214	211	220	215	3.74	+
10 <sup>-6</sup>	24.73	27	24	31	27.3	2.86	+
10 <sup>-7</sup>	24.83	5	5	6	5.3	0.47	+
10 <sup>-8</sup>	00.00	0	0	0	0	0	-
10 <sup>-9</sup>	00.00	0	0	0	0	0	-
10 <sup>-10</sup>	00.00	0	0	0	0	0	-
<b>Negatif Kontrol</b>	00.00	0	0	0	0	0	-

\*: Petride yoğun bakteri gelişimi nedeniyle sayılamadı

std: Standart sapma

P/N: Pozitif/Negatif

$\bar{x}$ : Aritmetik ortalama

Çizelge 4.7. Real-Time PCR ile *Pseudomonas viridiflava*'nın direkt bakteriyel hücreden tespiti ve hassasiyet limitlerinin belirlenmesi

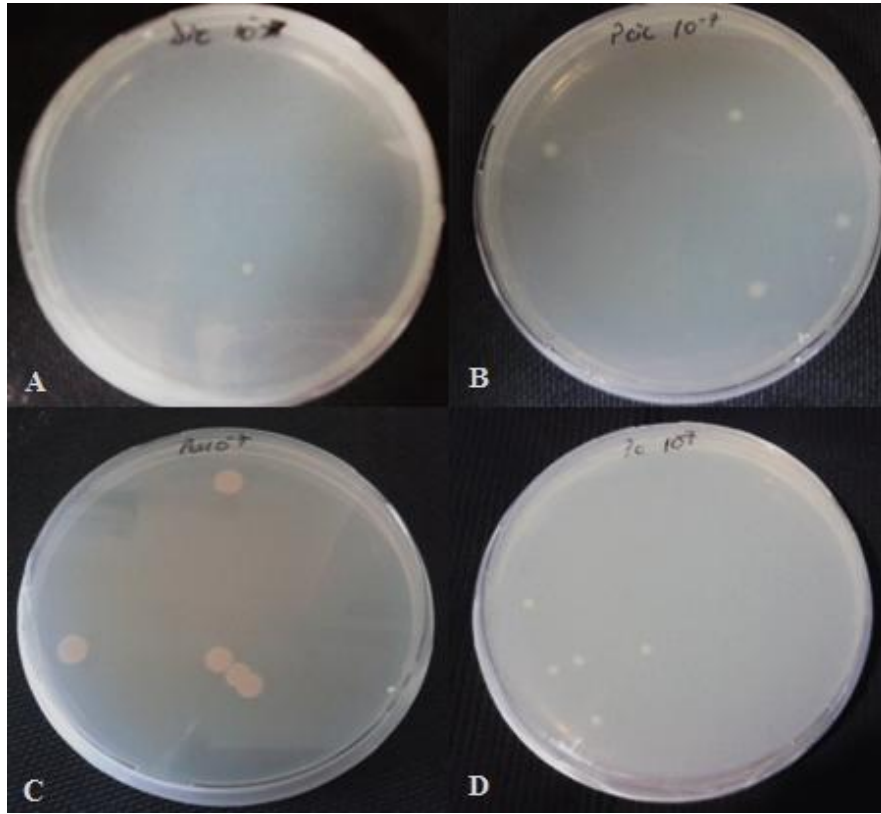
Konsantrasyon	RT-PCR Sonucu	Bakteri sayıları (cfu/ml)					
	FAM (Ct)	<i>Pseudomonas viridiflava</i>		$\bar{x}$	std	P/N	
Stok	14.73	*	*	*	-	-	+
10 <sup>-1</sup>	16.96	*	*	*	-	-	+
10 <sup>-2</sup>	17.96	*	*	*	-	-	+
10 <sup>-3</sup>	23.93	*	*	*	-	-	+
10 <sup>-4</sup>	21.33	1015	1021	1025	1020.3	4.10	+
10 <sup>-5</sup>	21.36	127	131	134	130.6	3.04	+
10 <sup>-6</sup>	24.39	20	16	17	17.7	1.7	+
10 <sup>-7</sup>	21.47	2	1	2	1.6	0.47	+
10 <sup>-8</sup>	00.00	0	0	0	0	0	-
10 <sup>-9</sup>	00.00	0	0	0	0	0	-
10 <sup>-10</sup>	00.00	0	0	0	0	0	-
<b>Negatif Kontrol</b>	00.00	0	0	0	0	0	-

\*: Petride yoğun bakteri gelişimi nedeniyle sayılamadı

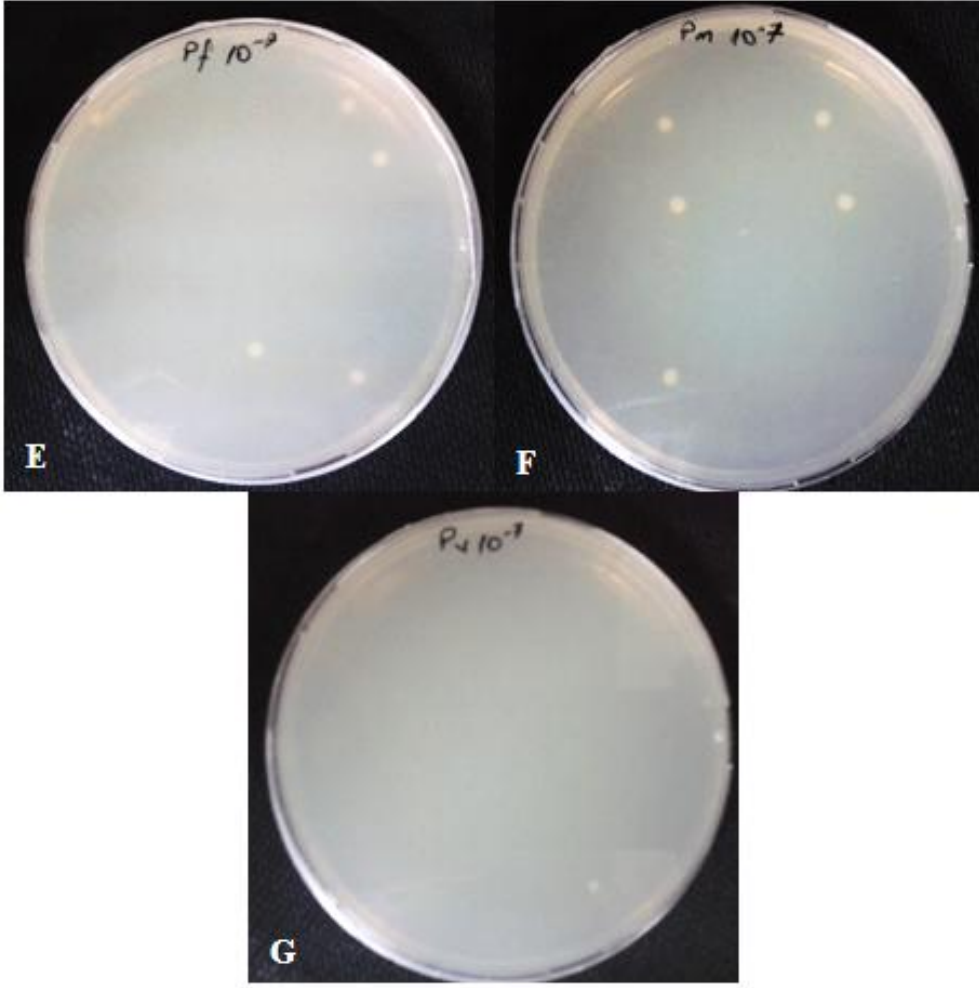
std: Standart sapma

P/N: Pozitif/Negatif

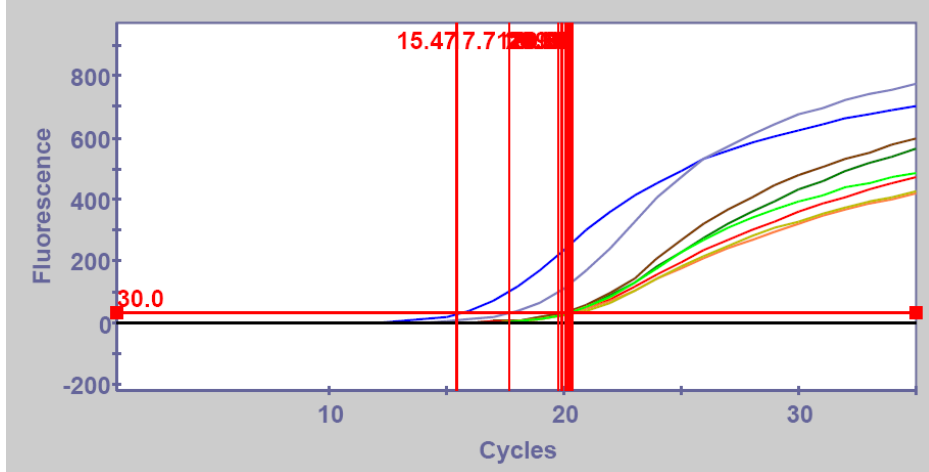
$\bar{x}$ : Aritmetik ortalama



Şekil 4.30. *Dickeya chrysanthemi* (A), *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (B), *Pseudomonas cichorii* (C), *Pseudomonas corrugata* (D) Bakteri hassasiyet çalışmasında NA besi ortamında 10<sup>-7</sup> seyreltmede tespit edilen en az bakterinin tespiti (Çizelge 4.1, Çizelge 4.2, Çizelge 4.3, Çizelge 4.4)

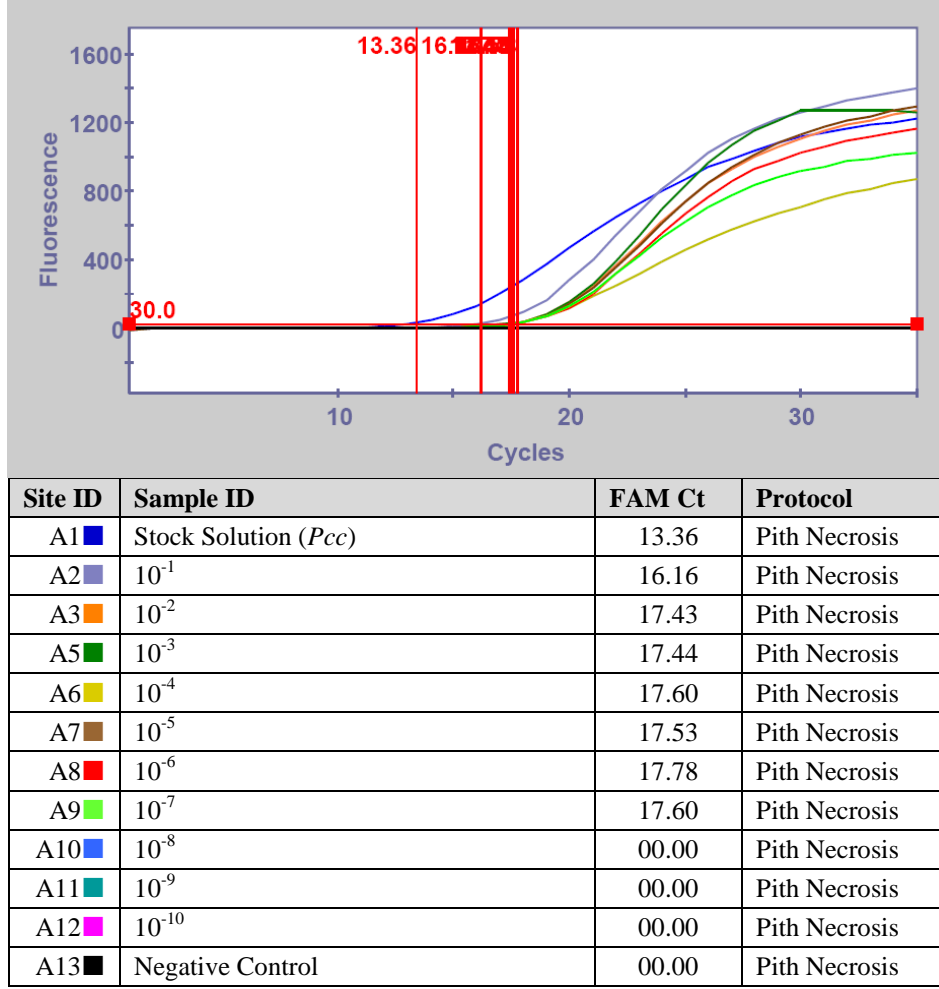


Şekil 4.31. *Pseudomonas fluorescens* (E), *Pseudomonas mediterranea* (F) ve *Pseudomonas viridiflava* (G) Bakteri hassasiyet çalışmasında NA besi ortamında  $10^{-7}$  seyreltmede tespit edilen en az bakterinin tespiti (Çizelge 4.5, Çizelge 4.6, Çizelge 4.7)



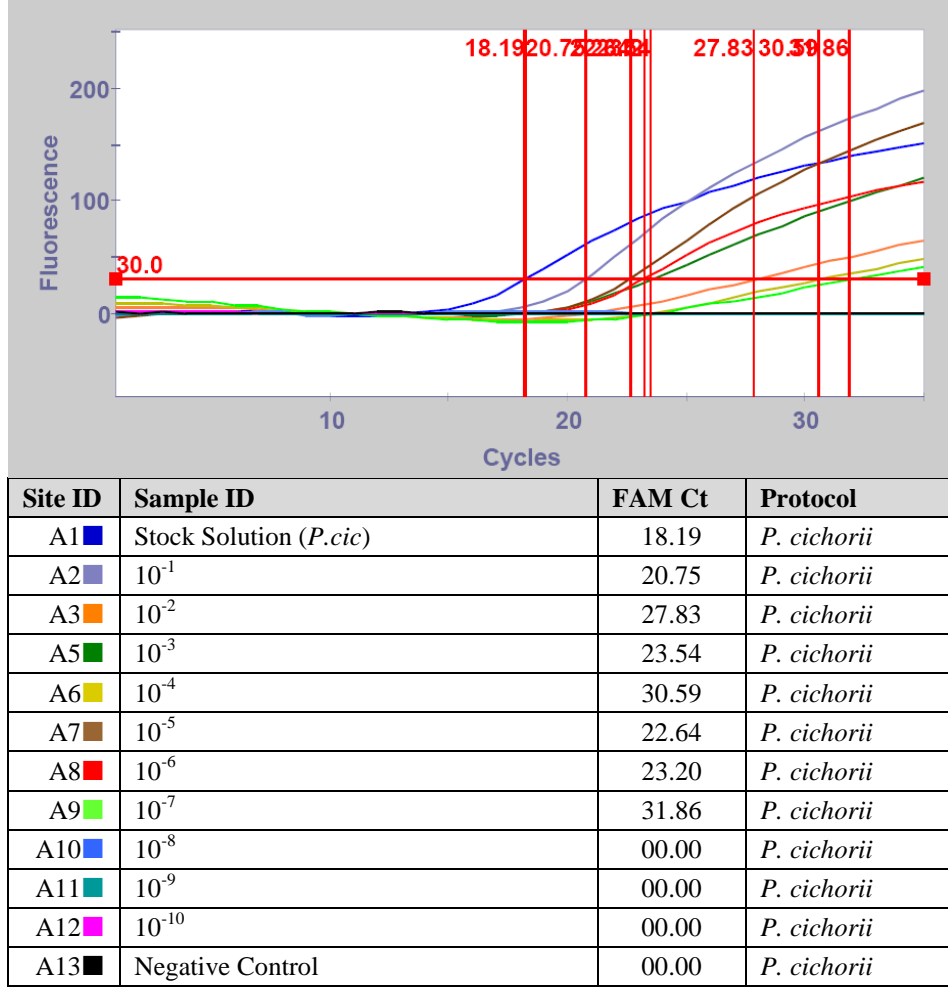
Site ID	Sample ID	FAM Ct	Protocol
A1	Stock Solution ( <i>Dc</i> )	15.47	Pith Necrosis
A2	$10^{-1}$	17.71	Pith Necrosis
A3	$10^{-2}$	20.25	Pith Necrosis
A5	$10^{-3}$	19.93	Pith Necrosis
A6	$10^{-4}$	20.36	Pith Necrosis
A7	$10^{-5}$	19.80	Pith Necrosis
A8	$10^{-6}$	20.16	Pith Necrosis
A9	$10^{-7}$	20.09	Pith Necrosis
A10	$10^{-8}$	00.00	Pith Necrosis
A11	$10^{-9}$	00.00	Pith Necrosis
A12	$10^{-10}$	00.00	Pith Necrosis
A13	Negative Control	00.00	Pith Necrosis

Şekil 4.32. *Dickeya chrysanthemi*'nin bakteri hassasiyet tespiti

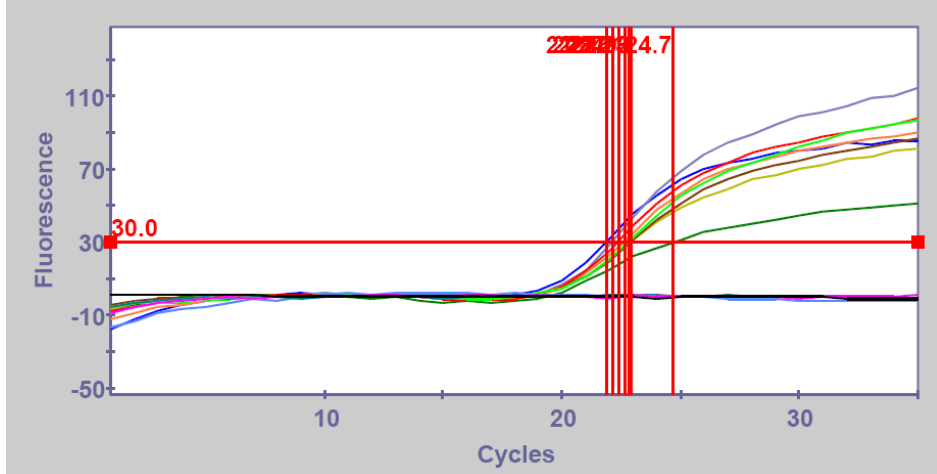


Şekil 4.33. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*'un bakteri hassasiyet tespiti



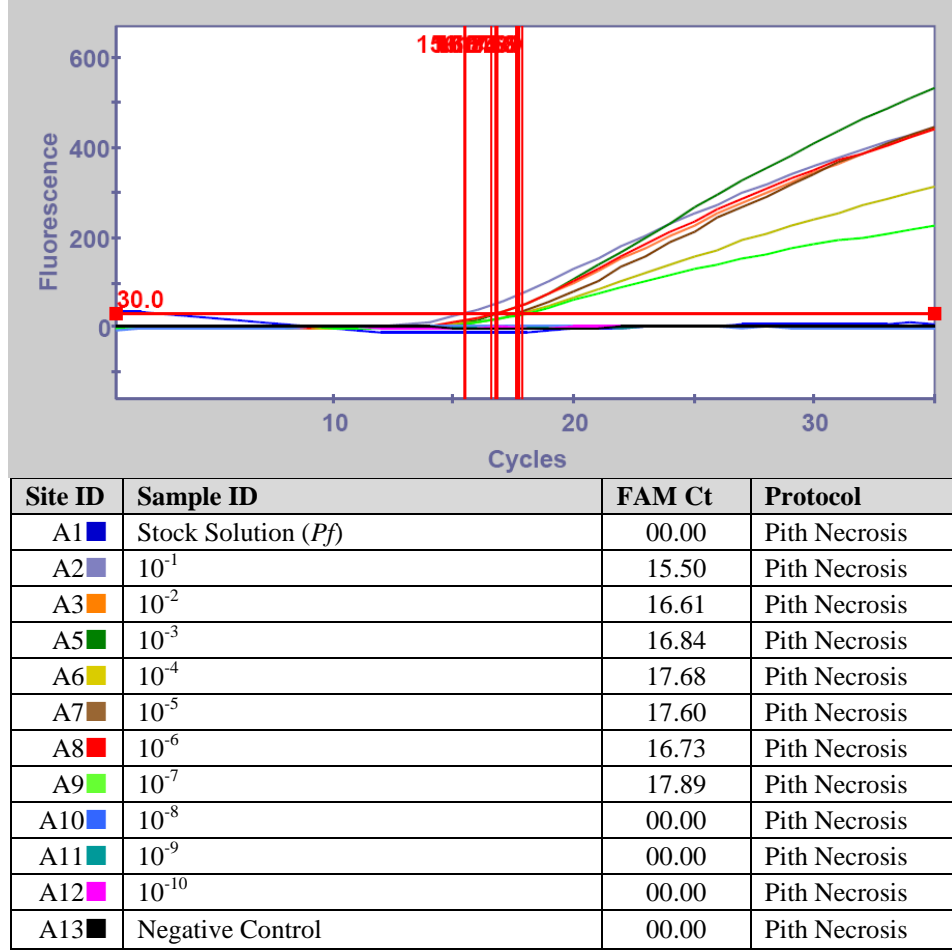


Şekil 4.34. *Pseudomonas cichorii*'nin bakteri hassasiyet tespiti

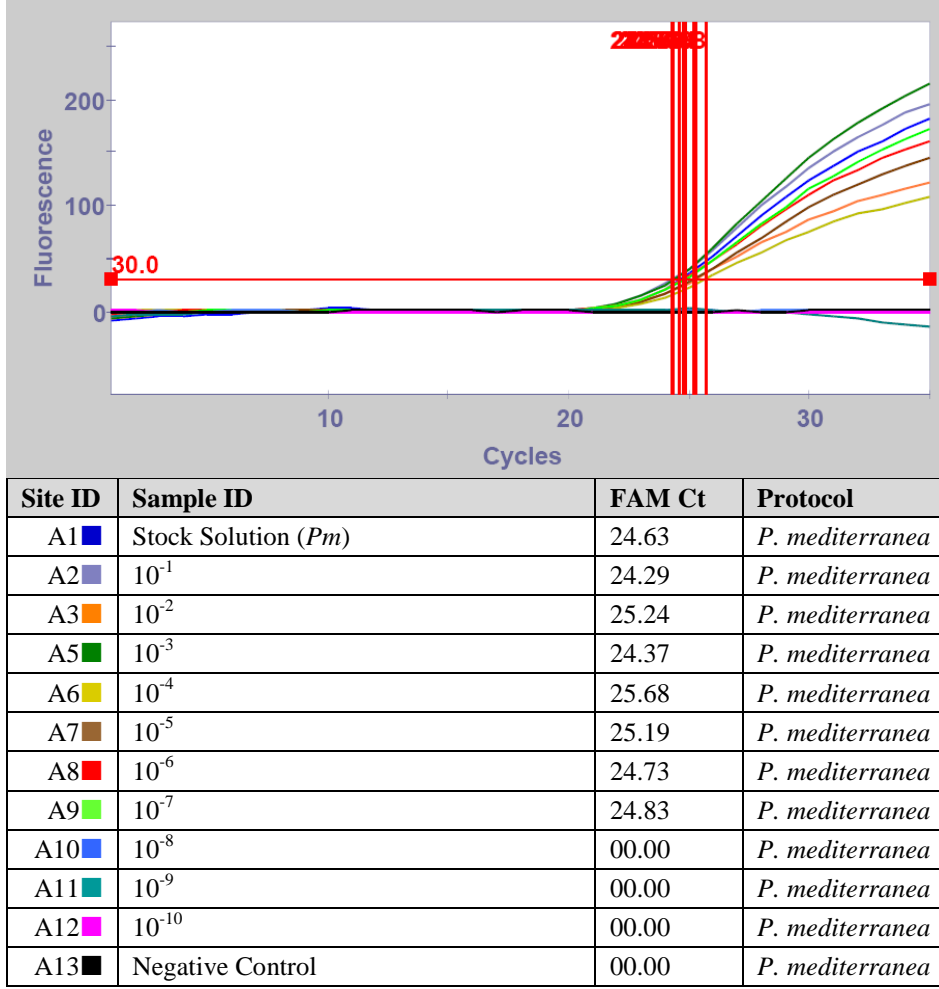


Site ID	Sample ID	FAM Ct	Protocol
A5	Stock Solution ( <i>Pc</i> )	21.87	Pith Necrosis
A6	$10^{-1}$	22.12	Pith Necrosis
A7	$10^{-2}$	22.61	Pith Necrosis
A8	$10^{-3}$	24.70	Pith Necrosis
A9	$10^{-4}$	22.93	Pith Necrosis
A10	$10^{-5}$	22.92	Pith Necrosis
A11	$10^{-6}$	22.41	Pith Necrosis
A12	$10^{-7}$	22.78	Pith Necrosis
A13	$10^{-8}$	00.00	Pith Necrosis
A14	$10^{-9}$	00.00	Pith Necrosis
A15	$10^{-10}$	00.00	Pith Necrosis
A16	Negative Control	00.00	Pith Necrosis

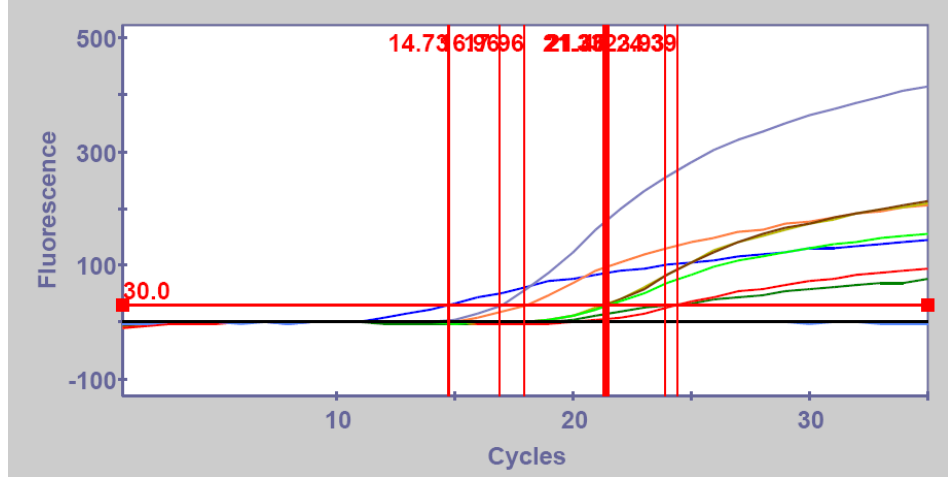
Şekil 4.35. *Pseudomonas corrugata*'nın bakteri hassasiyet tespiti



Şekil 4.36. *Pseudomonas fluorescens*'in bakteri hassasiyet tespiti



Şekil 4.37. *Pseudomonas mediterranea*'nın bakteri hassasiyet tespiti

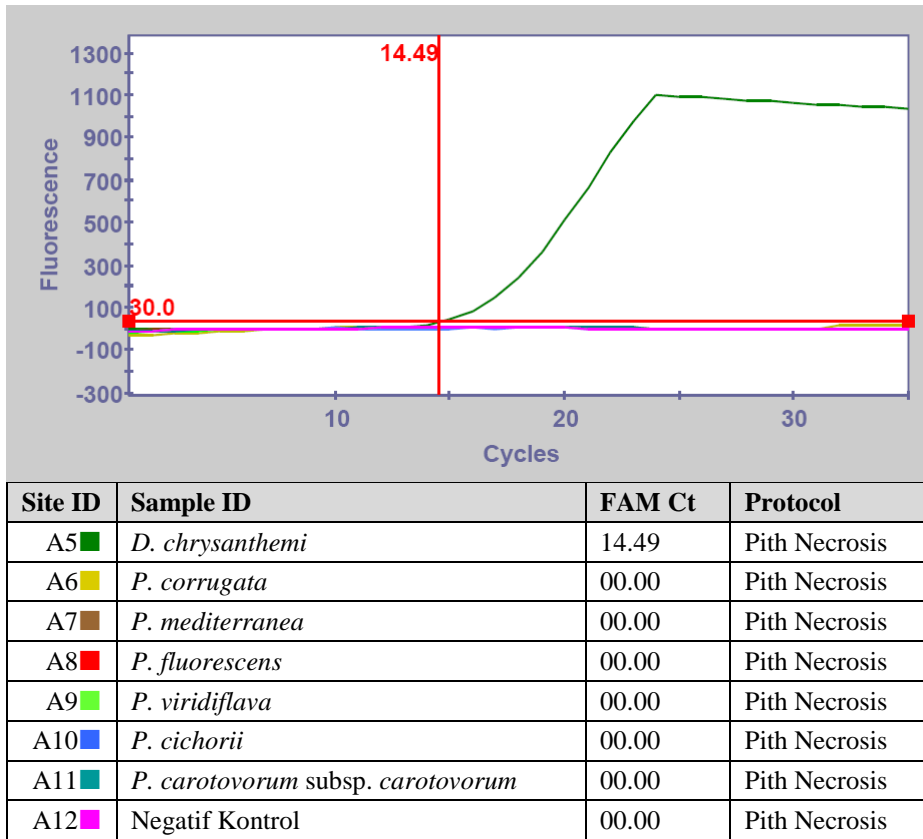


Site ID	Sample ID	FAM Ct	Protocol
A1	Stock Solution ( <i>Pv</i> )	14.73	Pith Necrosis
A2	$10^{-1}$	16.96	Pith Necrosis
A3	$10^{-2}$	17.96	Pith Necrosis
A5	$10^{-3}$	23.93	Pith Necrosis
A6	$10^{-4}$	21.33	Pith Necrosis
A7	$10^{-5}$	21.36	Pith Necrosis
A8	$10^{-6}$	24.39	Pith Necrosis
A9	$10^{-7}$	21.47	Pith Necrosis
A10	$10^{-8}$	00.00	Pith Necrosis
A11	$10^{-9}$	00.00	Pith Necrosis
A12	$10^{-10}$	00.00	Pith Necrosis
A13	Negative Control	00.00	Pith Necrosis

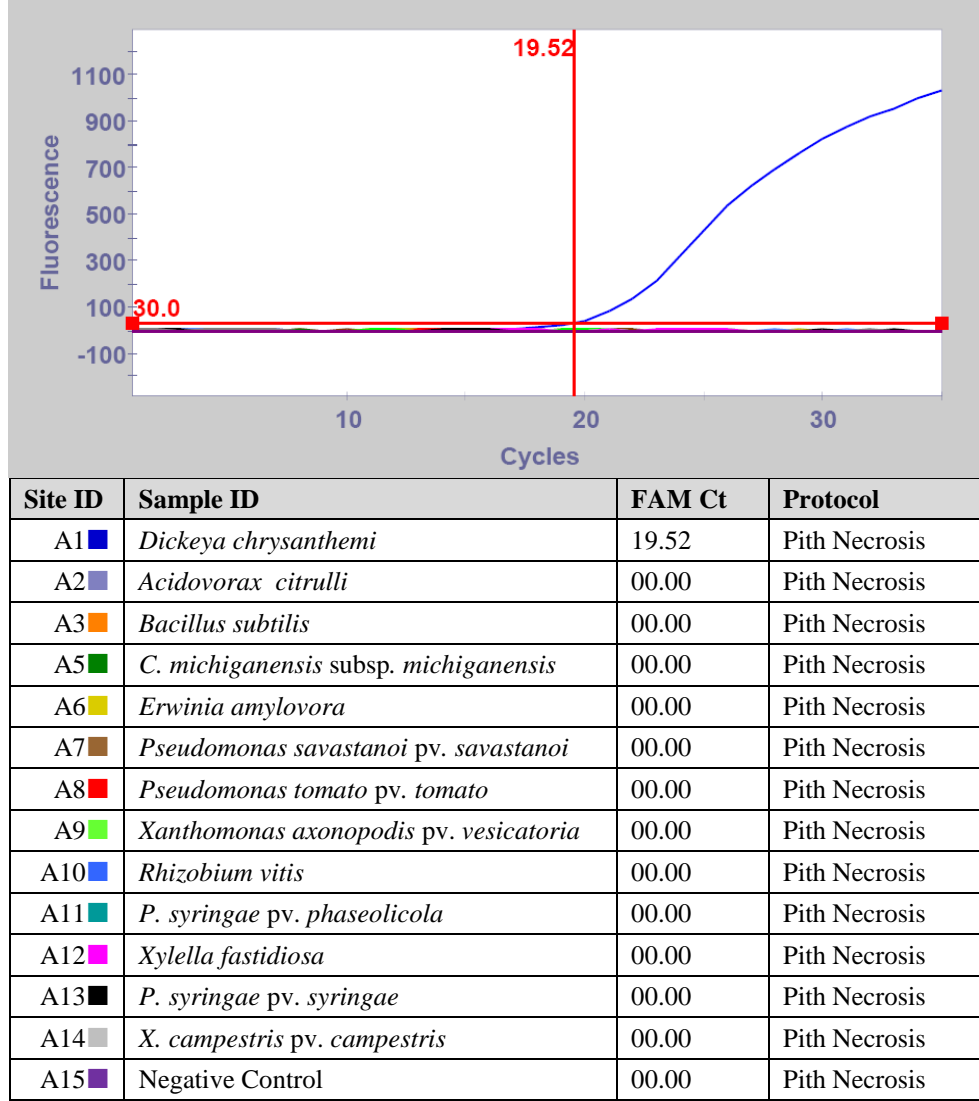
Şekil 4.38. *Pseudomonas viridiflava*'nın bakteri hassasiyet tespiti

#### 4.6. Primerler ve Probulun Seçiciliği

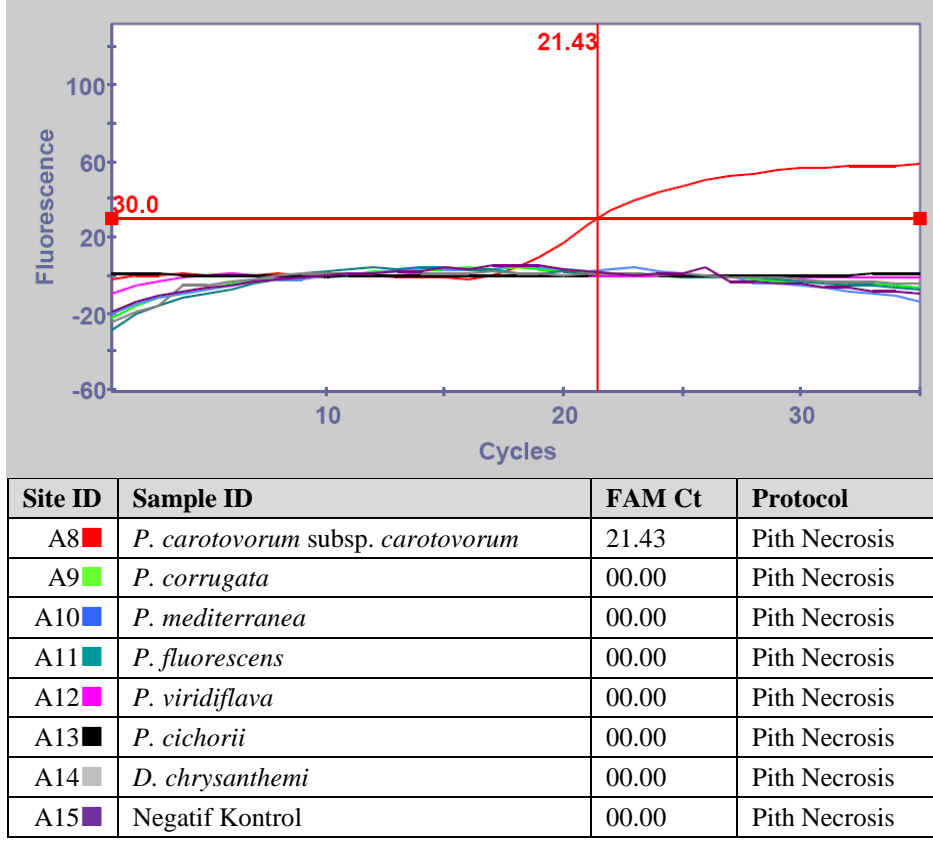
Öz nekrozu patojenlerinin tanı ve tespiti için tasarlanan primerler ve probun seçiciliğini test etmek amacıyla, geliştirilen primerler probun kullanılarak öz nekrozu patojeni bakteriler (Çizelge 3.2) ve diğer bitki patojeni bakteriler (Çizelge 3.3) ile Real-Time PCR işlemi gerçekleştirilmiştir. İşlem sonucunda *Dickeya chrysanthemi*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pseudomonas cichorii*, *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mediterranea* ve *Pseudomonas viridiflava* için tasarlanan primer prob setlerinin sadece *Dickeya chrysanthemi*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pseudomonas cichorii*, *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mediterranea* ve *Pseudomonas viridiflava* bakterilerine spesifik olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.39, Şekil 4.40, Şekil 4.41, Şekil 4.42, Şekil 4.43, Şekil 4.44, Şekil 4.45, Şekil 4.46, Şekil 4.47, Şekil 4.48, Şekil 4.49, Şekil 4.50, Şekil 4.51, Şekil 4.52).



Şekil 4.39. *Dickeya chrysanthemi* strainlerinin tespiti için tasarlanan primer ve prob setinin diğer öz nekrozu patojeni bakteri türlerine karşı spesifikliğini belirlemesi

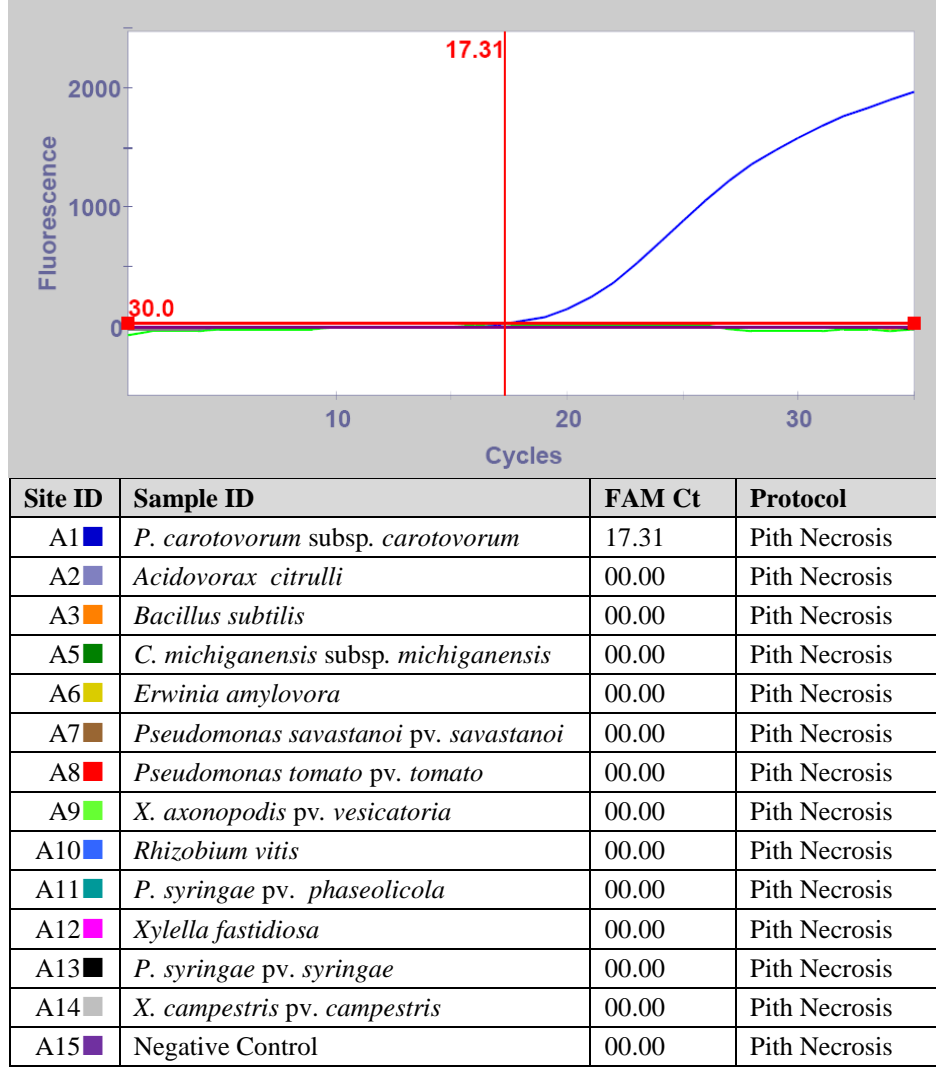


Şekil 4.40. *Dickeya chrysanthemi* strainlerinin tespiti için tasarlanan primer ve prob setinin diğer bitki patojeni bakteri türlerine karşı spesifikliğin belirlenmesi

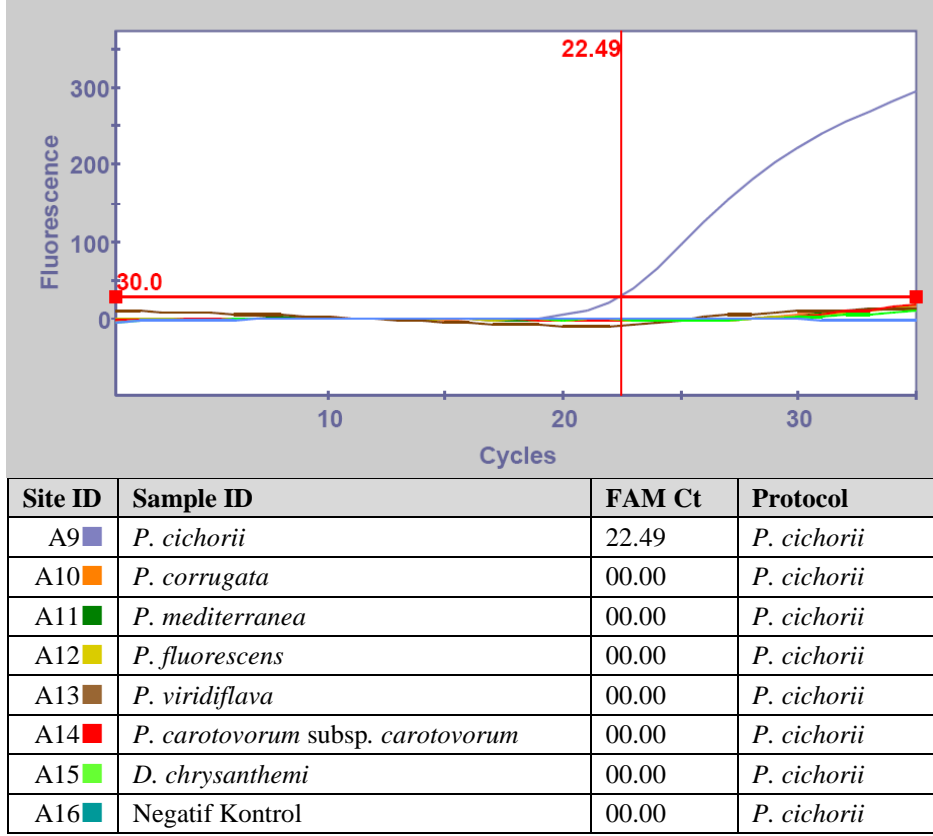


Şekil 4.41. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* strainlerinin tespiti için tasarlanan primer ve prob setinin diğer öz nekrozu patojeni bakteri türlerine karşı spesifikliğini belirlemesi

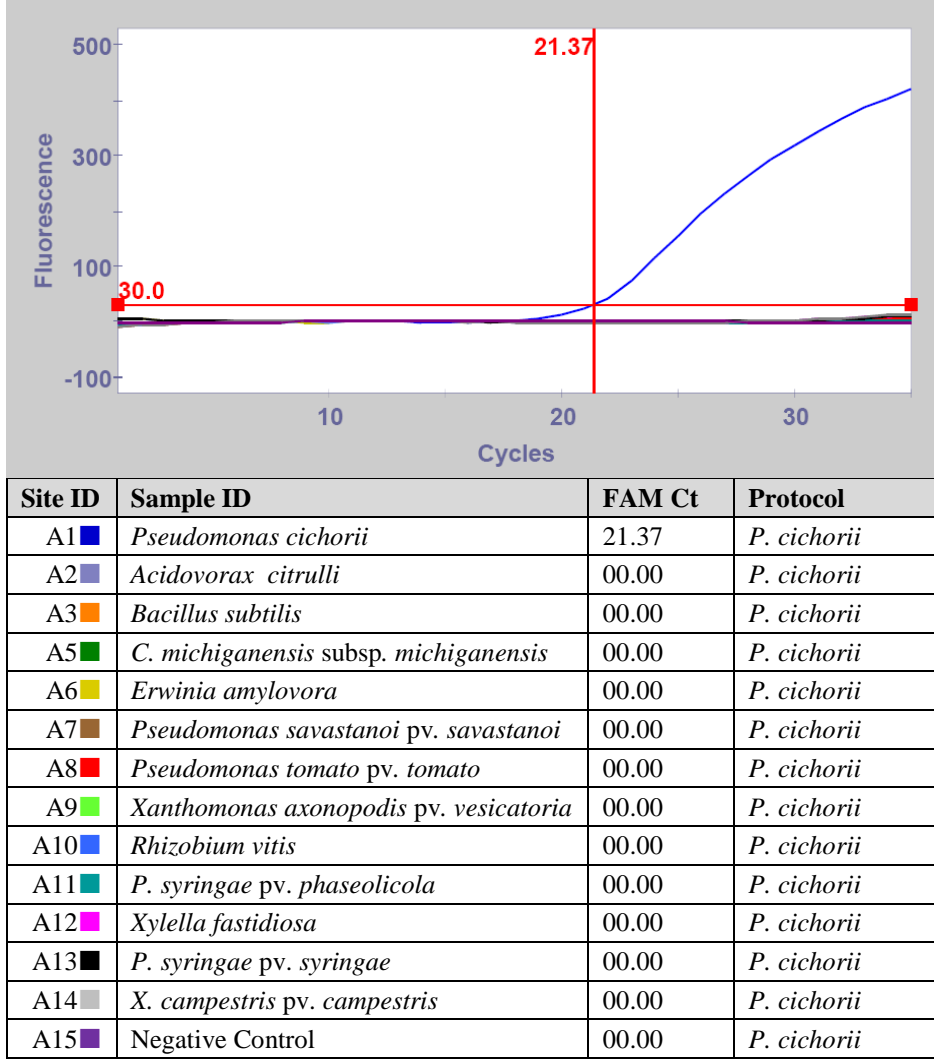




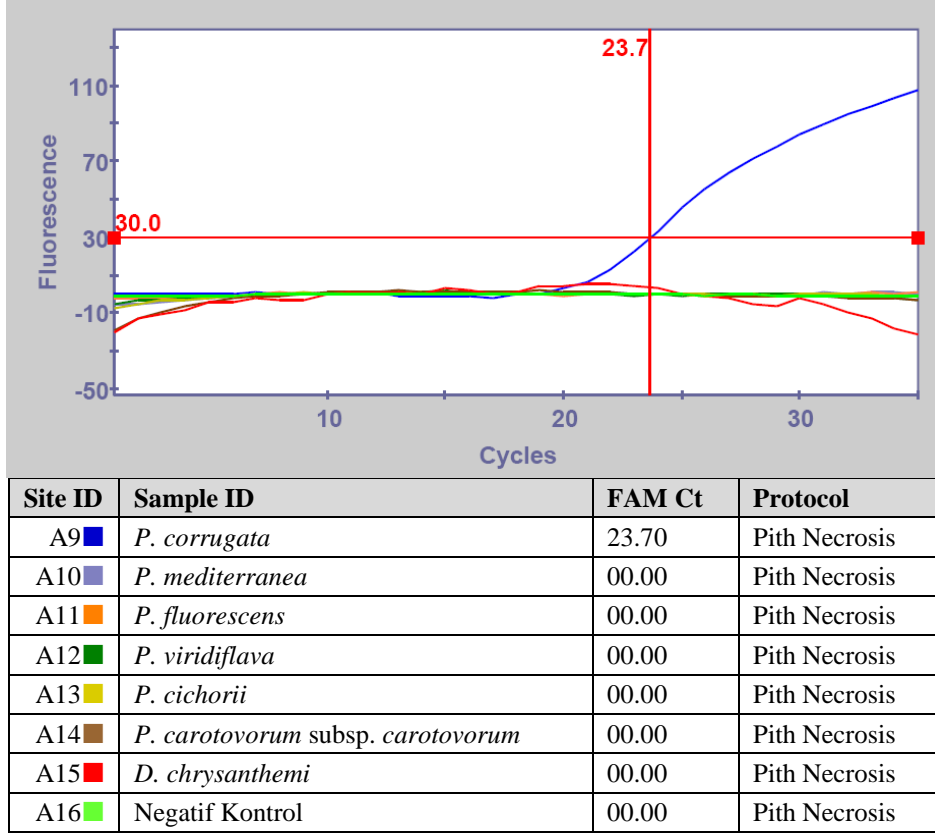
Şekil 4.42. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* strainlerinin tespiti için tasarlanan primer ve prob setinin diğer bitki patojeni bakteri türlerine karşı spesifikliğinin belirlenmesi



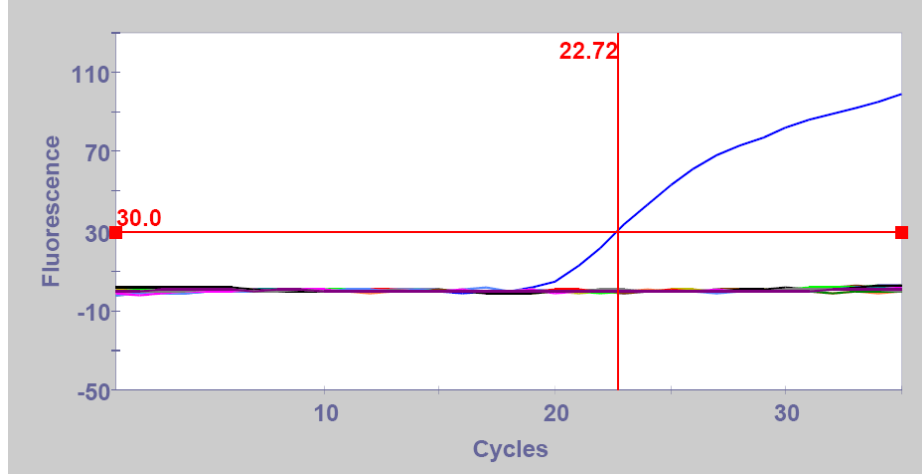
Şekil 4.43. *Pseudomonas cichorii* strainlerinin tespiti için tasarlanan primer ve prob setinin diğer öz nekrozu patojeni bakteri türlerine karşı spesifikliğinin belirlenmesi



Şekil 4.44. *Pseudomonas cichorii* strainlerinin tespiti için tasarlanan primer ve prob setinin diğer bitki patojeni bakteri türlerine karşı spesifikliğin belirlenmesi

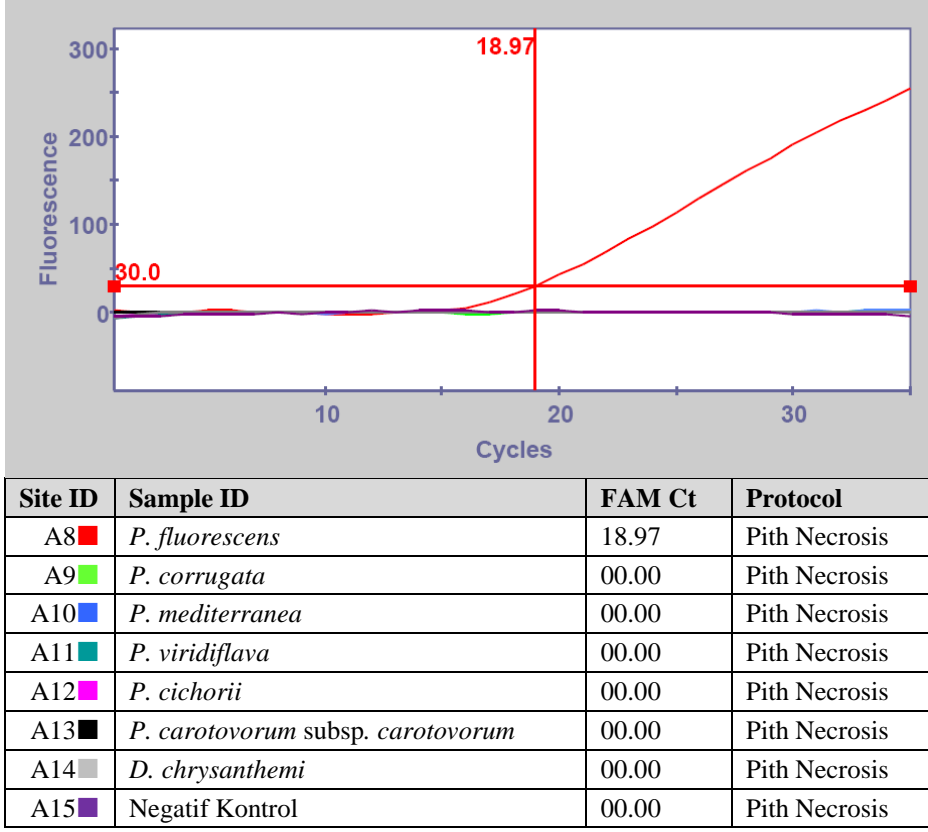


Şekil 4.45. *Pseudomonas corrugata* strainlerinin tespiti için tasarlanan primer ve prob setinin diğer öz nekrozu patojeni bakteri türlerine karşı spesifikliğinin belirlenmesi

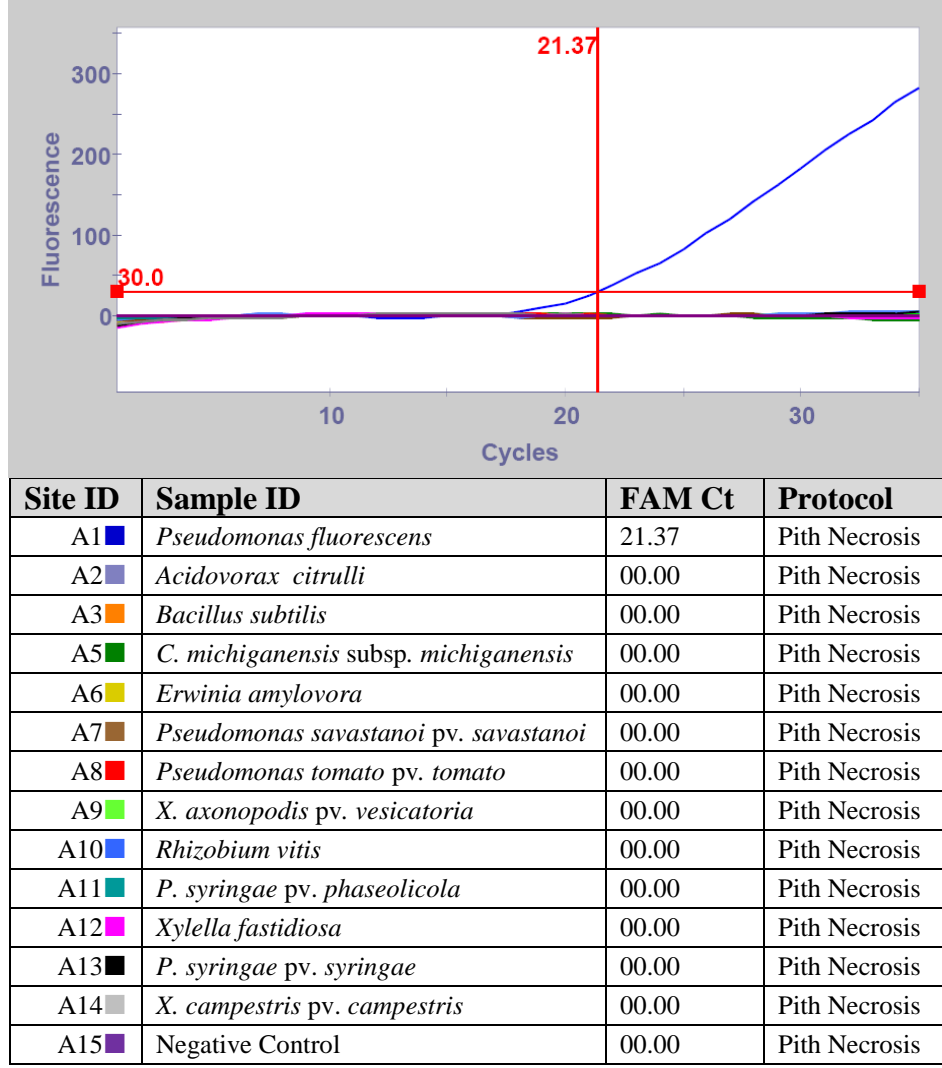


Site ID	Sample ID	FAM Ct	Protocol
A1	<i>P. corrugata</i>	22.72	Pith Necrosis
A2	<i>Acidovorax citrulli</i>	00.00	Pith Necrosis
A3	<i>Bacillus subtilis</i>	00.00	Pith Necrosis
A5	<i>C. michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	00.00	Pith Necrosis
A6	<i>Erwinia amylovora</i>	00.00	Pith Necrosis
A7	<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>	00.00	Pith Necrosis
A8	<i>Pseudomonas tomato</i> pv. <i>tomato</i>	00.00	Pith Necrosis
A9	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	00.00	Pith Necrosis
A10	<i>Rhizobium vitis</i>	00.00	Pith Necrosis
A11	<i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>	00.00	Pith Necrosis
A12	<i>Xylella fastidiosa</i>	00.00	Pith Necrosis
A13	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>	00.00	Pith Necrosis
A14	<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	00.00	Pith Necrosis
A15	Negative Control	00.00	Pith Necrosis

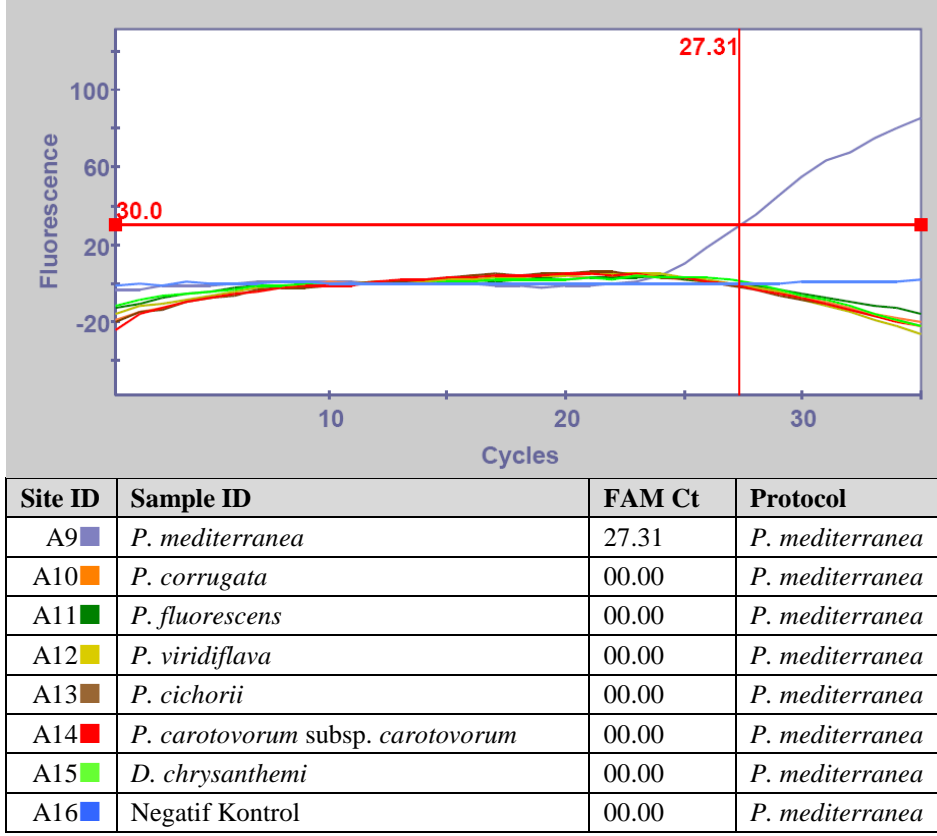
Şekil 4.46. *Pseudomonas corrugata* strainlerinin tespiti için tasarlanan primer ve prob setinin diğer bitki patojeni bakteri türlerine karşı spesifikliğinin belirlenmesi



Şekil 4.47. *Pseudomonas fluorescens* strainlerinin tespiti için tasarlanan primer ve prob setinin diğer öz nekrozu patojeni bakteri türlerine karşı spesifikliğinin belirlenmesi

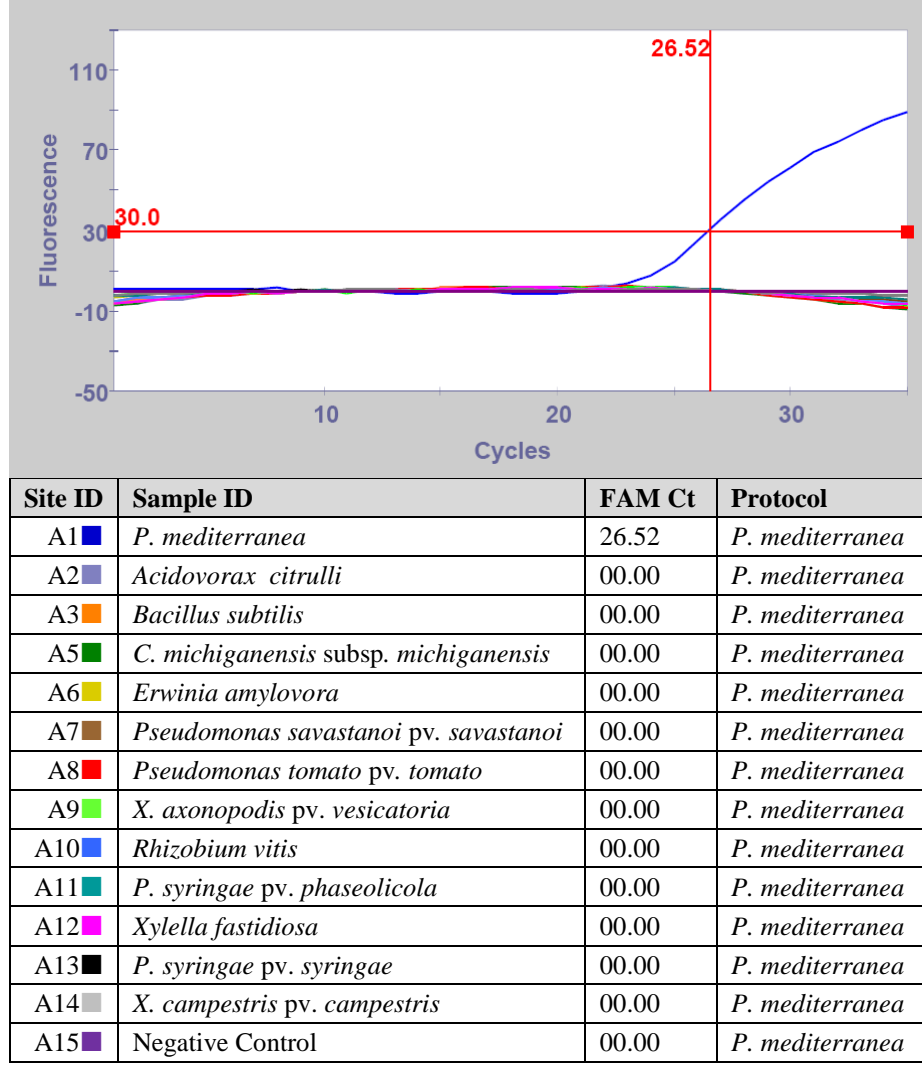


Şekil 4.48. *Pseudomonas fluorescens* strainlerinin tespiti için tasarlanan primer ve prob setinin diğer bitki patojeni bakteri türlerine karşı spesifikliğinin belirlenmesi

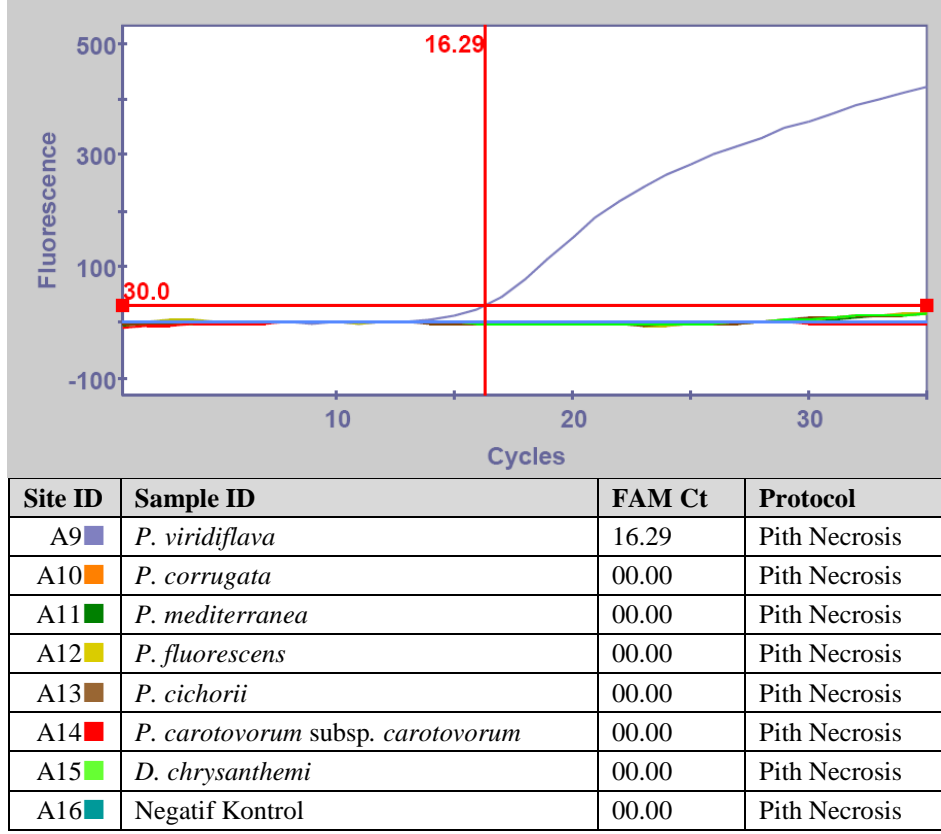


Şekil 4.49. *Pseudomonas mediterranea* strainlerinin tespiti için tasarlanan primer ve prob setinin diğer öz nekrozu patojeni bakteri türlerine karşı spesifikliğin belirlenmesi

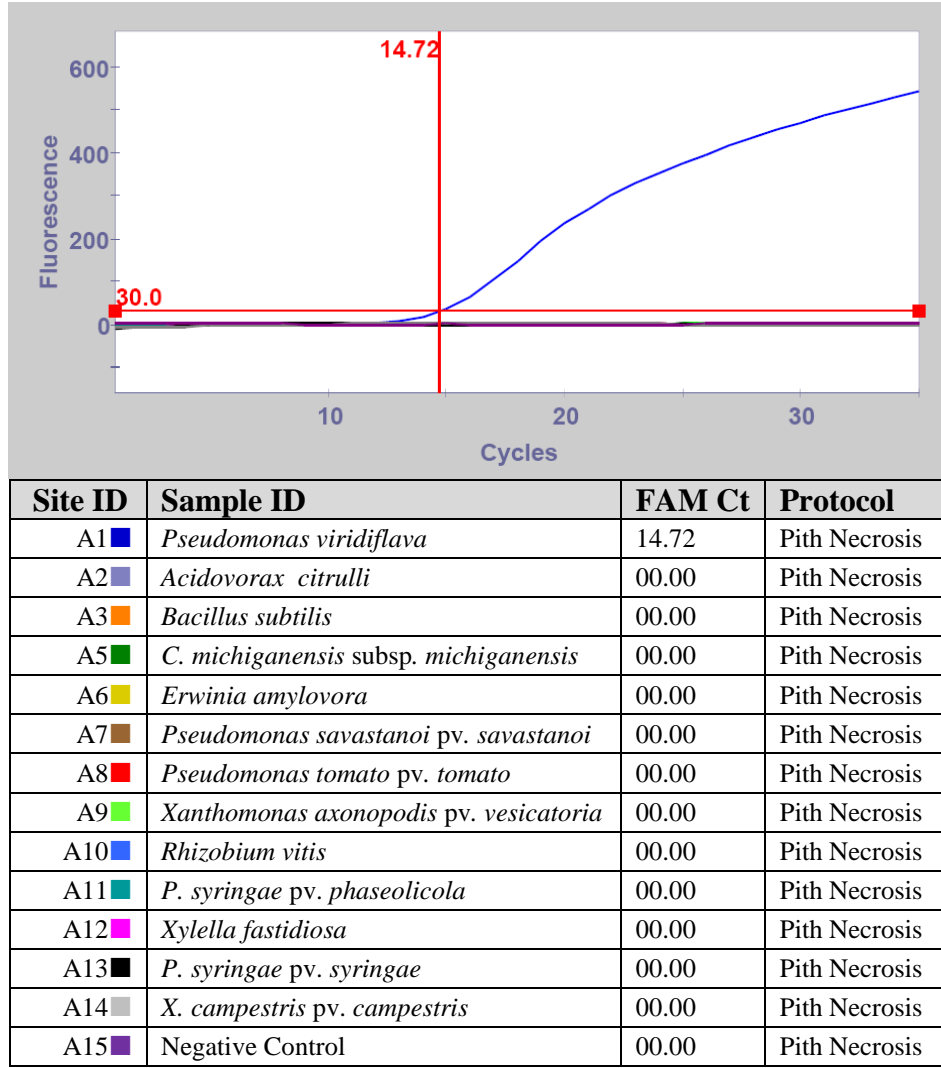




Şekil 4.50. *Pseudomonas mediterranea* strainlerinin tespiti için tasarlanan primer ve prob setinin diğer bitki patojeni bakteri türlerine karşı spesifikliğin belirlenmesi



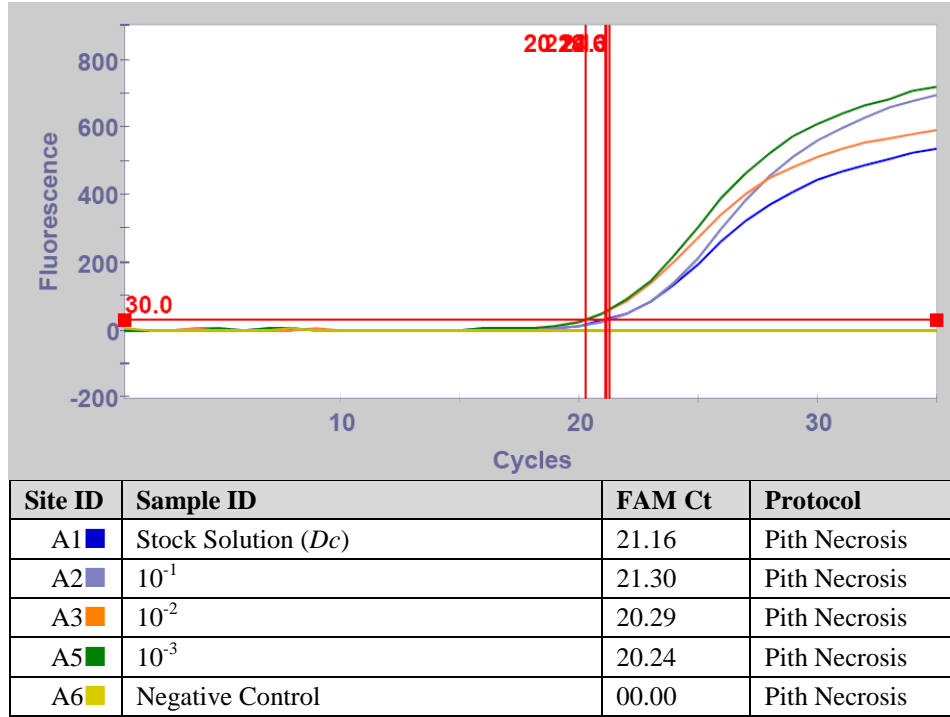
Şekil 4.51. *Pseudomonas viridiflava* strainlerinin tespiti için tasarlanan primer ve prob setinin diğer öz nekrozu patojeni bakteri türlerine karşı spesifikliğin belirlenmesi



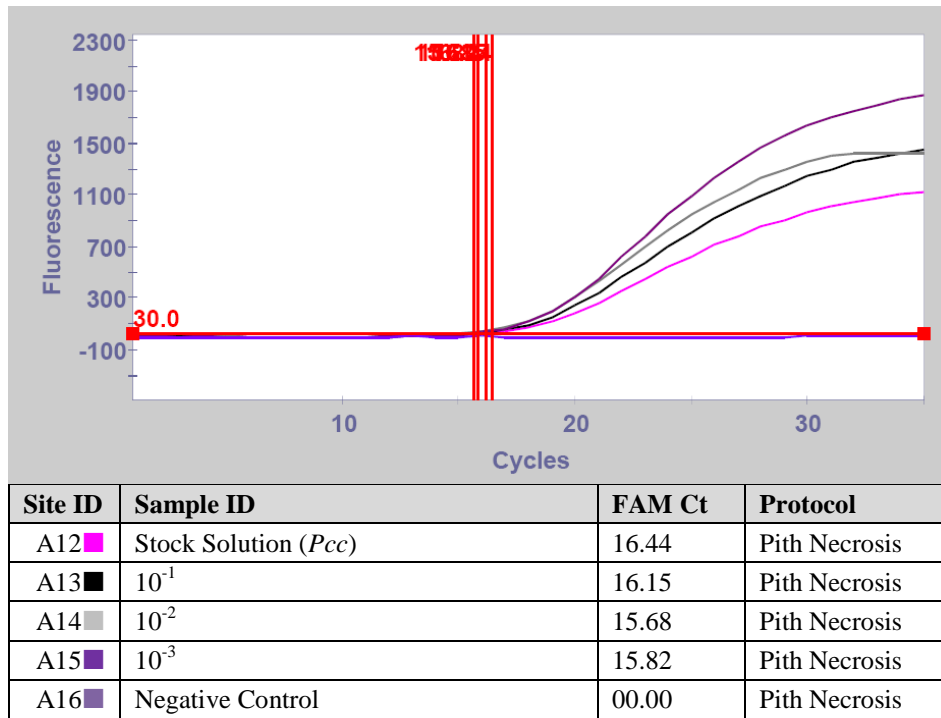
Şekil 4.52. *Pseudomonas viridiflava* strainlerinin tespiti için tasarlanan primer ve prob setinin diğer bitki patojeni bakteri türlerine karşı spesifikliğinin belirlenmesi

#### 4.7. Real-Time Bio-PCR

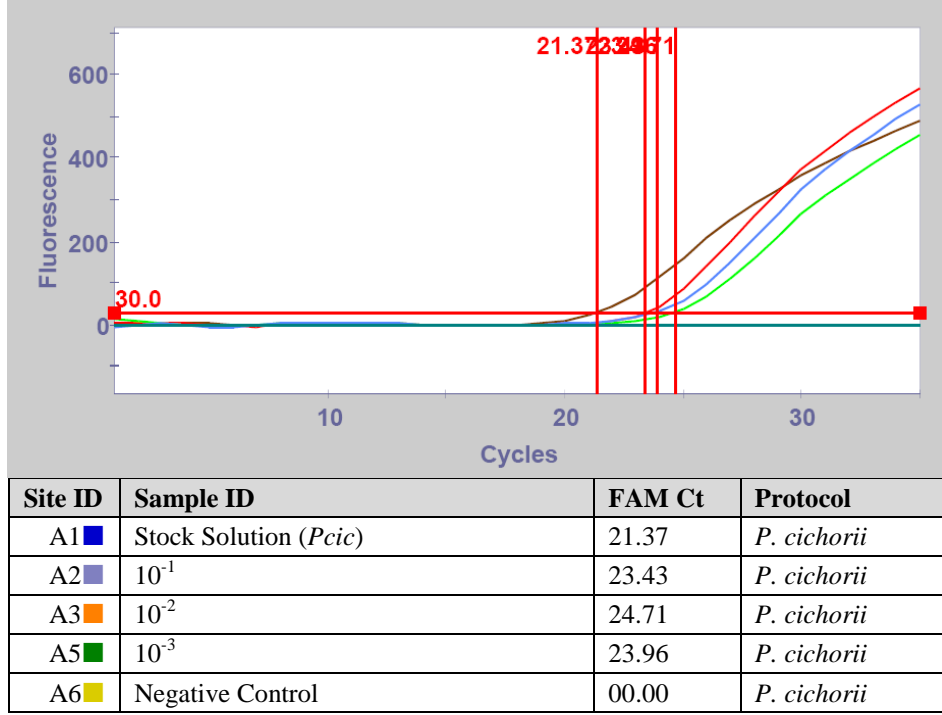
Real-Time PCR yöntemi ile hem canlı ve hem de ölü bakterilerin tespiti mümkün olabilmektedir. Bu nedenle bu çalışmada yalnız canlı *Dickeya chrysanthemi*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pseudomonas cichorii*, *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mediterranea* ve *Pseudomonas viridiflava* strainlerinin tespitlerini 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 patojenler tespit edilebilmiştir. (Şekil 4.53, Şekil 4.54, Şekil 4.55, Şekil 4.56, Şekil 4.57, Şekil 4.58, Şekil 4.59).



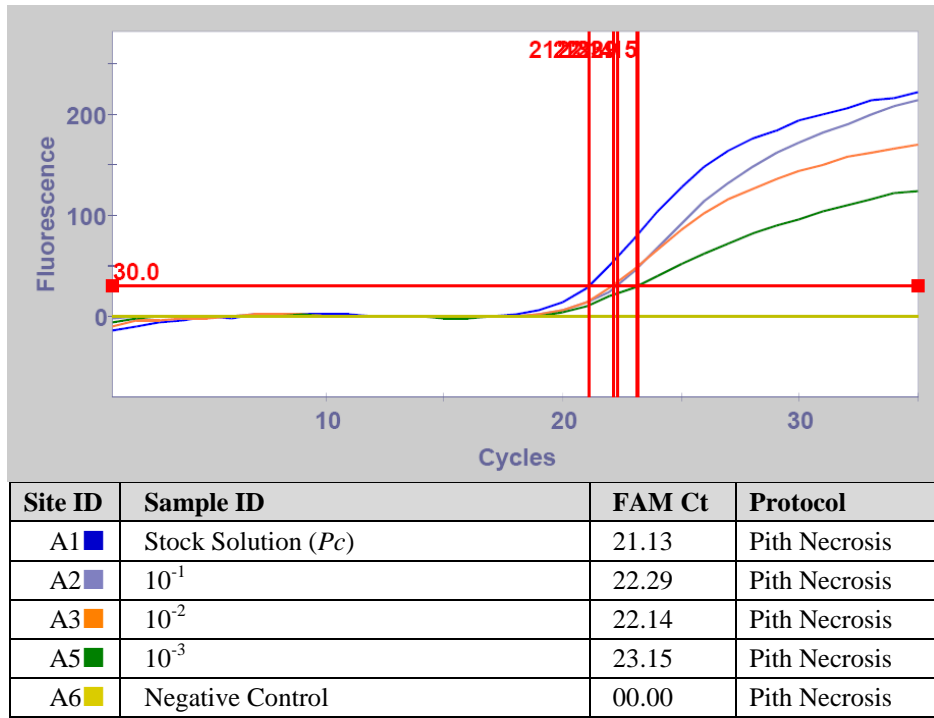
Şekil 4.53. Tasarlanan primer ve prob seti ile canlı *Dickeya chrysanthemi* straininin tespiti



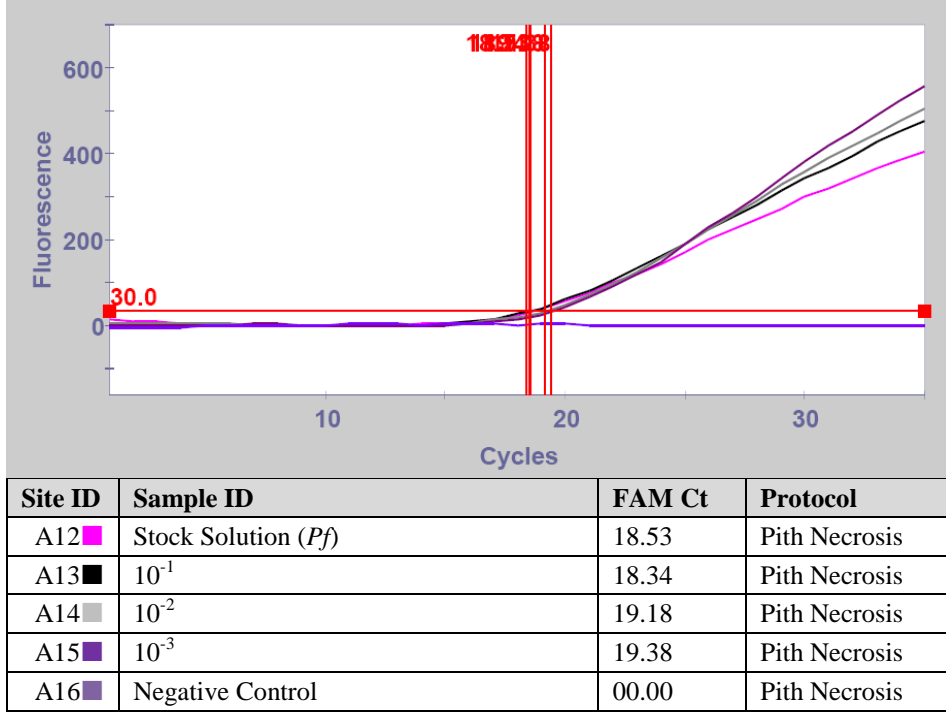
Şekil 4.54. Tasarlanan primer ve prob seti ile canlı *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* straininin tespiti



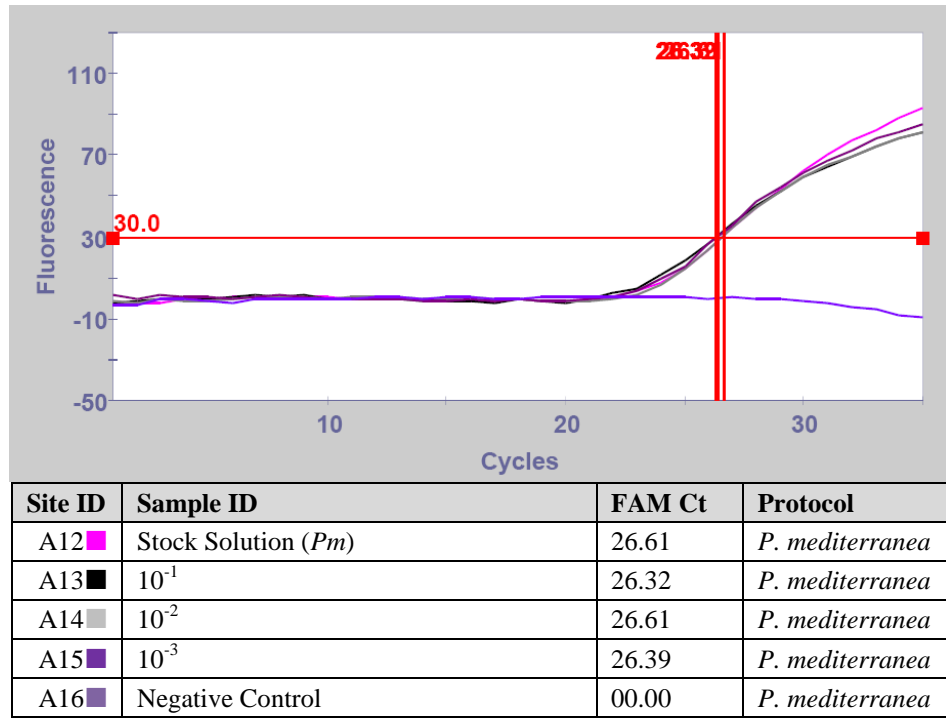
Şekil 4.55. Tasarlanan primer ve prob seti ile canlı *Pseudomonas cichorii* straininin tespiti



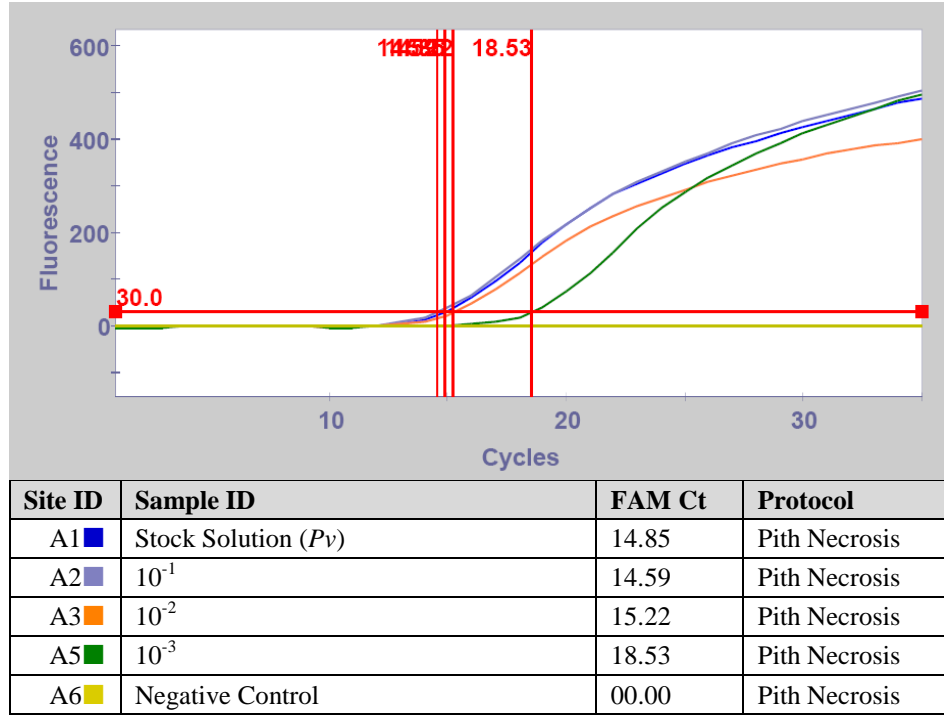
Şekil 4.56. Tasarlanan primer ve prob seti ile canlı *Pseudomonas corrugata* straininin tespiti



Şekil 4.57. Tasarlanan primer ve prob seti ile canlı *Pseudomonas fluorescens* straininin tespiti



Şekil 4.58. Tasarlanan primer ve prob seti ile canlı *Pseudomonas mediterranea* straininin tespiti



Şekil 4.59. Tasarlanan primer ve prob seti ile canlı *Pseudomonas viridiflava* straininin tespiti

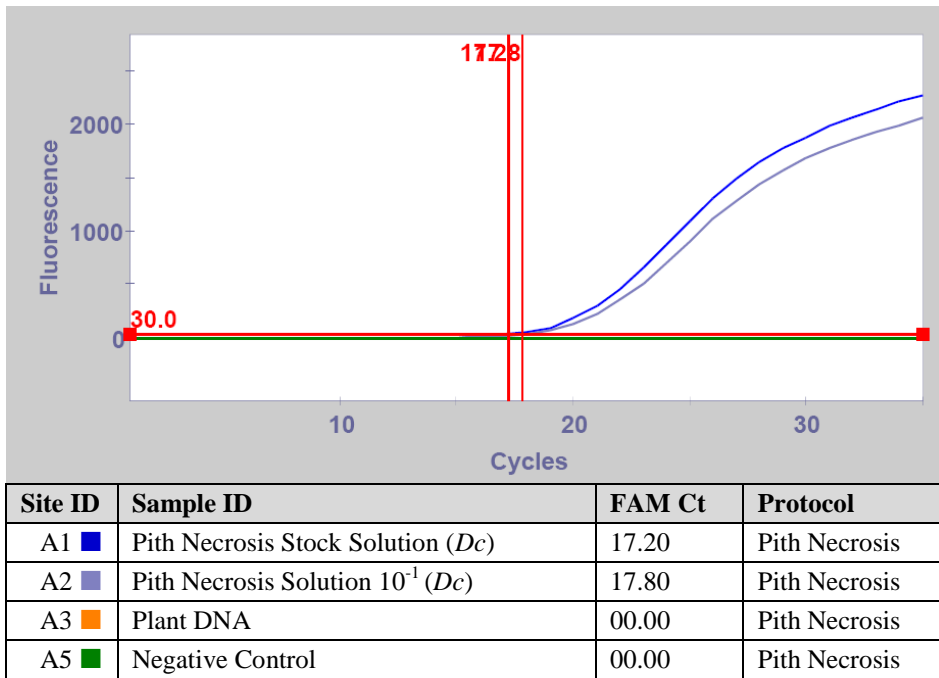
#### 4.8. Real-Time PCR ile Hastalıklı Bitki Dokularından *Dickeya chrysanthemi*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pseudomonas cichorii*, *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mediterranea* ve *Pseudomonas viridiflava*'nın Tespiti

Öz nekrozu hastalığı belirtilerin gözlenmesi etmenlere göre değişiklik göstermiştir. *Dickeya chrysanthemi*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pseudomonas cichorii*, *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mediterranea* ve *Pseudomonas viridiflava* etmenlerinin domates bitkilerine inokulasyonundan bir ay sonra meydana getirdiği simptomlar Şekil 4.60'de gösterilmiştir.

Domates yetiştiriciliğinde ürün ve kalite kayıplarına sebep olan *Dickeya chrysanthemi*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pseudomonas cichorii*, *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mediterranea* ve *Pseudomonas viridiflava*'nın hastalıklı bitki dokularından erken tanısı ve tespiti için Real-Time PCR işlemi gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.61, Şekil 4.62, Şekil 4.63, Şekil 4.64, Şekil 4.65, Şekil 4.66, Şekil 4.67).

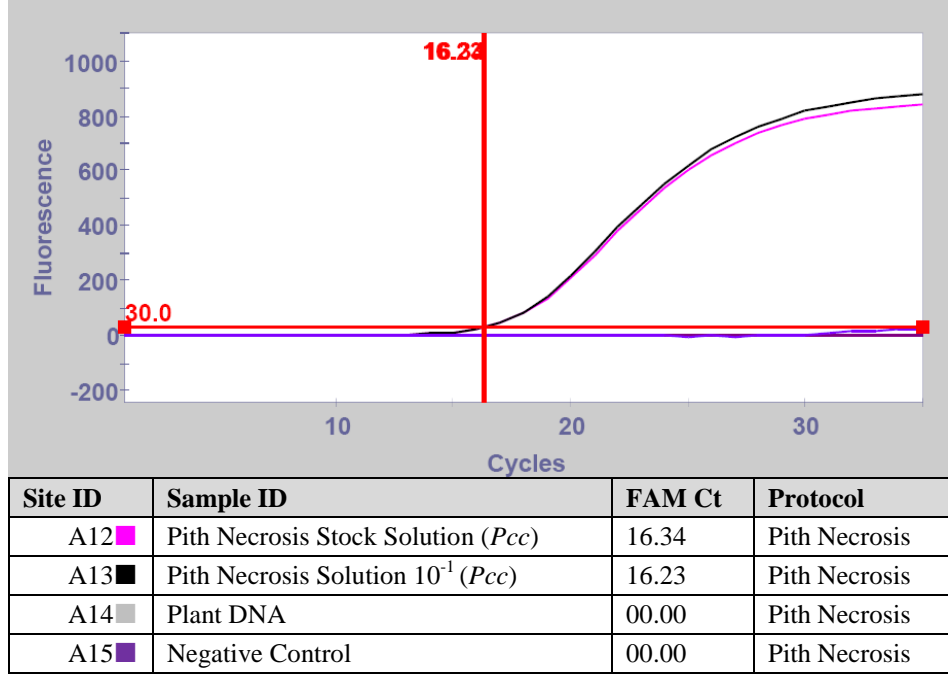


Şekil 4.60. Öz nekrozu etmenlerinin domates bitkilerine inokulasyonundan bir ay sonra gövdede meydana getirdiği belirtiler A. *Dickeya chrysanthemi* (öz nekrozu), B. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, (öz nekrozu) C. *Pseudomonas cichorii* (öz nekrozu ve gövde lekeleri), D. *Pseudomonas corrugata* (öz nekrozu), E. *Pseudomonas fluorescens* (öz nekrozu), F. *Pseudomonas mediterranea* (öz nekrozu), G. *Pseudomonas viridiflava* (öz nekrozu)

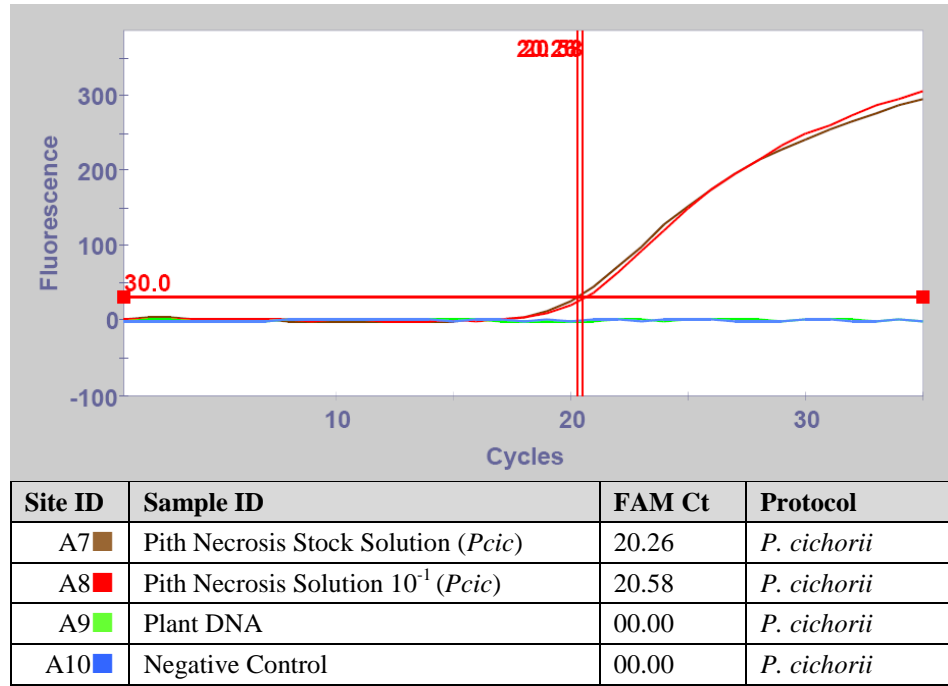


Şekil 4.61. Tasarlanan primer ve prob seti ile *Dickeya chrysanthemi* straininin enfekteli bitki dokusundan tespiti

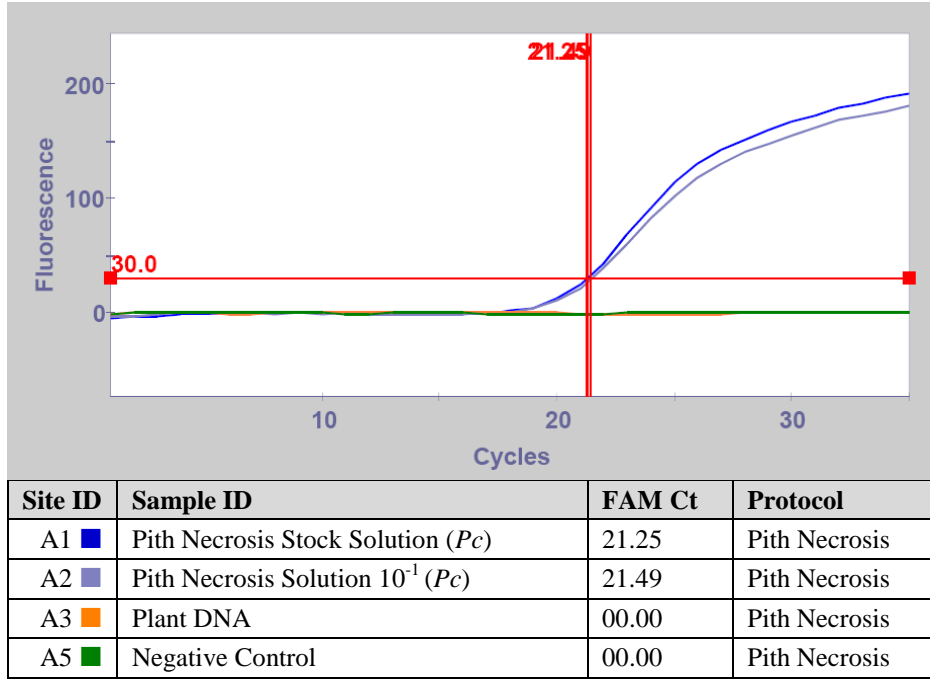




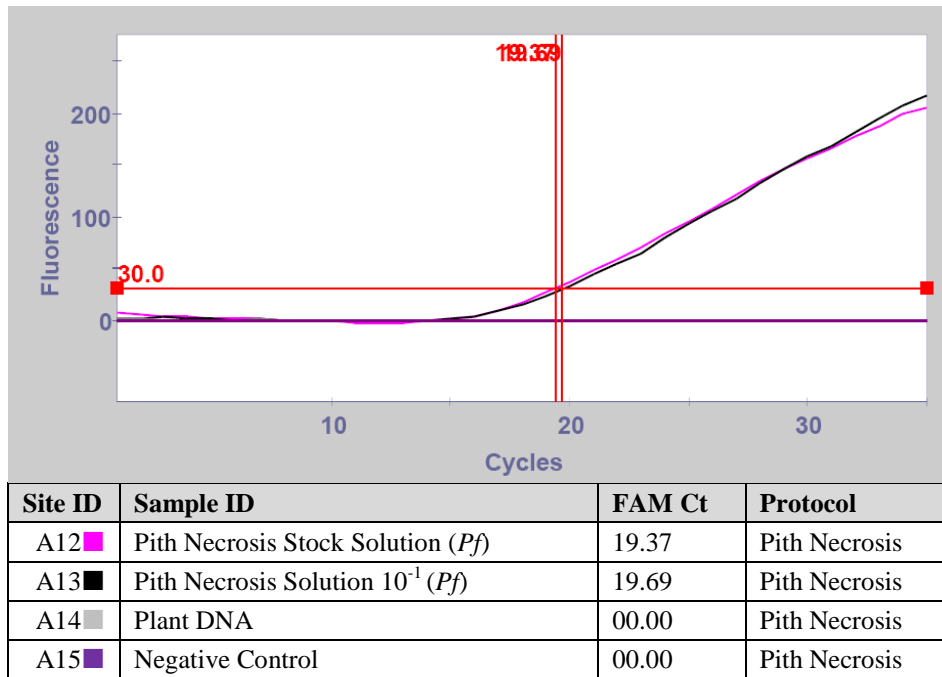
Şekil 4.62. Tasarlanan primer ve prob seti ile *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* straininin enfekteli bitki dokusundan tespiti



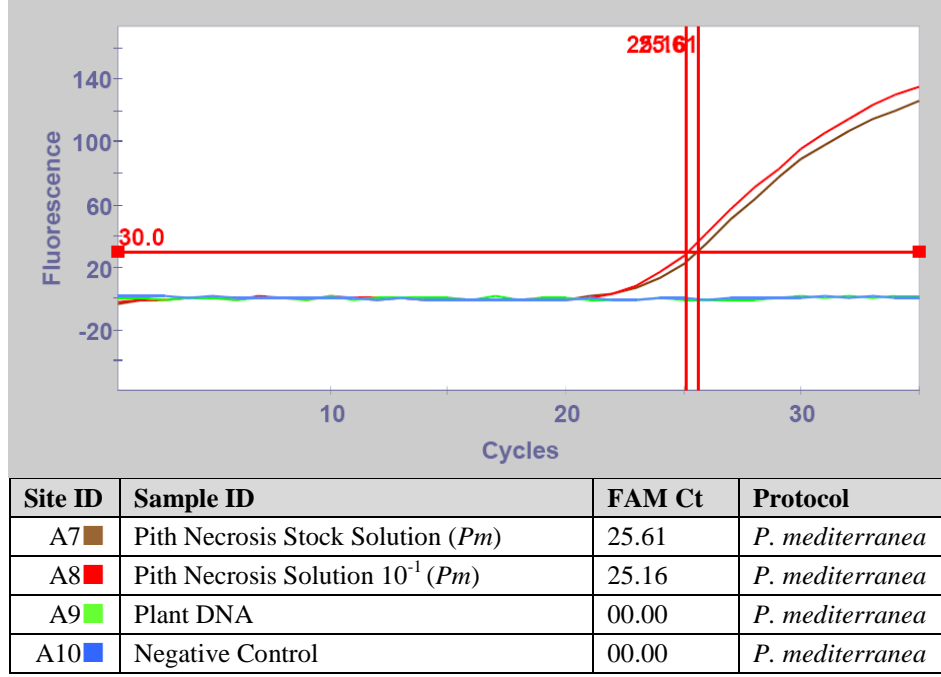
Şekil 4.63. Tasarlanan primer ve prob seti ile *Pseudomonas cichorii* straininin enfekteli bitki dokusundan tespiti



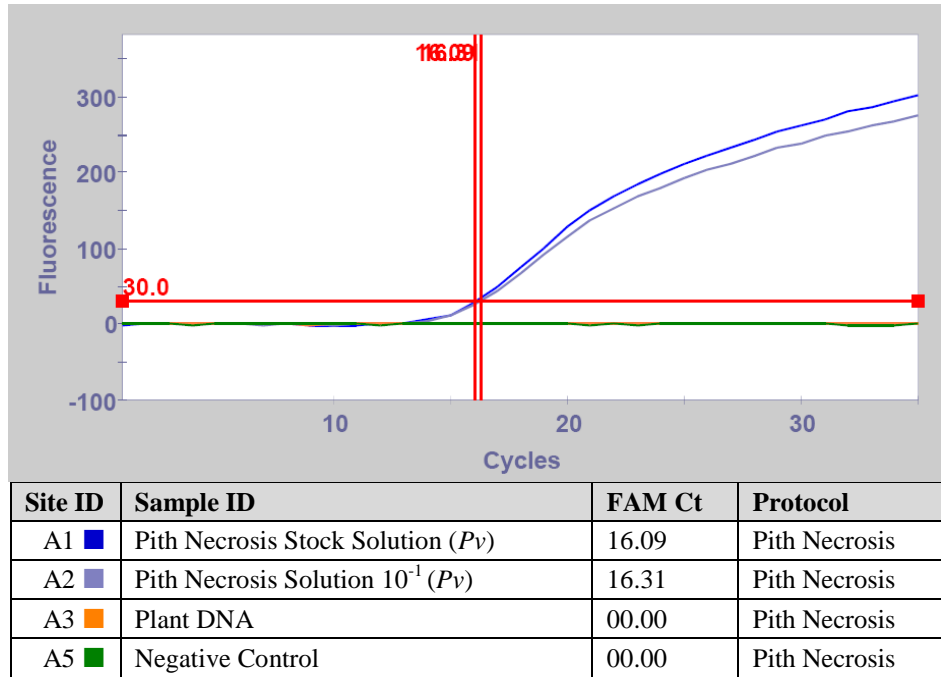
Şekil 4.64. Tasarlanan primer ve prob seti ile *Pseudomonas corrugata* straininin enfekteli bitki dokusundan tespiti



Şekil 4.65. Tasarlanan primer ve prob seti ile *Pseudomonas fluorescens* straininin enfekteli bitki dokusundan tespiti



Şekil 4.66. Tasarlanan primer ve prob seti ile *Pseudomonas mediterranea* straininin enfekteli bitki dokusundan tespiti



Şekil 4.67. Tasarlanan primer ve prob seti ile *Pseudomonas viridiflava* straininin enfekteli bitki dokusundan tespiti

## 5. TARTIŞMA

İçerdiği çeşitli mineral ve vitaminler ile insan sağlığı için yararlı gıda maddelerinden biri olan domates Dünya’da yaygın olarak üretimi yapılan ve severek tüketilen en önemli sebze türlerinden biridir. Son yıllarda üretimi ve önemi gittikçe artan ve üreticiye iyi gelir sağlayan domates hem tarla hemde örtü altı sebze yetiştiriciliğinde en fazla üretilen sebzelerin başında gelmektedir. Seralarda yetiştiriciliği yapılan sebze türleri arasında domates %47’lik payla ilk sırada yer almaktadır.

Domates üretim ve pazarlama esnasında karşılaşılan bir çok problemlerinin yanı sıra domates hastalıkları ve özellikle bakteriyel hastalıklar önemli ürün kayıplarına neden olmaktadır. Domates yetiştiriciliğinin yaygın olarak yapıldığı Akdeniz Bölgesi’nde görülen hastalıklar içerisinde özellikle öz nekrozu, bakteriyel kanser, bakteriyel leke, bakteriyel benek ve yumuşak çürüklük etmenleri tarafından oluşturulan bakteriyel hastalıklar önemli kayıplara neden olmaktadır (Basım ve Öztürk 2000). Domateslerde öz nekrozu hastalığının ciddi ürün kayıplarına sebep olması, yetiştiricilikten kaynaklanan hatalar, örtü altı domates yetiştiriciliğinin yapıldığı sera koşullarının uygun olmaması, sera içi nemin ayarlanamaması ve sera içi nemin özellikle kış ve erken bahar aylarında oldukça yüksek olması, üreticilerin kültürel önlemlere ve sterilizasyona gereken önemi vermemeleri, yaprak budaması ve koltuk alma işlemlerini takiben koruyucu bakterisitlerin kullanılmaması, kullanımının yetersiz veya zamanında olmaması gibi faktörlerden kaynaklanmaktadır. Ayrıca, farklı bakteri türlerinin öz nekrozu hastalığına sebep olması da hastalığın ciddi ürün kayıplarına yol açmasına katkı sağlamaktadır (Basım ve Öztürk 2000, Basım ve Yılmaz 2005).

Domates yetiştiriciliğinde görülen bakteriyel hastalık etmenlerinden domates bakteriyel öz nekrozu hastalık etmenleri diğer bakteriyel patojenlere oranla daha yoğun olarak görülmekte ve büyük ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Basım ve Yılmaz 2005, Catara 2007).

Domates öz nekrozu hastalığı, domates bitkilerinde düzensiz gövde lekelerinin oluşumuna, bitkilerin gövdelerinin özünde renk değişimine, öz boşalmasına ve sonunda bitkinin tamamen ölümüne neden olmaktadır. Hastalık, bitkilerin genellikle meyve döneminde ortaya çıkar. Gövde, yaprak ve meyve sapının öz dokusunda kahverengi siyah renk değişimi görülür. Zamanla enfekteli dokunun ölmesiyle özde boşalma olur. Gövde üzerinde koyu renkli, çökük, lekeler meydana gelir. Gövdede iletim demetlerindeki zararlanmaya bağlı olarak dışa veya öz boşluğuna doğru yan kökler oluşur. Tüm bitkide orta derecede bir kloroz görülür. Hasta bitkiler genellikle ayakta kalırken bazen turgoritesini kaybedip devrilebilir. Meyvelerini olgunluğa erdirtirebilir. Bazen etmen vasküler dokuyu sarar ve bunun sonucunda solgunluk ve ölüm ortaya çıkar (Scarlett vd 1978, Bradbury 1987, Catara ve Albanese, 1993, Lopez vd 1994). Genelde domateslerde öz nekrozu belirtileri benzer olmasına rağmen hastalığı meydana getiren patojene bağlı olarak hastalığın şiddeti, ilerleyişi ve belirtileri değişkenlik gösterebilir (Catara vd 2002).

Yüksek oranlı nem, aşırı azotlu gübreleme ve düşük gece sıcaklıkları, bakteriyel etmenlerin yayılması ve hastalığın gelişimi üzerine arttırıcı etki yapmaktadır (Scarlett

vd 1978, Catara vd 2000). Domateslerde öz nekrozu hastalığına genellikle geç sonbahar, kış ve erken ilkbahar dönemlerinde Kasım ile Mart ayları arasında rastlamak mümkündür. Esas olarak örtü altında sorun yaratır. Kapalı ve çok nemli havalarda açıkta domates tarımında nadiren görülür. Aşırı azotlu gübrelemenin hastalığı teşvik ettiği sanılmaktadır. Hastalık kuvvetli, kalın gövdeli bitkilerde daha fazla görülmektedir. Bunun nedeni olarak yaprak ve koltuk alma işlemleri sırasında açılan yara dokusunun kalın gövdeli bitkilerde daha büyük olması ve patojenlerin bu yara dokularından enfeksiyon meydana getirmesidir. Ayrıca gevşek dokulu sucul bitkilerde öz nekrozu patojenleri daha hızlı enfeksiyon meydana getirmektedir. Öz nekrozu hastalığı çoğunlukla örtü altında, hava nisbi neminin yüksek olduğu bulutlu ve kapalı periyotları izleyen meyve dönemlerinde ortaya çıkmaktadır (Scarlett vd 1978, Catara vd 2000).

Domates yetiştiriciliğinde önemli sorun yaratan ve üretimi etkileyen patojenlerin hızlı, güvenilir ve erken dönemde tanı ve tespitlerinin yapılması önemlidir. Günümüze kadar patojenlerin tanısı ve tespiti için pek çok yöntem kullanılmıştır. Bunlar arasında seçici ve yarı seçici besi ortamı kullanımı (Babu vd 2013), çeşitli serolojik testler (ELISA, Aglutinasyon testi vb.) (Mazzucchi ve Bazzi 1980, Malin vd 1983, De Boer vd 1987, Klopmeier ve Kelman 1988, Benlioğlu ve Özakman 1991, Siverio vd 1993, Siverio vd 1996, Lopez vd 1994, Van der Wolf vd 1996, Sutra vd 1997, Güven ve Mutlu 2000, Gardan vd 2003, Fiori ve Schiaffino 2003, Ülke 2003, Tekman 2005, Tsrör vd 2009, Alimi vd 2011, Heydari vd 2012, Trantas vd 2014) çeşitli fiziksel ve biyokimyasal testler (Rhodes 1959, Clark ve Watson 1986, Opio vd 1996, Catara vd 2002, Fiori ve Schiaffino 2003, Saygılı vd 2004, Basım vd 2005, Aysan vd 2006, Hu vd 2008, Slawiak vd 2009-b, Babu vd 2013), yağ asidi profilleri (Siverio vd 1993, Siverio vd 1996, Sutra vd 1997, De Souza vd 2003), DNA-DNA ilişkileri (De Ley 1974, Sutra vd 1997, Gardan vd 2003), araştırmacılar tarafından kullanılmıştır. Besi ortamları, biyokimyasal test ve diğer testlerle yapılan tanılama çalışmaları sonuçları ile patojenik bakterilerin tanıları yapılabilse de bu yöntemlerin uzun zaman alması, bazı patojenlerin strainleri arasındaki farklılık nedeniyle kesin sonuçların alınmasını zorlaştırması gibi nedenlerden dolayı izolatların kesin tanıların moleküler yöntemlerle yapılabilmesi oldukça önemlidir. Bu nedenle son yıllarda patojenlerin tanısında nükleik asit temelli yöntemlerden PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) metodu daha hızlı ve güvenilir olmasından dolayı bitki patojenlerin tanısında kullanılmaktadır (Catara vd 2000, Catara vd 2002, Schaad vd 2002, Rameshkumar vd 2002, Kang vd 2003, Basım vd 2005, Schaad vd 2007, Guo vd 2007, Mavrodı vd 2007, Diallo vd 2009, Subramanian vd 2009, Cottyn vd 2009, Cottyn vd 2011, Alimi vd 2011, Licciardello vd 2011, Li vd 2011, Xu vd 2012, Heydari vd 2014).

Bakteriyel patojenlerin kesin tanı ve tespiti için son yıllarda Real-Time PCR yönteminden faydalanılmaktadır. Klasik PCR yöntemi, PCR işleminden sonra çoğaltılan DNA fragmentlerinin agaroz jelde yürütülmesi ve ethidium bromide ile boyanıp ultraviyole (UV) ışık altında görüntüleme gibi bir takım yan işlemlere ve uzun süreye gereksinim duymaktadır. Bu yöntemde, kesin sonuçlar elde edilmesine rağmen iş gücü ve zaman kayıpları fazla olmaktadır. Bu nedenle son yıllarda patojenlerin erken tanı ve tespitleri için klasik-PCR yönteminde yapılan agaroz jelde yürütme ve UV ışık altında DNA fragmetlerinin görüntülenmesi gibi ek işlemlere ihtiyaç duyulmadan daha

kısa sürede, kesin sonuç elde edebileceğimiz Real-Time PCR yöntemi geliştirilmiştir (Schaad vd 1999, Weller vd 2000, Wong ve Medrano 2005).

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 edilmektedir. Real-Time PCR yönteminde klasik PCR metoduna nazaran daha az miktarda (1-2 µl) DNA kullanılarak daha hassas ve doğru sonuçlar elde edilmektedir. Real-Time PCR yönteminde tüm işlem kapalı bir PCR tüpü içerisinde ve tek seferde gerçekleştiği için kontaminasyon (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 bir diğer üstünlüğünde kantitatif sonuçların daha güvenilir şekilde elde edilmesine imkan vermesidir (Schaad vd 1999, Weller vd 2000, Wong ve Medrano 2005, Pujol vd 2006, Mavrodi vd 2007, Basım ve Bozan 2011, Licciardello vd 2011, Cottyn vd 2011).

Real-Time PCR metoduyla patojenlerin tanı ve tespitleri iki şekilde yapılmaktadır. Bunlardan ilki patojenlerin DNA'sına spesifik olmayan ve DNA zincirleri arasına bağlanarak ışığa veren SYBR Green adı verilen boylarla yapılmaktadır. İkinci yöntem ise DNA'ya spesifik olan problarla (TaqMan, Moleküler Beacon, Scorpion vb.) yapılmaktadır. Bu çalışmada patojenlerin tanı ve tespitleri için DNA'ya spesifik TaqMan prob sistemi kullanılmıştır (Wong ve Medrano 2005, Licciardello vd 2011, Cottyn vd 2011).

Real-Time PCR metodunun dezavantajları arasında bu yöntemin şu an için ekonomik olmaması, çoğaltılan ürünün daha sonraki çalışmalarda kullanılamaması, Real-Time PCR işlemi için SYBR Green gibi DNA'ya spesifik olmayan floresan boyların kullanılması durumunda yanlış bağlanmalardan dolayı bazen tutarsız sonuçlar elde edilmesi, yeterli teknik bilgi ve iyi yetişmiş eleman ihtiyacı duyması gösterilebilir.

Çalışmada Prob olarak günümüzde kullanılan prob sistemlerinden biri olan LNA (Locked Nucleic Acid) problar kullanılmıştır. LNA prob sisteminde prob üzerinde yer alan DNA analogu monomerlerde bulunan şeker halkaları metilen bir köprü ile bağlandığından monomerlerin her biri spesifik bağlanma için en uygun konformasyon olan N konformasyonunda sabit kalabilmektedirler. Bu sayede kullanılan problar stabil olabilmektedir. Bu özellik spesifik olmayan bağlanmalara izin vermemekte ve probların spesifik bölgelere olan bağlanmalarını arttırmaktadır. LNA problara ait diziler tasarımları gereği Real-Time PCR ile yapılan diğer çalışmalarda kullanılan probların dizilerinden uzunluk olarak daha kısadır. Bu sayede prob dizisinin kendi içinde bağlanma olasılığı ortadan kalkmaktadır. Probların ve amplifiye edilen bölgenin kısa dizilerden oluşması amplifikasyon işleminin daha kısa sürede gerçekleşmesine olanak vermektedir. LNA probun kimyasal yapısı daha spesifik olarak çalışılmasını ve alınan sonuçların daha hızlı ve güvenilir olmasını sağlamaktadır. Bu çalışma ile LNA problar kullanılarak Real-Time PCR yönteminin önemi ve hassaslığı bir kez daha ortaya konulmuştur.

Real-Time PCR Yöntemin kolaylığı, tanı ve tespitlerin hızlı, güvenilir ve hassas şekilde gerçekleştirilebilmesi, direkt hastalıklı bitki dokularından 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 tespitleri yapılmıştır (Schaad vd 1999, Freeman vd 1999, Weller vd 2000, Van Beckhoven vd 2002, Salm ve Geider 2004, Basım ve Basım 2004, Cubero ve Graham 2005, Berg vd 2006, Basım ve Yılmaz 2005, Pujol vd 2006, Basım ve Basım 2007, Bellis vd 2007, Mavrodi vd 2007, Benlioğlu ve Özyılmaz 2007, Dreo vd 2007, Luo vd 2008, Basım ve Basım 2009, Basım ve Çaplık 2009, Gottsberger 2010, Basım ve Bozan 2011, Basım ve Öztürk 2011, Licciardello vd 2011, Cottyn vd 2011, Johnson ve Walcott 2012, Gallelli vd 2014).

Öz nekrozu hastalığına neden olan patojenlerin doğru, güvenilir, hassas tanı ve tespitinin büyük önem arz etmesine rağmen öz nekrozu hastalık etmenleri *Pseudomonas corrugata* ve *Pseudomonas mediterranea*'nın Real-Time PCR ile tanısına yönelik çalışmalar 2005 yılında Basım ve Yılmaz, 2011 yılında Licciardello ve ark. tarafından yapılmıştır. *Pseudomonas fluorescens*'e ait Real-Time PCR çalışmaları Pujol ve arkadaşları 2006 ve Mavrodi ve arkadaşları tarafından 2007 yılında biyolojik mücadelede *Pseudomonas fluorescens*'in varlığını ve etkinliğini kantitatif olarak belirlemek amaçlı yapılmıştır. *Pseudomonas cichorii* patojenine ait Real-Time PCR çalışmaları 2011 yılında Cottyn ve arkadaşları tarafından marullarda ciddi kayıplara neden olan *Pseudomonas cichorii*'nin erken tanı ve tespitinin yapılması amacıyla geliştirilmiştir.

Basım ve Yılmaz (2005), *P. corrugata* ve *P. mediterranea*'nın tespitinde klasik PCR yönteminin hassasiyeti sırasıyla  $1.5 \times 10^6$  hücre/ml ve  $1.0 \times 10^6$  hücre/ml iken, RT-PCR yönteminde hassasiyet her iki patojen bakteri için klasik PCR' a göre 10 000 kez daha hassas düzeyde *P. corrugata* için  $1.8 \times 10^2$  bakteri/ml ve *P. mediterranea* için  $1.6 \times 10^2$  hücre/ml olarak belirlemişlerdir. Çalışmada kullanılan Real-Time PCR yönteminde yalnızca çift sarmallı DNA'ya bağlandıklarında floresan ışığa veren bir boya olan SYBR Green tekniği kullanılmışlardır. Diğer metotlara göre çok daha ekonomik olması, çalışmanın kantitatif analizden çok bakterinin varlığına ve tanısına yönelik hedefler içermesi nedeniyle kullanılan SYBR Green tekniği, sadece çift sarmallı DNA'ya bağlanıp amplifikasyon olduğu sürece floresan yaymaktadır. Fakat bazı çalışmalarda kontaminasyon yada istenmeyen bağlanmalardan kaynaklanan amplifikasyonlar ortaya çıkmaktadır. SYBR Green bu bağlanmaları da amplifikasyon olarak verdiği için bazen yanlış sonuçlara neden olmakta bu da çalışmanın hassasiyetini düşürmektedir.

Pujol vd (2006), elma ağaçlarında *Erwinia amylovora* neden olduğu ateş yanıklığı hastalığına karşı biyolojik mücadele ajanı olarak kullanılan *Pseudomonas fluorescens* EPS62e straininin elma çiçek ve yapraklarında kolonize olan populasyon dinamiğinin izlenmesi amacıyla Real-Time PCR yöntemini kullanmışlardır. Çalışmalarında 67 *Pseudomonas fluorescens* straini ve yakın akraba olan 30 farklı *Pseudomonas* staini denemişlerdir. SCAR 450R, 900F primerlerini kullanarak elde ettikleri sekans diziliminden 83 bp'lik amplicon veren Q 450F (5'-AATGGGCTTGCGTCGAGTT-3'), SCAR 450R (5'-

CGGTTAGATCCGACAAGATTAG-3') primerleri ile 450 PBR VIC-CCGCCACTACCAGGCTATTCAGCTGC-TAMRA TaqMan probu ve 65 bp'lik amplicon veren SCAR 900F (5'-CTCGCGTTGAGAGCAGAGAAC-3'), Q 900R (5'-TGTGCCCAATTAGAAGCTGTTG-3') primerleri ile 900 PBR FAM-CTCGATGGCCCTCACCAGGC-TAMRA TaqMan probunu dizayn etmişlerdir. Çalışmada *Pseudomonas fluorescens* strainlerin tanısı Real-Time PCR ile kısa sürede yapılmıştır. Populasyonda zamana bağlı artış çiçeklerde düzenli olarak devam ederken, yapraklarda Real-Time PCR sonuçları ile kültürde geliştirilen bakteri sayısında farklılıklar ortaya çıkmıştır. Bu durumun yapraklarda var olan ama ölmüş bakteriyel hücreler ya da ortamda canlı bulunan kültürde geliştirilemeyen (viable but nonculturable (VBNC) evresinde olan) bakterilerden kaynaklı olduğunu saptamışlardır. Çalışmada sonuç olarak *Pseudomonas fluorescens* EPS62 strainin populasyonu uygun koşullarda çiçeklerde artarken, yapraklarda stres koşullarında azalmalar görülebileceği ortaya konulmuştur. Strainin biyolojik olarak etkinliği ve varlığının kontrolü için hem kültür ortamında geliştirme hem de Real-Time PCR işleminin eş zamanlı olarak yapılması gerektiği bu çalışmayla ortaya konulmuştur.

Mavrodi vd (2007), biyolojik mücadelede kullanılan 2,4-Diacetylphloroglucinol-üreten *Pseudomonas fluorescens* strainlerinin bitki rizosferinden tanılarını real-time PCR ile yapmak amacıyla primer dizayn etmişler ve tanılamada SYBR Green (Synergy Brands) kullanılmıştır. Çalışmalarında *phlD* genine sahip *phlD*<sup>+</sup> *P. fluorescens* A (Pf-5), B (Q2-87), D (Q8r1-96 and FTAD1R34) ve I (FTAD1R36) strainlerin her birine özel Real-Time primer ve protokolleri hazırlamışlardır. Çalışma sonucunda geliştirilen real-time PCR ile *Pseudomonas fluorescens*'in populasyon yoğunluğu ve tespiti direkt bitki rizosferinden ve topraktan yapılabilmektedir. Ancak çalışmada kullanılan SYBR Green tekniği sadece çift sarmallı DNA'ya bağlanıp amplifikasyon olduğu sürece floresan yaymaktadır. Bundan dolayı kontaminasyon ya da istenmeyen bağlanmalardan kaynaklanan amplifikasyonlar ortaya çıktığı durumlarda da ışığa vermekte SYBR Green bu bağlanmaları da amplifikasyon olarak verdiği için bazen yanlış sonuçlara neden olmakta bu da çalışmanın hassasiyetini düşürmektedir.

Licciardello vd (2011), yakın akraba olup domateslerde benzer simptom gösteren öz nekrozu patojenlerinden *Pseudomonas corrugata* ve *Pseudomonas mediterranea*'nın tespiti için hızlı ve hasas bir yöntem olan Dublex Real-Time PCR metodunu kullanmışlardır. Çalışmada (PC5/1, PC5/2, PC1/ 1, PC1/2)(Catara vd 2002) klasik PCR primerlerini kullanmışlar elde ettikleri fragmentlerden Real -Time primer ve prob setleri dizayn etmişlerdir. *Pseudomonas corrugata* Real-Time ile tespiti için 149 bp DNA fragmenti veren PcoFw (5'-GGTGGTATCGGTTGCGTAGCG-3'), PcoRew (5'-GTGGGAACGTTTGGGCCTGG-3') primerlerini, *Pseudomonas mediterranea*'nın Real-Time ile tespiti için 85 bp DNA fragmenti veren PmeFor (5'-CTGTCCGAGACGATGGCGAC-3'), PmeRew(5'CAGACGTGGCCTCAAGCAGAT 3') primerlerini ve *P. corrugata* için Pco (5'FAM-CCGCCCCATCTGCCACCCTGC-3' BHQ-1) ve *P. mediterranea* için Pme (5'TXR-CCCGCTCATCCGCTGGACCGGC-3'BHQ-2) TaqMan problemlerini kullanmışlardır. Geliştirdikleri primer ve TaqMan prob setleriyle tek PCR tüpünde patojenlerin tespitini ve tanılarını kısa ve hasas bir şekilde yapmışlardır. Geliştirilen primer ve prob setleri aynı PCR reaksiyonunda multipleks PCR gerçekleştirildiğinde hem *Pseudomonas corrugata* hem de *Pseudomonas mediterranea* strainlerinin tespit edilebildiği belirlenmiş olsa da, diğer öz



nekrozu patojenlerini tespit etmediğinden çalışma diğer öz nekrozu patojenlerinin tanısı için yetersizdir.

Cottyn vd (2011), *Pseudomonas cichorii* patojeninin marullarda meydana getirdiği hastalıkla mücadele edilebilmesi için geleneksel tanı metotlarından ziyade doğru ve kısa sürede sonuç veren ve bakterinin populasyon yoğunluğunun kısa sürede belirlenmesini sağlayan moleküler yöntemlerden Real-time PCR yöntemini hastalığın tespiti amacıyla kullanmışlardır. Yapılan çalışmada patojenisiteden sorumlu *hrcRST* gen bölgesini çoğaltan *hrp1a*, *hrp2a* klasik PCR primerleri kullanılarak elde edilen 897bp'lik fragmentin sekans analizi yapılmış. Elde edilen diziden 90 bp'lik amplicon veren Real-Time primerleri; PscHrc662F (22-mer [5'-AGGCTTTATGGAAACCCTGACG-3']) ve PscHrc751R (20-mer [5'-ACAATCACCGCCACGATCAG-3']), TaqMan Minor Groove Binding (MGB probe) PscHrcMGB687 (16-mer [5'-FAM-TTCAAGCAGGCCATGT-MGB-NFQ-3']) probu kullanılmıştır. Çalışmada geliştirilen Real-Time primer ve probun spesifikliğini belirlemek amacıyla 39 *Pseudomonas cichorii* straini ve 89 farklı *Pseudomonas* türleri test edilmiştir. Yöntemin ve kullanılan primer- prob setinin hasasiyetinin belirlenmesi için farklı seyreltmeler test edilmiştir. Daha önceki yıllarda araştırmacılar tarafından yapılan klasik PCR denemeleriyle karşılaştırılan sonuçlarda klasik PCR ile test edilemeyen düşük miktardaki bakteri yoğunluğunun bu yöntem ile tespit edilebildiği ortaya çıkarılmıştır. Sıcaklık, nem gibi fiziksel faktörlerin yanı sıra *Pseudomonas cichorii* patojeninin yeterli miktarda varlığının enfeksiyonun oluşması açısından önemli bir etken olduğu yapılan kantitatif Real-Time PCR yöntemiyle saptanmıştır.

Bu çalışma, domates bakteriyel öz nekrozuna neden olan *Dickeya chrysanthemi*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pseudomonas cichorii*, *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mediterranea* ve *Pseudomonas viridiflava*'nın tanı ve tespitine dair ülkemizde ve Dünya'da LNA prob kullanılarak gerçekleştirilen ilk Real-Time PCR çalışmasıdır.

Yapılan bu çalışmada domates bitkisinde kalite ve verimde önemli kayıplara sebep olan toprak kökenli patojenik bakteriyel etmenler *Dickeya chrysanthemi*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pseudomonas cichorii*, *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mediterranea* ve *Pseudomonas viridiflava*'nın bakteriyel hücreden ve hastalıklı bitki dokularından LNA prob kullanılarak direkt tanı ve tespitleri Real-Time PCR yöntemi ile kısa sürede kesin bir şekilde gerçekleştirilebilmiştir. Öz nekrozu patojenlerinin Real-Time PCR yöntemiyle tanısı için *Dickeya chrysanthemi hrp/hrc* gen, *Pseudomonas cichorii hrcRST* gen, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum pel* gen (pectate lyase gene), *Pseudomonas corrugata* RAPD PCR fragmentlerinin sekans analiz diziliminden, *Pseudomonas fluorescens* 16S-23S rRNA, *Pseudomonas mediterranea* RAPD PCR fragmentlerinin sekans analiz diziliminden ve *Pseudomonas viridiflava* 16S rRNA bölgelerine ait dizilerden prob ve primerler tasarlanmıştır. Tasarlanan primer ve prob setleri test etmek amacıyla *Dickeya chrysanthemi* DSM-4610 straini, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* DSM-30168 straini, *Pseudomonas cichorii* DSM-50259 straini, *Pseudomonas corrugata* CFBP-2431, BPIC-870, ICMP-5819 strainleri, *Pseudomonas fluorescens* 11.1-1, 9.1-6 Makedonya strainleri, *Pseudomonas mediterranea* CFBP-5404, CFBP-5447, DSM-16733 strainleri, *Pseudomonas viridiflava* LMG-2352, LMG-

2353, DSM-11124 strainleri tedarik edilip çalışmaya eklenmiştir. Geliştirilen yöntem ile yerli ve yabancı tüm strainlerin tanı ve tespitleri başarıyla gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışmada geliştirilen Real-Time PCR yöntemlerinde LNA probu kullanıldığından diğer araştırmacılar tarafından gerçekleştirilen Real-Time PCR protokollerinden çok daha hassas ve kesin sonuçlar vermektedir. Daha önce klasik PCR yöntemi ile *Dickeya chrysanthemi* straininin tanı ve tespitinde çoğaltılan 171 bp, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* straininin tanı ve tespitinde 550 bp, *Pseudomonas cichorii* straininin tanı ve tespitinde 897 bp, *Pseudomonas corrugata* strainlerin tanı ve tespitinde 1100 bp, *Pseudomonas fluorescens* straininin tanı ve tespitinde 560 bp, *Pseudomonas mediterranea* straininin tanı ve tespitinde 600 bp, *Pseudomonas viridiflava* straininin tanı ve tespitinde 180 bp'lik DNA fragmentleri çoğaltılmıştır. Real-Time PCR yönteminde ise *Dickeya chrysanthemi* straini için 65 bp, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* straini için 63 bp, *Pseudomonas cichorii* straini için 73 bp, *Pseudomonas corrugata* straini için 70 bp, *Pseudomonas fluorescens* straini için 70 bp, *Pseudomonas mediterranea* straini için 73 bp ve *Pseudomonas viridiflava* straini için 77 bp uzunluğunda fragmentler çoğaltılmıştır. Çoğaltılması hedeflenen bölgelerin kısa olması, polimerizasyon reaksiyonu esnasında tespit için gerekli DNA amplifikasyonunun daha kısa sürede gerçekleşmesini sağlamak ve belirlenen PCR protokollerinde döngülerin daha kısa sürelerde tamamlanmasına olanak sağlamaktadır. *Dickeya chrysanthemi*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pseudomonas cichorii*, *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mediterranea* ve *Pseudomonas viridiflava* etmenlerinin tanı ve tespitinde kullanılan 30-35 döngülük klasik PCR yöntemleri, 100-155 dakikada tamamlanırken 35 döngülük Real-Time PCR yöntemleri 33 dakikada tamamlanmaktadır. Ayrıca Real-Time PCR sistemi PCR prosesinin bir bilgisayar aracılığı ile gerçek zamanlı olarak kontrol edilebilmesine ve işlemin istenildiğinde sonlandırılmasına olanak verdiği için; sonuç döngülerin tamamlanmasından önce elde edilebilmektedir. Gerçekleştirilen çalışmalar neticesinde Real-Time PCR ile *Dickeya chrysanthemi*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pseudomonas cichorii*, *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mediterranea* ve *Pseudomonas viridiflava* etmenlerinin yaklaşık 20 dakikada tanılabildiği saptanmıştır.

Klasik PCR yönteminde tespit gerçekleştirilmesi için ortamda bulunması gereken bakteri yoğunluğu genellikle  $5 \times 10^2$  ve  $1 \times 10^4$  cfu/ml arasında değiştiği rapor edilmiştir (Cottyn vd 2011). Bu çalışmada geliştirilen yöntemin bakteriyel hücre hassasiyet sınırı *Dickeya chrysanthemi* için 2 hücre, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* için 4 hücre, *Pseudomonas cichorii* için 4 hücre, *Pseudomonas corrugata* için 4 hücre, *Pseudomonas fluorescens* için 5 hücre, *Pseudomonas mediterranea* için 5 hücre, *Pseudomonas viridiflava* için 2 hücre olarak tespit edilmiştir. Geliştirilen yöntemin DNA düzeyindeki hasasiyet sınırı ise *Dickeya chrysanthemi* için 12 pg, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* için 11 pg, *Pseudomonas cichorii* için 14 pg, *Pseudomonas corrugata* için 14 pg, *Pseudomonas fluorescens* için 14 pg, *Pseudomonas mediterranea* için 13 pg, *Pseudomonas viridiflava* için 12 pg düzeyine kadar tespit edilmiştir. Bu çalışmada geliştirilen Real-Time PCR metodu ile kullanılan LNA probu genomdaki çoğalan kısmın seçicilik, hassaslık ve tekrarlanabilirliğini sağlamıştır. Bunun yanında, Real-Time PCR, *Dickeya chrysanthemi*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pseudomonas*

*cichorii*, *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mediterranea* ve *Pseudomonas viridiflava*'nın direkt hastalıklı domates bitkilerinin gövdelerinin öz kısmından tespiti başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Direkt bitki dokusundan tanı ve tespit imkânı, Real-Time PCR işleminin sağlıklı sonuç vermesi için bakteriyel izolasyonun yapılması gerekliliğini ortadan kaldırmış, sistemin uygulanabilirliğini ve hızını büyük ölçüde arttırmıştır. Bitki patojeni bakterilerin tanı ve tespitlerini taşınabilir Real-Time PCR cihazları ile yapılabilme olanağı, hedef patojenlerin dışındaki bitki patojenlerinin laboratuvara taşınmasının ve kültüre alınmasının önüne geçebilecektir. Bu çalışma, öz nekrozu patojeni bakterilerin yerinde ve kısa sürede tespit ve tanılarının yapılabilmesine de olanak sağlamıştır.

## 6. SONUÇ

Dünya’da yetiştiricilik yapılan alanların daralması ve mevcut tarım alanlarından elde edilen ürün miktarının artan gıda talebi için yetersiz olması bilim insanlarında birim alandan daha fazla ürün elde etme çabasına itmiştir. İçerdiği çeşitli mineral ve vitaminler ile insan sağlığı için yararlı gıda maddelerinden biri olan domates Dünya’da yaygın olarak üretimi yapılan ve severek tüketilen en önemli sebze türlerinden biridir. Son yıllarda üretimi ve önemi gittikçe artan ve üreticiye iyi gelir sağlayan domates hem tarla hemde örtü altı sebze yetiştiriciliğinde en fazla üretilen sebzelerin başında gelmektedir.

Domateslerde meydana gelen hastalıklardan en önemlilerinden biri domates bakteriyel öz nekrozu hastalığıdır ve farklı bakteriyel patojenler tarafından bu hastalık oluşturulabilmektedir. Öz nekrozu hastalığı, Dünya çapında domates yetiştiriciliği yapılan bölgelerin hemen hemen tamamında karşılaşılan, ekonomik açıdan en yıkıcı hastalıklardan biridir. Domateslerde öz nekrozu hastalığına neden olan bakteriyel hastalık etmenleri *Dickeya chrysanthemi*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pseudomonas cichorii*, *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mediterranea* ve *Pseudomonas viridiflava*’dır. Yüksek oranlı nem, aşırı azotlu gübreleme ve düşük gece sıcaklıkları, bakteriyel etmenlerin yayılması ve hastalığın gelişimi üzerine arttırıcı etki yapmaktadır. Domateslerde öz nekrozu hastalığına genellikle geç sonbahar, kış ve erken ilkbahar dönemlerinde Kasım ile Mart ayları arasında rastlamak mümkündür. Esas olarak örtü altında sorun yaratır. Aşırı azotlu düzensiz gübreleme hastalığı teşvik etmektedir. Hastalık kuvvetli, kalın gövdeli bitkilerde daha fazla görülmektedir. Bunun nedeni olarak yaprak ve koltuk alma işlemleri sırasında açılan yara dokusunun kalın gövdeli bitkilerde daha büyük olması ve patojenlerin bu yara dokularından enfeksiyon meydana getirmesidir. Ayrıca gevşek dokulu sucul bitkilerde öz nekrozu patojenleri daha hızlı enfeksiyon meydana getirmektedir.

Ülkemizin ve diğer Dünya ülkelerinin bir çok bölgesinde yaygın olan Öz Nekrozu Hastalık etmenleri hem domateslerde hemde farklı konukçularda ciddi ürün ve kalite kayıplarına sebebiyet vermektedir. Kalite kayıpları nedeniyle ürünlerin pazar değeri düşmekte ve ekonomik açıdan da kayıplar oluşmaktadır. Bu doğrultuda domates de öz nekrozu hastalığına neden olan *Dickeya chrysanthemi*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pseudomonas cichorii*, *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mediterranea* ve *Pseudomonas viridiflava* patojenleri bu çalışmada ele alınmış, bu patojenlerin hızlı tanı ve tespitleri için etkili, hassas ve kesin sonuç elde edebileceğimiz Real-Time PCR yöntemi geliştirilmiştir. Tanı ve tespitlerde uygulanan PCR protokolleri optimize edilerek analizin yaklaşık 15 ila 20 dakika içinde sonuçlanabilir niteliğe kavuşması sağlanmıştır. Termal erime eğrileri ile primer setleri ve proplar ile gerçekleştirilen amplifikasyonların tek bir diziyeye spesifik olduğu gösterilmiştir. Proplar ve primerlerin sadece *Dickeya chrysanthemi*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pseudomonas cichorii*, *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mediterranea* ve *Pseudomonas viridiflava* patojenlerine ait DNA dizisine uygun olduğu için farklı strainlerin test edilmesi sırasında amplifikasyonun meydana geldiği, diğer farklı bakterilerin DNA dizisiyle uyuşmadığı için amplifikasyonun meydana gelmediği ortaya konmuştur. Bu

uygulamanın amacı primerler ve problemlerin sadece *Dickeya chrysanthemi*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pseudomonas cichorii*, *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mediterranea* ve *Pseudomonas viridiflava* patojenlerine spesifik olduklarını ortaya koymaktır. Böylece hastalıklı bir bitki materyalinin analizi yapılırken materyal başka bir bakteriyle bulaşık dahi olsa amplifikasyon oluşumunun meydana gelmeyeceği belirlenmiştir. Bu primerler ve problemlerin *Dickeya chrysanthemi*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pseudomonas cichorii*, *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mediterranea* ve *Pseudomonas viridiflava*'nın diğer strainleriyle de uyuştuğunu ortaya koymak için ise Türkiye'nin ve diğer ülkelerin farklı bölgelerinden toplanan hastalıklı bitki örneklerinden izole edilmiş olan ve şu an Akdeniz Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Fitopatoloji Anabilim Dalı, Bakteriyoloji Laboratuvarında Prof. Dr. Hüseyin BASIM'a ait kültür stoklarında yer alan *Dickeya chrysanthemi*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pseudomonas cichorii*, *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mediterranea* ve *Pseudomonas viridiflava* strainleri üzerinde test edilmiştir. Test sonucunda meydana gelen amplifikasyonla farklı strainlerinde tespitinin yapılabileceği belirlenmiştir.

Patojen bakterilerin bitkideki popülasyonu hastalığın ilk aşamalarında az sayıda olabilmektedir. Az sayıdaki bakteri popülasyonunun bile tespit edilebildiğini ortaya koymak için ise farklı seyreltmeler hazırlanarak, bu seyreltmeler *Dickeya chrysanthemi*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pseudomonas cichorii*, *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mediterranea* ve *Pseudomonas viridiflava*'ya spesifik primerler ve problemler kullanılarak Real-Time PCR'da test edilmiştir. Geliştirilen Real-Time PCR yöntemleriyle bakteriyel hücre hassasiyet sınırı *Dickeya chrysanthemi* için 2 hücre, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* için 4 hücre, *Pseudomonas cichorii* için 4 hücre, *Pseudomonas corrugata* için 4 hücre, *Pseudomonas fluorescens* için 5 hücre, *Pseudomonas mediterranea* için 5 hücre, *Pseudomonas viridiflava* için 2 hücre olarak tespit edilmiştir. Geliştirilen yöntemin DNA düzeyindeki hassasiyet sınırı ise *Dickeya chrysanthemi* için 12 pg, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* için 11 pg, *Pseudomonas cichorii* için 14 pg, *Pseudomonas corrugata* için 14 pg, *Pseudomonas fluorescens* için 14 pg, *Pseudomonas mediterranea* için 13 pg, *Pseudomonas viridiflava* için 12 pg düzeyine kadar tespit edilmiştir. Bu çalışmada Real-Time PCR metodu ile kullanılan LNA prob genomdaki çoğalan kısmın seçicilik, hassaslık ve tekrarlanabilirliğini sağlamıştır.

Bu çalışmada geliştirilen yöntemin yaygınlaştırılması sonucunda, daha kısa sürede *Dickeya chrysanthemi*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pseudomonas cichorii*, *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mediterranea* ve *Pseudomonas viridiflava* patojenlerinin hastalıklı bitki dokularından arazi koşullarında tespitinin kolay, pratik bir şekilde yapılması mümkün olabilecektir. Çalışma ile bitkide aynı dönemde bulunup ve aynı semptomlara neden olan öz nekrozu patojenlerin tanısının moleküler yöntemlerle yapılması hangi patojenin hastalığı oluşturduğunun kısa sürede saptanmasına olanak sağlamıştır.

Bu çalışma, gelecekte yapılacak domates öz nekrozu hastalık etmeni patojenik bakteriyel türlerin dağılımı ve bu türlere ait çok sayıda izolatin elde edilebilmesini katkı

sağlayacaktır. Farklı izolatlarla daha sonra yapılacak çalışmalarla genotipik farklılıkların ortaya konmasıyla patojenlerin farklı strainleri doğru olarak elde edilebilecektir. Böylelikle ileride yapılacak öz nekrozuna karşı bitki dayanıklılık çalışmalarında bu farklı strainlerin kullanılması büyük önem taşımaktadır. Bu açıdan bu çalışma, farklı domates öz nekrozu bakteriyel patojenik türlerin kısa sürede kesin tanısına ve ileriki çalışmalarda farklı strainlerin elde edilmesine olanak sağlayacak olması bakımından önem taşımaktadır. Böylelikle bu çalışma bu konuda yapılacak bilimsel çalışmalara hem teorik yönden hem de pratik yönden önemli katkılar sağlayabilecektir.

## KAYNAKÇA

- ABDALLA, M.E. 2000. Detection and identification of seed-borne pathogenic bacteria of imported tomato seeds in Egypt. *EPPO Bulletin*, 30: 327-331.
- ACHOUAK, W., THIERY, M., ROUBAUD, P. and HEULIN, T. 2000. Impact of crop management on intraspecific diversity of *P. corrugata* in bulk soil. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 31: 11-19.
- ALCORN, S.M., ORUM, T.V., STEIGERWALT, A.G., FOSTER, J.L.M., FOGLEMAN, J.C. and BRENNER, D.J. 1991. Taxonomy and pathogenicity of *Erwinia cacticida* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 41: 197-212.
- ALIMI, M., RAHIMIAN, H., HASSANZADEH, N., DARZI, M.T., AHMADIKHAH, A., HEYDARI, A. and BALESTRA, G.M. 2011. First detection of *Pseudomonas viridiflava*, the causal agent of blossom blight in apple by using specific designed primers. *Afr. J. Microbiol. Res.*, 5 (26): 4708-4713.
- ALIPPI, A.M., RONCO, L. and ALIPPI, H. E. 1993. Tomato Pith Necrosis caused by *Pseudomonas corrugata* in Argentina. *Plant Dis.*, 77: 428.
- ALIPPI, A.M. et al. 1996. First report of bacterial spot of celery caused by *Pseudomonas cichorii* in Argentina. *Plant Dis.*, 80: 599.
- ALIPPI, A.M. and WOLCAN, S. 2000. First report of bacterial leaf spot of basil caused by *Pseudomonas viridiflava* in Argentina. *Plant Dis.*, 83: 876.
- ALIPPI, A.M. et al. 2002. Fluorescent *Pseudomonas* species causing post-harvest decay of endives in Argentina. *Rev. Argent. Microbiol.*, 34 (4): 193-198.
- ALIPPI, A., DAL, B.E., RONCO, L.B., LOPEZ, M.V., LOPEZ, A.C. and AGUILAR, O.M. 2003. *Pseudomonas* populations causing pith necrosis of tomato and pepper in Argentina are highly diverse. *Plant Pathol.*, 52: 287-302.
- ALIVIZATOS, A.S. 1984. A Etiology of Tomato Pith necrosis in Greece. Proceedings of the Second Working Group *Pseudomonas syringae* patovars. *Hellenic Phytopathological Society*, 5: 55-57.
- ALIVIZATOS, A.S. 1985. Bacterial wilt of tomato in Greece caused by *Erwinia chrysanthemi*. *Plant Pathol.*, 34: 368-369.
- ALIVIZATOS, A.S. 1986. Tomato pith necrosis caused by *Pseudomonas viridiflava*. *Ann. Inst. Phytopathol. Benaki*, 15: 41-47.
- ALMEIDA, I.M.G., MACIEL, K.W., NETO J.R. and BERIAM, L.O.S. 2013. *Pseudomonas viridiflava* in imported carrot seeds. *Plant Dis. Notes*, 8: 17-19.
- ALTIN, N. ve BORA, T. 2001. Patates yumuşak çürüklük etmeni, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Jones) Bergey et al.'ya karşı fluorescent *Pseudomonas*'larla biyolojik savaş araştırmaları. Türkiye IX. Fitopatoloji Kongresi, ss. 104-110, 3-8 Eylül, Tekirdağ.
- ANDERSSON, R.A., KOIV, V., SETTERBLAD, C.N. and PIRHONEN, M. 1999. Role of *RpoS* in virulence and stress tolerance of the plant pathogen *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Microbiology*, 145: 2547-3556.
- ANONIM, 2007 <http://faostat.fao.org> (Son erişim tarihi: 15.10.2014)
- ANONIM, 2008-a MEGEP, T.C. Milli Eğitim Bakanlığı Mesleki Eğitim ve Öğretim Sisteminin Güçlendirilmesi Projesi, Ankara.
- ANONIM, 2008-b <http://www.nal.usda.gov> (Son erişim tarihi: 06.08.2014)
- ANONIM, 2009 <http://www.tuik.gov.tr> (Son erişim tarihi: 03.11.2014)
- ANONIM, 2011 <http://www.tagem.gov.tr> (Son erişim tarihi: 24.06.2014)
- ANONIM, 2012 <http://faostat.fao.org> (Son erişim tarihi: 15.07.2014)

- ANONIM, 20013 <http://www.tuik.gov.tr> (Son erişim tarihi: 08.11.2013)
- ANONIM, 2014-a <http://www.tarimtv.gov.tr> (Son erişim tarihi: 27.10.2014)
- ANONIM, 2014-b <http://www.exiqon.com> (Son erişim tarihi: 12.09.2014)
- ANONIM 2014-c <http://thetomato.weebly.com> (Son erişim tarihi: 23.09.2014)
- ANONIM 2014-d <http://tr.wikipedia.org> (Son erişim tarihi:14.10.2014)
- ANONIM, 2014-e <http://www.plantwise.org> (Son erişim tarihi:16.10.2014)
- ASSELBERGH, B., ACHUO, A.E., HOFTE, M. and VAN GIJSEGEM F. 2008. Abscisic acid deficiency leads to rapid activation of tomato defence responses upon infection with *Erwinia chrysanthemi*. *Mol. Plant Pathol.*, 9 (1): 11-24.
- ATALLAH, Z. K. and STEVENSON, W. R. 2006. A methodology to detect and quantify five pathogens causing potato tuber decay using Real-Time quantitative polymerase chain reaction. *The American Phytopathological Society*, 96 (9): 1037-1045.
- ATKINS, S.D. and CLARK, I.M. 2004. Fungal molecular diagnostics: a mini review. *J. Appl. Genet.*, 45: 3-15.
- AVROVA, A.O., HYMAN, L.J., TOTH, R.L. and TOTH, I.K. 2002. Application of amplified fragment length polymorphism fingerprinting for taxonomy and identification of the soft rot bacteria *Erwinia carotovora* and *Erwinia chrysanthemi*. *App. Env. Microbiol.*, 68: 1499-1508.
- AYBAK, H.Ç. ve KAYGISIZ, H., 2004. Domates. Hasad Yayıncılık Ltd. Şti., 280s.
- AYSAN, Y. ve YILDIZ, N. 2000. Effect of plant extracts on tomato stem necrosis. *IOBC/WPRS Bull.*, 23 (1): 59-62.
- AYSAN, Y. ve ÇINAR, Ö. 2001. Doğu Akdeniz Bölgesi domates seralarında bakteriyel gövde nekrozu hastalığının yaygınlığı ve bu seralarda yapılan gözlemler. Türkiye IX. Fitopatoloji Kongresi Bildirileri, ss. 51-56, 3-8 Eylül, Tekirdağ.
- AYSAN, Y. 2003. Bacterial rot of lettuce caused by *Pseudomonas cichorii* in Turkey. *Plant Pathol.*, 52: 782.
- AYSAN, Y., MİRİK, M., ALA, A., SAHİN, F. and ÇINAR, O. 2003. First report of *Pseudomonas viridiflava* on melon in Turkey. *Plant Pathol.*, 52: 800.
- AYSAN, Y., KARATAŞ, A. and ÇINAR, O. 2003. Biological control of bacterial stem rot caused by *Erwinia chrysanthemi* on tomato. *Crop Prot.*, 22: 807-811.
- AYSAN, Y., YILDIZ, N. and YÜCEL, F. 2004. Identification of *Pseudomonas viridiflava* on tomato by traditional methods and enzyme-linked immunosorbent assay. *Phytopathology/Mycology. Phytoparasitica*, 32 (2): 146-153.
- AYSAN, Y., ÇETİNKAYA, R.Y., MİRİK, M., KUSEK, M. and ŞAHİN, F. 2006. Bacterial soft rot disease on various hosts in Turkey. 12<sup>th</sup> Mediterranean Phytopathological Congress, pp. 250-254, 11-15 June, Rhodes Island, Greece.
- BABU, G.P., CHAKRAVARTHY, D., KUMAR, J.K. and PARAMAGEETHAM, C. 2013. Biochemical characterization of phosphate degrading *Pseudomonas cichorii* isolated from forest soils in seshachalam hills. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 2: 2320-3528.
- BALTRUS, D.A., YOURSTONE, S., LIND, A., GUILBAUD, C., SANDS, D.C., JONES, C.D., MORRIS, C.E. and DANGL, J.L. 2014. Draft genome sequences of a phylogenetically diverse suite of *Pseudomonas syringae* strains from multiple source populations. *Genome Announc.*, 2 (1): 23.
- BARRAS, F., THURN, K.K. and CHATTERJEE, A.K. 1987. Resolution of four pectate lyase structural genes of *Erwinia chrysanthemi* (EC16) and



- characterization of the enzymes in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.*, 209: 319-325.
- BARRAS, F., VAN GIJSEGEM, F. and CHATTERJEE, A.K. 1994. Extracellular enzymes and pathogenesis of soft-rot *Erwinia*. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 32: 201-34.
- BASIM, H. ve ÖZTÜRK, Ş.B. 2000. Antalya ve çevresindeki sera domateslerinde görülen bakteriyel hastalıklar ve çözüm önerileri. III. Sebze Tarımı Sempozyumu, ss. 199-202, 11-13 Eylül, Isparta.
- BASIM, E. ve BASIM, H. 2004. Multiplex-Bio PCR ile domates bakteriyel patojenlerinin moleküler tanısı. Türkiye I Bitki Koruma Kongresi Bildirileri, ss. 144, 8-10 Eylül, Samsun.
- BASIM, H., BASIM, E., YILMAZ, S. and ILKUÇAN, M. 2005. First report of pith necrosis of tomato caused by *Pseudomonas mediterranea* in Turkey. *Plant Pathol.*, 54: 240.
- BASIM, H. and YILMAZ, S. 2005. Identification and detection of *Pseudomonas corrugata* and *Pseudomonas mediterranea* by Multiplex-PCR and Real-Time PCR. *Phytopathology*, 96: 128.
- BASIM, H. ve BASIM, 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.
- BASIM, E. ve BASIM, H. 2009. Batı Akdeniz Bölgesi'ndeki bağ alanlarında Pierce Hastalığı etmeni *Xylella fastidiosa*'nın tanısı, tespiti ve moleküler karakterizasyonu. Türkiye III. Bitki Koruma Kongresi, ss. 156, 15-18 Temmuz, Van.
- BASIM, H. ve ÇAPLIK, D. 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, ss. 138, 15-18 Temmuz, Van.
- BASIM, H. ve ÖZTÜRK, N. 2011. Fasulye Bakteriyel Yaprak Yanıklık (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*) ve Bakteriyel Hale Lekesi (*Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*) etmenlerinin LNA probeu kullanılarak Real-Time PCR ile tespiti ve tanılanması. Türkiye IV. Bitki Koruma Kongresi, ss. 59, 28-30 Haziran, Kahramanmaraş.
- BASIM, H. ve BOZAN, G. 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 s.
- BAŞ, B. ve ÇINAR, Ö. 1995. Domates öz nekrozu etmeni *Pseudomonas corrugata* (Scarlett et al)'nın tanısı. VII. Türkiye Fitopatoloji Kongresi, ss. 392-421, 26-29 Eylül, Adana.
- BAYDA, B. and WARRAK, W. 1990. First record of tomato wilt and pith necrosis in Syria. I. Disease symptoms, characterization of the causal organism and some conditions predisposing plants to infection. *Arab. J. Pl. Prot.*, 8: 88-95.
- BEDINI, S., BAGNOLI, G., SBRANA, C., LEPORINI, C., TOLA, E., DUNNE, C., FILIPPI, C., D'ANDREA, F., O'GARA, F. and NUTTI, M.P. 1999. *Pseudomonas* isolated from within fruit bodies of *Tuber borchii* are capable of producing biological control or phytostimulatory compounds in pure culture. *Symbiosis*, 26: 223-236.

- BELL, C.R., DICKIE, G.A. and CHAN, J.W.Y.F. 1995. Variable response of bacteria isolated from grapevine xylem to control grape crown gall disease in planta. *Am. J. Enol. Vitic.*, 46: 499-508.
- BELL, K.S., AVROVA, A.O., HOLEVA, C., CARDLE, L., MORRIS, W., DE JONG W., TOTH, I.K. WAUNGH, R., BRYAN, G.J. and BIRCH, P.R. 2002. Sample sequencing of a selected region of the genome of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* reveals candidate phytopathogenicity genes and allows comparison with *Escherichia coli*. *Microbiol.*, 148: 1367-1378.
- BELL, K.S. et al. 2004. Genome sequence of the enterobacterial phytopathogen *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and characterization of virulence factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 101 (30): 11105-11110.
- BELLIS, P.D., SCHENA, L., 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.
- BENLİOĞLU, K. ve ÖZAKMAN, M., 1991. Fasulyelerde Hale Lekesi *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*'nın serolojik teşhisi üzerinde çalışmalar. VI. Türkiye Fitopatoloji Kongresi, ss. 289, 7-11 Ekim 1991, İzmir.
- BENLİOĞLU, K., ÖZYILMAZ, Ü. 2007. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in Moleküler Beacon Probe ve Fluoresan PCR Testi ile saptanması, Türkiye II. Bitki Koruma Kongresi, ss. 103, 27-29 Ağustos, Isparta.
- BENNIK, M.H.J., VORSTMAN, W., SMID, E.J. and GORRIS, L.G.M. 1998. The influence of oxygen and carbon dioxide on the growth of prevalent *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas* species isolated from fresh and modified atmosphere stored vegetables. *Food Microbiol.*, 15: 459-469.
- BERG, T., TESORIERO, L. and HAILSTONES, L.D. 2006. A multiplex Real-Time PCR assay for detection of *Xanthomonas campestris* from brassicas. *Appl. Microbiol.*, 42: 624-630.
- BILLING, E. 1970. *Pseudomonas viridiflava* (Burkholder, 1930; Clara, 1934). *J. Appl. Bacteriol.*, 33: 492-500.
- BOGETZEVSKA, N., ILIEVA, E. and SOTIROVA, V. 1998. Pith necrosis greenhouse tomato caused by *Pseudomonas viridiflava* in Bulgaria. <http://grec.ifas.u.edu/tgc/newsletters/vol42/v42p11a.html> (Son erişim tarihi: 20.10.2014).
- BRADBURY, J.F. 1987. *Pseudomonas corrugata*. In: CMI Description of Pathogenic Fungi and Bacteria, 225: 27-38.
- BUANARIO, R., KAROFILAKIS, A. and SCORTICHINI, M. 1993. Occurrence of *Pseudomonas corrugata* Roberts et Scarlett on tomato plants in Crete. *Phytopathology Medit.*, 32: 245-246.
- BUCKINGHAM, L. 2011. Molecular Diagnostics: Fundamentals, Methods and Clinical Applications. F.A. Davis Company, Philadelphia, 537 p.
- BURKHOLDER, W.H. 1930. The bacterial disease of the bean. A comparative study. *Cornell University Agric. Exp. Stat. Mem.*, 127: 1-88.
- BURKHOLDER, W.H., McFADDEN, L.A. and DIMOCK, A.W. 1953. A bacterial blight of chrysanthemum. *Phytopathology*, 43: 522-526.
- BYTHER, R.S. and CHASTAGNER, G.A. 1993. Diseases. In the physiology of flower bulbs. De Hertogh, A., and Le Nard, M. (eds). The Netherlands: *Elsevier Science*, pp.71-100, Amsterdam.

- CARROLL, N.B., ECHANDI, G. and SHORMAKES, P.B. 1992. Pith necrosis of tomato in Western North Carolina etiology and influence of cultural practices on its incidence and severity. *Technical Bulletin- North Carolina Agricultural Research Service*, 300: 22-24.
- CARUSO, P. and CATARA, V. 1996. First report of *Pseudomonas viridiflava* leaf spot of red-leaved chicory. *Plant Dis.*, 80: 710.
- CATARA, V. and ALBANESE, G. 1993. La 'Necrosi del midollo' del pomodoro in Sicilia. *Inf. Fitopatol.*, 43: 42-44.
- CATARA, V., GARDAN, L. and LOPEZ, M.M. 1997 Phenotypic heterogeneity of *Pseudomonas corrugata* strains from southern Italy. *J. Appl. Microbiol.*, 83: 576-586.
- CATARA, V., ARNOLD, D.L., CIRVILLERI, G., BELLA, P. and VIVIAN, A. 2000. Specific oligonucleotide primers for the rapid identification and detection of *Pseudomonas corrugata*, by PCR amplification: Evidence for two distinct genomic groups. *Eur. J. Plant. Pathol.*, 106: 753-762.
- CATARA, V., SUTRA, L., MORINEAU, A., ACHOUAK, W., CHRISTEN, R. and GARDAN, L., 2002. Phenotypic and genomic evidence for the revision of *Pseudomonas corrugata* and proposal of *Pseudomonas mediterranea* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Micr.*, 52: 1749-1758.
- CATARA, V. 2007. *Pseudomonas corrugata*: plant pathogen and/or biological resource. *Mol. Plant Pathol.*, 8 (3): 233-244.
- CAZORLA, F.M., PEREZ-GARCIA, A., RIVERA, M.E., CODINA, J.C., TORES, J.A. and VICENTE, A.D.E. 2001. Bacterial diseases of tomato in southern Spain: application of a detached tissue assay to evaluate bacterial pathogenicity. *Plant Pathol.*, 80: 6423.
- CHANG, A.L., LIM, W.J., HONG, S.Y., KIM, E.J., SHIN, E.C., KIM, M.K., LEE, J.R., PARK, S.R., WOO, J.G., LIM, Y.P. and YUN, H.D. 2004. Analysis of *bgl* operon structure and characterization of beta-glucosidase from *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* LY34. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 68 (11): 2270-8.
- CHARD, J.M., VAN GARDINGEN, J. and GRAHAM, D.C. 1991. Biological control of *Erwinia* disease of potato. New approaches in biological control of soilborne diseases, biological control of fungal and bacterial pathogens and the European Foundation for Plant Pathology working group on biological control, pp. 133-135, 6-4 July, Copenhagen Denmark.
- CHASE, A.R. and D.D. BRUNK, 1984. Bacterial leaf blight incited by *Pseudomonas cichorii* in *Schefflera arboricola* some related plants. *Plant Dis.*, 68: 73-74.
- CHELLEMI, D.O., DANKERS, H.A., HILL, K., CULLEN, R.E., SIMONE, G. W., GOOCH, M.D. and ALLMGHAM, J.E. 1998. Occurrence of bacterial stem rot, caused by *Erwinia chrysanthemi*, on field-grown tomato in Florida. *Plant Dis.*, 2: 831.
- CHUN, W. and LEARY, J.V. 1989. Novel toxin produced by *Pseudomonas corrugata*, the causal agent of tomato pith necrosis. In: Phytotoxins and Plant Pathogenesis (Graniti, A., Durbin, R.D. and Ballio, A., eds), pp. 93-116. Berlin: Springer-Verlag.
- CIRVILLERI, G., BELLA, P. and CATARA, V. 2000. Luciferase genes as a marker for *Pseudomonas corrugata*. *J. Plant Pathol.*, 82: 237-241.

- CIRVILLERI, G., BELLA, P. and CATARA, V. 2001. Biocontrol activity in plant pathogenic *Pseudomonas* species. In: Proceedings 5<sup>th</sup> Congress of the European Foundation for Plant Pathology, pp. 534-538, 18-22 September, Taormina-Giardini Naxos.
- CLARA, F.M. 1934. A comparative study of the green fluorescent bacterial plant pathogens. *Cornell Agr. Exptl. Sta. Mem.*, 159: 1-36.
- CLARK, R.G. and WATSON, D.R.W. 1986. New plant disease record in New Zealand: Tomato pith necrosis caused by *Pseudomonas corrugata*. *New Zeal. J. Agric. Res.*, 29: 105-109.
- COCO, V., CATARA, V., SPEDINI, R. and CIRVILLERI, G. 2001. SEM observations of tomato stems infected with *Pseudomonas corrugata*. In Proceedings 5<sup>th</sup> Congress of the European Foundation for Plant Pathology, pp. 378-380, 18-22 September, Taormina-Giardini Naxos.
- COLIN, J.E. 1996. Identification and characterization of *Pseudomonas viridiflava* (Burkholder) Dawson, isolated from grea system cankers of wilted tomato plants in Morocco. *Parasitica*, 42: 93-95.
- COLLMER, A. and KEEN, N.T. 1986. The role of pectic enzymes in plant pathogenesis. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 24: 383-409.
- CONN, K.E., GUBLER, W.D. and HASEY, J.K. 1993. Bacterial blight of kiwi fruit in California. *Plant Dis.*, 77: 228-230.
- COOK, R.J. and WELLER, D.M. 1987. Enhancement of root health and plant growth by rhizobacteria. UCLA (Univ. Calif. Los Angel.) *Symp. Mol. Cell. Biol.*, 48: 125-134.
- COOK, R.J., THOMASHOW, L.S., WELLER, D.M., FUJIMOTO, D., MAZZOLA, M., BANGERA, G. and KIM, D.S. 1995. Molecular mechanisms of defense by rhizobacteria against root diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 92: 4197-4201.
- COTTYN, B., VAN OUYTRYVE, M.F., CEREZ, M.T., DE CLEENE, M., SWINGS, J. and MEW, T.W. 1996. Bacterial diseases of rice. II. Characterization of pathogenic bacteria associated with sheath rot complex and grain discoloration of rice in the Philippines. *Plant Dis.*, 80: 438-445.
- COTTYN, B. 2005. *Pseudomonads* associated with midrib rot and soft rot of butterhead lettuce and endive. *Commun. Agric. Appl. Biol. Sci.*, 70 (3): 101-109.
- COTTYN, B., HEYLEN, K. and HEYRMAN, J. 2009. *Pseudomonas cichorii* as causal agent of midrib rot, an emerging disease of greenhousegrown butter head lettuce in Flanders. *Syst. Appl. Microbiol.*, 32: 211-25.
- COTTYN, B., BAEYEN, S., PAUWELYN, E., VERBAENDERT, I., VOS, P.D.E., BLEYAERT, M., HOË FTE, P. and MAES, M. 2011. Development of a Real-Time PCR assay for *Pseudomonas cichorii*, the causal agent of midrib rot in greenhousegrown lettuce, and its detection in irrigating water. *Plant Pathol.*, 60: 453-461.
- CRONIN, D., MOËNNE-LOCCOZ, Y., FENTON, A., DOWLING, D.N. and O'GARA, F. 1997. Ecological interaction of a biocontrol *Pseudomonas fluorescens* strain producing 2,4-diacetylphloroglucinol with the soft rot potato pathogen *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 23: 95-106.
- CUBERO, J. and GRAHAM, H.J. 2005. Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction for bacterial enumeration and allelic discrimination to differentiate *Xanthomonas* strains on citrus. *Phytopathology*, 95 (11): 1333-1340.

- CUPPELS, D.A. and KELMAN, A. 1974. Evaluation of selective media for isolation of soft-rot bacteria from soil and plant tissue. *Phytopathology*, 64: 468-475.
- CZAJKOWSKI, R., GRABE, G.J. and VAN DER WOLF, J.M. 2009. Distribution of *Dickeya* spp. and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* in naturally infected seed potatoes. *Eur. J. Plant Pathol.*, 125: 263-275.
- ÇINAR, O. ve AYSAN, Y., 1995. Doğu Akdeniz Bölgesi domates seralarında yumuşak çürüklük etmeni *Erwinia* türlerinin tespiti, VII. Türkiye Fitopatoloji Kongresi bildirimleri, ss. 555, 26-29 Eylül, Adana.
- ÇİMEN, A. ve AKTAŞ, Z. 2001. Antalya ili Kumluca ilçesindeki sera üreticilerinin pazarlama sorunları. *Akdeniz I.I.B.F. Dergisi*, 1: 1-14.
- DE BOER, S.H., VERDONCK, L., VRUGGINK, H., HARJU, P., BANG, H.O. and DE LEY, J. 1987. Serological and biochemical variation among potato strains of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and their taxonomic relationship to other *E. carotovora* strains. *J. Appl. Bacteriol.*, 63: 487-495.
- DE BOER, S.H. 2003. Characterization of pectolytic *Erwinia* as highly sophisticated pathogens of plants. *Eur. J. Plant Pathol.*, 109: 893-899.
- DE BOER, S. H., LI, X. and WARD, L.J. 2012. *Pectobacterium* spp. associated with bacterial stem rot syndrome of potato in Canada. *Bacteriology*, 102 (10): 937-947.
- DE FAGO, G., KEEL, C. and MOE'NNE-LOCCOZ, Y. 1997. Fate of released *Pseudomonas* bacteria in the soil profile: implications for the use of genetically modified microbial inoculants. Zelikoff J. T., Stolen J. S. (eds.) *Ecotoxicology: responses, biomarkers and risk assessment*, pp. 403-418, France.
- DE HAAN, E.G., DEKKER-NOOREN, T.C.E.M., VAN DEN BOVENKAMP, G.W., SPEKSNIJDER, A.G.C.L., VAN DER ZOUWEN, P.S. and VAN DER WOLF, J.M. 2008. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* can cause potato blackleg in temperate climates. *Eur. J. Plant Pathol.*, 122: 561-569.
- DE HERTOOGH, A. and LE NARD, M. 1993. General chapter on summer flowering bulbs. In *The Physiology of Flower Bulbs*. De Hertogh, A., and Le Nard, M. (eds). The Netherlands: Elsevier Science, pp. 741-774, Amsterdam.
- DE LEY, J. 1974. Phylogeny of Procaryotes. *Taxon*, 23 (2): 291-300.
- DEMİR, G. 1990. The occurrence of *Pseudomonas corrugata* on tomatoes in Turkey. *Journal of Turkish Phytopathology*, 19: 63-70.
- DEMİR, G. and GÜNDOĞDU, M. 1988. The bacterial disease of tomato caused by *Pseudomonas cichorii* in Turkey. 5<sup>th</sup> Turkish Phytopathological Congress, pp. 67-74, October 18-21, Antalya.
- DE SOUZA, J.T., DE BOER, M., DE WAARD, P., VAN BEEK, A.T. and RAAIJMAKERS, M.J. 2003. Biochemical, genetic, and zoosporicidal properties of cyclic lipopeptide surfactants produced by *Pseudomonas fluorescens*. *Appl. Environ. Microb.*, 69 (12): 7161-7172.
- DE SOUZA, J.T., ARNOULD, C., DEULVOT, C., LEMANCEAU, P., GIANINAZZI-PEARSON, V. and RAAIJMAKERS, J.M. 2003. Effect of 2,4-diacetylphloroglucinol on *Pythium*: cellular responses and variation in sensitivity among propagules and species. *Phytopathology*, 93: 966-975.
- DEVASH, Y. and OKON, Y.Y. 1980. Henis: Survival of *Pseudomonas* tomato in soil and seeds. *Phytopath. Z.*, 99: 175-185.

- DE VOS, P., GOOR, M., GILLIS, M. and DE LEY, J. 1985. Ribosomal ribonucleic acid cistron similarities of phytopathogenic *Pseudomonas* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 35: 169-184.
- DHANVANTARI, B.N. and DIRKS, V.A. 1987. Bacterial stem rot of greenhouse tomato: Etiology, spatial distribution and the effect of high humidity. *Phytopathology*, 77: 1457-1463.
- DHANVANTARI, B.N., 1990. Stem necrosis of greenhouse tomato caused by novel *Pseudomonas* spp. *Plant Dis.*, 74: 124-127.
- DIALLO, S., LATOUR, X. and GROBOILLOT, A. 2009. Simultaneous and selective detection of two major soft rot pathogens of potato: *Pectobacterium atrosepticum* (*Erwinia carotovora* subsp. *atrosepticum*) and *Dickeya* spp. (*Erwinia chrysanthemi*). *Eur. J. Plant Pathol.*, 125: 349-54.
- DICKEY, R.S. 1979. *Erwinia chrysanthemi* Comparative study of phenotypic properties of strains from several hosts and other *Erwinia* species. *Phytopathology*, 69: 324-329.
- DICKEY, R.S. 1981. *Erwinia chrysanthemi*: reaction of eight plant species to strains from several hosts and strains of other *Erwinia* species. *Phytopathology*, 71: 23-29.
- DICKEY, R.S. and KELMAN, A., 1988. B. Z. *Erwinia carotovora*, or soft rot group. In: Schaad, N. W. (ed.), Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria, 2nd edn. APS Press, pp. 44-59, USA.
- DIMARTINO, M., PANEBIANCO, S., VITALE, A., CASTELLO, I., LEONARDI, C., CIRVILLERI, G. and POLIZZI, G. 2011. Occurrence and pathogenicity of *Pseudomonas fluorescens* and *P. putida* on tomato plants in Italy. *J. Plant Pathol.*, 93 (1): 79-87.
- DREO, T., GRUDEN, K., MANCEAU, C., JANSE, J.D. and RAVNIKAR, M. 2007. Development of a Real-Time PCR-based method for detection of *Xylophilus ampelinus*. *Plant Pathol.*, 56: 9-16.
- DUEHOLM, M.S., DANIELSEN, H.N. and NIELSEN, P.H. 2014. Complete genome sequence of *Pseudomonas* sp. UK4, a model organism for studies of functional amyloids in *Pseudomonas*. *Genome Announc.*, 2 (5): 11.
- DUFFY, B.K. and DE'FAGO, G. 1997. Zinc improves biocontrol of *Fusarium* crown and root rot of tomato by *Pseudomonas fluorescens* and represses the production of pathogen metabolites inhibitory to bacterial antibiotic biosynthesis. *Phytopathology*, 87: 1250-1257.
- DÜZYAMAN, E. and DUMAN, I. 2003. Dried tomato as a new potential in export and market diversification in Turkey. *Acta Hort.*, 613: 433-436.
- DYE, D.W., 1968. A taxonomic study of the genus *Erwinia*. II. The 'carotovora' group. *New. Zeal. J. Sci.*, 12: 81-97.
- ENGELHARD, A.W., MELLINGER, H.C., PLOETZ, R.C. and MILLER, J.W. 1983. A leaf spot of florists geranium incited by *Pseudomonas cichorii*. *Plant Dis.*, 67: 541-544.
- ENGELHARD, A.W. and JONES, J.B., 1990. Stem canker and leaf spot of poinsettia caused by *Pseudomonas viridiflava* in Florida. *Plant Dis.*, 74: 528-529.
- EMANUELE, M.C., SCALONI, A., LAVERMICOCCA, P., JACOBELLIS, N.S., CAMONI, L., GIORGIO, D., PUCCI, P., PACI, M., SEGRE, A. and BALLIO, A. 1998. Corpeptins, new bioactive lipodepsipeptides from cultures of *Pseudomonas corrugata*. *FEBS Lett.*, 433: 317-320.

- ERTAN, D. and BENLİOĞLU, K. 2012. Aydın ve İzmir İlleri Bezelye Üretim Alanlarında Görülen Bakteriye Hastalıkların Saptanması. Yüksek lisans tezi, Adnan Menderes Üniversitesi, Aydın, 89 s.
- FATMI, M. and SCHAAD, N.W. 2002. Survival of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in infected tomato stems under natural field conditions in California, Ohio and Morocco. *Plant Pathol.*, 51: 149-154.
- FENTON, A.M., STEPHENS, P.M., CROWLEY, J., O'CALLAGHAN, M. and O'GARA, F. 1992. Exploitation of gene(s) involved in 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis to confer a new biocontrol capability to a *Pseudomonas* strain. *Appl. Environ. Microb.*, 58: 3873-3878.
- FERNANDO, W.G.D., RAMARATHNAM, R., KRISHNAMOORTHY, A.S. and SAVCHUK, S.C. 2005. Identification and use of potential bacterial organic antifungal volatiles in biocontrol. *Soil Biol. Biochem.*, 37: 955-964.
- FESSEHAIE, A., DE BOER, S.H. and LEVESQUE, C.A. 2002. Molecular characterization of DNA encoding 16S-23S rRNA intergenic spacer regions and 16S rRNA of pectolytic *Erwinia* species. *Can. J. Microbiol.*, 48: 387-398.
- FIORI, D.M., CORDA, P. and CARTA, C. 1983. *Pseudomonas corrugata* Roberts and Scarlett Agente Della 'Necrosi de Midollo' del Pomodoro (*Lycopersicon esculantum* Mill). *Rivista de Patologica Vegetale*, 19: 21-27.
- FIORI, D.M., CARTA, C. and FRANCESCHINI, A. 1984. Soft rot of tomatoes due to *Pseudomonas viridiflava* (Burkholder) Dowson. *Rev. Plant Pathol.*, 63: 237.
- FIORI, D.M. 1992. A new bacterial disease of Chrysanthemum: a stem rot by *Pseudomonas corrugata* Roberts et Scarlett. *Phytopath. Mediterranean*, 31: 110-114.
- FIORI, D.M. 2002. Severe damage caused by *Pseudomonas corrugata* Roberts et Scarlett on tomato soilless grown. *Inf. Fitopatol.*, 52: 47-51.
- FIORI, D.M. and SCHIAFFINO, A. 2003. Bacterial stem rot in greenhouse pepper (*Capsicum annuum* L.) in Sardinia (Italy): Occurrence of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Phytopathology*, 152: 28-33.
- FLUGGE, C. 1886. Die Mikroorganismen. Part 2. 3rd ed. pp. 776, Leipzig.
- FREEMAN, W.M., WALKER, S.J. and VRANA, K.E. 1999. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *Biotechniques*, 26: 112-122.
- 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 kiwifruit bacterial canker. *Plant Pathol.*, 63: 264-276.
- GALLOIS, A., SAMSON, R., AGERON, E. and GRIMONT, P. A. D. 1992. *Erwinia carotovora* subsp. *odorifera* subsp. nov., associated with odorous soft rot of chicory (*Cichorium intybus* L.). *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 42: 582-588.
- GARBEVA, P., VAN OVERBEEK, L.S., VAN VUURDE, J.W.L. and VAN ELSAS, J.D. 2001. Analysis of endophytic bacterial communities of potato by plating and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of 16S rDNA based PCR fragments. *Microb. Ecol.*, 41: 369-383.
- GARDAN, L., GOUY, C., CHRISTEN, R. and SAMSON, R. 2003. Elevation of three subspecies of *Pectobacterium carotovorum* to species level: *Pectobacterium atrosepticum* spp. nov., *Pectobacterium betavascularum* spp. nov. and *Pectobacterium wasabiae* spp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 53: 381-391.

- GITAITIS, R.D., BAIRAD, R.D., BEAVER, R.W. and SUMMER, D.R. 1991. Bacterial blight of sweet onion caused by *Pseudomonas viridiflava*. *Plant Dis.*, 75: 1080-1082.
- GITAITIS, R.D., SUMNER, D., GAY, D., SMITTLE, D., MAW, B., TOLLNER, B. and HUNG, Y. 1992. Populations of *Pseudomonas viridiflava*, *P. cepacia*, pectinolytic bacteria, and total bacteria from soils, irrigation water, onion foliage and onion bulbs in Georgia (USA). *Plant Pathogenic Bacteria*, pp. 9-12, Versailles (France).
- GITAITIS, R., MACDONALD, G., TORRACE, R., HARTLEY, R., SUMNER, D.R., GAY, J. D. and JOHNSON W.C. 1998. Bacterial streak and bulb rot of sweet onion: II. Epiphytic survival of *Pseudomonas viridiflava* in association with multiple weed hosts. *Plant Dis.*, 82: 935-938.
- GODFREY, S.A.C. and MARSHALL, J.W. 2002. Identification of cold-tolerant *Pseudomonas viridiflava* and *P. marginalis* causing severe carrot post harvest bacterial soft rot during refrigerated export from New Zealand. *Plant Pathol.*, 51:155-162.
- GONZÁLEZ, A.J., RODICIO, M.R. and MENDOZA, M.C. 2003. Identification of an emergent and atypical *Pseudomonas viridiflava* lineage causing bacteriosis in plants of agronomic importance in a Spanish region. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69: 2936-2941.
- GONZALEZ, M.E., MARCO, F., GÓMEZ-MINGUET, E., CARRASCO-SORLI, P., BLÁZQUEZ, M.A., CARBONELL, J., RUIZ, O.A. and PIECKENSTAIN, F.L. 2011. Perturbation of spermine synthase gene expression and transcript profiling provide new insights on the role of the tetraamine spermine in *Arabidopsis thaliana* defence against *Pseudomonas viridiflava*. *Plant Physiol.*, 156: 2266-2277.
- GONZÁLEZ, A.J., FERNÁNDEZ, A.M., JOSÉ, M.S., GONZÁLEZ –VARELA, G. and RODICIO, M.R. 2012. A *Pseudomonas viridiflava*-related bacterium causes a Dark-Reddish Spot Disease in *Glycine max*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 78 (10): 3756-3758.
- GOTO, M. and MATSUMOTO, K. 1987. *Erwinia carotovora* subsp. *wasabiae* isolated from diseased rhizomes and fibrous roots of Japanese horseradish (*Eutrema wasabi* Maxim). *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 37: 130-135.
- 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.
- GOUMANS, D.E. and MOUDOFA, J. R. 1996. A bacterial disease of tomato fruits caused by *Pseudomonas viridiflava*. *Phytopath. Medit.*, 35: 217.
- GOUMANS, D.E. and CHATZAKI, A.K. 1998. Characterization and host range evaluation of *Pseudomonas viridiflava* from melon, blite, tomato, chrysanthemum and eggplant. *Eur. J. Plant Pathol.*, 104: 181-188.
- GOUMANS, D.E., MALATHRAKIS, N.E. and CHATZAKI, A.K. 1999. Characterization of *Pseudomonas viridiflava* associated with a new symptom on tomato fruit. *Eur. J. Plant Pathol.*, 105: 927-932.
- GRAHAM, D.C. 1972. Identification of soft rot coliform bacteria. In Proceedings of the 3<sup>rd</sup> International Conference on Plant Pathogenic Bacteria, pp. 273-279, 14-21 April, Wageningen.



- GRANDILLO, S., ZAMIR, D. and TANSKLEY, S.D., 1999. Genetic improvement of processing tomatoes: A 20 years perspective. *Euphytica*, 110: 85-97.
- GROGAN, R.G., MISAGHI, I.J., KIMBLE, K.A., GREEATHEAD, A.S., RIRIE, D. and BARDIN, R. 1977. Varnish spot, destructive disease of lettuce in California caused by *Pseudomonas cichorii*. *Phytopathology*, 79: 957-960.
- GUO, Y., ZHENG, H., YANG, Y. and WANG, H. 2007. Characterization of *Pseudomonas corrugata* strain P94 isolated from soil in Beijing as a potential biocontrol agent. *Curr. Microbiol.*, 55: 247-253.
- GUSTINE, D.L., SHERWOOD, R.T., LUKEZIC, F.L. and MOYER, B.G. 1990. Metabolites from *Pseudomonas corrugata* elicit phytoalexin biosynthesis in white clover. *Phytopathology*, 80: 1427-1432.
- GÜNAY, A., 2005. Sebze Yetiştiriciliği. Cilt 1. İzmir, 502 s.
- GÜVEN, K. and MUTLU, B.M. 2000. Development of immunomagnetic separation technique for isolation of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Folia Microbiol.*, 45 (4): 321-324.
- HAAS, D. and KEEL, C. 2003. Regulation of antibiotic production in root colonizing *Pseudomonas* spp. & relevance for biological control of plant disease. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 41: 117-153.
- HAAS, D. and DÉFAGO, G. 2005. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent *Pseudomonads*. *Nat. Rev. Microbiol.*, 3: 307-319.
- HARRISON, L.A., LETENDRE, L., KOVACEVICH, P., PIERSON, E. and WELLER, D.M. 1993. Purification of an antibiotic effective against *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* produced by biocontrol agent *Pseudomonas aureofaciens*. *Soil Biol. Biochem.*, 25: 215-221.
- HASE, C., MASCHER, F. MOE'NNE-LOCCOZ, Y. and DE'FAGO, G. 1999. Nutrient deprivation and the subsequent survival of biocontrol *Pseudomonas fluorescens* CHA0 in soil. *Soil Biol. Biochem.*, 31: 1181-1188.
- HASE, C., HOTTINGER, M. MOE'NNE-LOCCOZ, Y. and DE'FAGO, G. 2000. Survival and cell culturability of biocontrol *Pseudomonas fluorescens* CHA0 in the rhizosphere of cucumber grown in two soils of contrasting fertility status. *Biol. Fertil. Soils*, 32: 217-221.
- HAUBEN, L., MOORE, E.R., VAUTERIN, L., STEENACKERS, M., MERGAERT, J., VERDONCK, L. and SWINGS, J. 1998. Phylogenetic position of phytopathogens within the Enterobacteriaceae. *Syst. Appl. Microbiol.*, 21: 384-397.
- HAUBEN, L., VAN GIJSEGEM, F. and SWINGS, J. 2005. Genus I. Waldae 1945, In: G.M. Garrity, D.J. Brenner, N.R. Krieg, J.R. Staley (Editors), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Volume Two: The Proteobacteria, Part C, Springer Verlag, pp. 325-340, USA.
- HEISER, C.B. and ANDERSON, G. 1999. Perspectives on new crops and new uses: "New" solanums. pp. 379-384, Virginia.
- HELIAS, V., LE ROUX, A.C., BERTHEAU, Y., ANDRIVON, D., GAUTHIER, J.P. and JOUAN, B. 1998. Characterization of *Erwinia carotovora* subspecies and detection of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* in potato plants, soil and water extracts with PCR-based methods. *Eur. J. Plant Pathol.*, 104: 685-699.
- HELIAS, V. 2006. Potato Blackleg in France: Incidence of causal *Erwinia* species and field symptoms expression. *Int. Erwinia Workshop*, pp. 15, 7-9 July, Dundee, Scotland.

- HENSON, J.M. and FRENCH, R. 1993. The polymerase chain reaction and plant disease diagnostics. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 31: 81-109.
- HEUER, H., HARTUNG, K., WIELAND, G., KRAMER, I. and SMALLA, K. 1999. Polynucleotide probes that target a hypervariable region of 16S rRNA genes to identify bacterial isolate corresponding to bands of community fingerprints. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65: 1045-1049.
- HEYDARI, A., KHODAKARAMIAN, G. and ZAFARI, D. 2012. Characterization of *Pseudomonas viridiflava* causing Alfalfa Root Rot Disease in Hamedan province of Iran. *J. Plant Pathol. Microb.*, 3: 5.
- HEYDARI, A., KHODAKARAMIAN, G. and DOUSTMORAD, Z. 2014. Occurrence, genetic diversity and pathogenicity characteristics of *Pseudomonas viridiflava* inducing alfalfa bacterial wilt and crown root rot disease in Iran. *Eur. J. Plant Pathol.*, 139: 299-307.
- HOWELL, C.R. and STIPANOVIC, R.D. 1979. Control of *Rhizoctonia solani* on cotton seedlings with *Pseudomonas fluorescens* and with an antibiotic produced by the bacterium. *Phytopathology*, 69: 480-482.
- HOWELL, C.R. and STIPANOVIC, R.D. 1980. Suppression of *Pythium ultimum* induced damping-off of cotton seedlings by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotic pyoluteorin. *Phytopathology*, 70: 712-715.
- HREN, M., BOBENA, J., ROTTER, A., KRALJ, P., GRUDENA, K. and RAVNIKAR, M. 2007. Real-Time PCR detection systems for *Flavescence dorée* and *Bois noir* phytoplasmas in grapevine: comparison with conventional PCR detection and application in diagnostics. *Plant Pathol.*, 56: 785-796.
- HU, X.F., YING, F.X., HE Y.B., GAO Y.Y., CHEN H.M. and CHEN, J.S. 2008. Characterization of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* causing soft-rot disease on *Pinellia ternata* in China. *Eur. J. Plant Pathol.*, 120: 305-310.
- HUGH, R. and LEIFSON E. 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various Gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.*, 66: 24-26.
- HULETSKY, A. et al. 2004. New Real-Time PCR assay for rapid detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* from specimens containing a mixture of *Staphylococci*. *J. Clin. Microbiol.*, 42 (5): 1875-1884.
- HUNTER, J.E. and CIGNA, J.A. 1981. Bacterial blight incited in parsnip by *Pseudomonas marginalis* and *Pseudomonas viridiflava*. *Phytopathology*, 71: 1238-1241.
- Iavicoli, A., BOUTET, E., BUCHALA, A. and MÉTRAUX, J.P. 2003. Induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* in response to root inoculation with *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 16: 851-858.
- JACOB, C. 1991. On the a etiology of pith necrosis of greenhouse grown tomato plants in Portugal. 7<sup>th</sup> congress of the Mediterreanean, pp. 119, 8-11 September, France.
- JAKOB, K., GOSS, E.M., ARAKI, H., VAN, T., KREITMAN, M., and BERGELSON, J. 2002. *Pseudomonas viridiflava* and *P. syringae* natural pathogens of *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 15: 1195-1203.
- 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.
- JONES, L.R. 1901. A soft rot of carrot and other vegetables caused by *Bacillus carotovorus*. *Vt. Agric. Exp. Stn. Annu. Rep.*, 13: 299-332.
- JONES, J.B., ENGELHARD, A.W. and RAJU, B.C. 1983. Outbreak of a stem necrosis on chrysanthemum incited by *Pseudomonas cichorii* in Florida. *Plant Dis.*, 67: 431-433.
- JONES, J.B., JONES, J.P., McCARTER, S.M. and STALL, R.E. 1984. *Pseudomonas viridiflava*: causal agent of bacterial leaf blight of tomato. *Plant Dis.*, 68: 341-342.
- JONES, J.B., RANDHAWA, P.S. and SASSER, M. 1990. Selective isolation of *Pseudomonas cichorii* from soil and from leaves and buds of *Dendranthema grandiflora*. *Plant Dis.*, 74: 300-303.
- JOUTSJOKI, T., LAURILA, J., PIRHONEN, M., LEHTINEN, A. and HANNUKKALA, A. 2005. Diagnostics and incidence of black leg caused by *Erwinia* bacteria in Finland. Proceedings of the 16<sup>th</sup> Triennial Conference of the EAPR, pp. 717-718, September 19-23, Bilbao, Spain.
- KANESHIRO, W.S., BURGER, M., VINE, B.G., DE SILVA, A.S., and ALVAREZ, A.M. 2008. Characterization of *Erwinia chrysanthemi* from a bacterial heart rot of pineapple outbreak in Hawaii. *Plant Dis.*, 92: 1444-1450.
- KANG, H.W., GO, S.J. and KWON, S.W. 1998. Specific detection of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* by DNA probe selected from PCR polymorphic bands. *Korean Journal of Plant Pathology*, 14: 161-70.
- KANG, H.W., PARK, D.S., GO, S.J. and EUN, M.Y. 2002. Finger printing of diverse genomes using PCR with universal rice primers generated from repetitive sequence of Korean weedy rice. *Mol. Cells*, 13: 281-7.
- KANG, H.W., KWON, S.W. and GO, S.J. 2003. PCR-based specific and sensitive detection of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* by primers generated from a URP-PCR fingerprinting-derived polymorphic band. *Plant Pathol.*, 52: 127-133.
- KARATAŞ, A. and AYSAN, Y. 2003. Doğu Akdeniz Bölgesinde domates bitkilerinde gövde çürüklüğüne neden olan *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*'nın biyolojik mücadelesi üzerine araştırmalar. Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakülte Dergisi, 18 (3): 89-96.
- KAYA, S. 2012. Yerel sofralık domates popülasyonlarının organik tarıma uygunlukları ve organik çeşit geliştirme amacıyla kullanım olanakları üzerine araştırma. Doktora tezi, Ege Üniversitesi, İzmir, 111 s.
- KEEL, C., SCHNIDER, U., MAURHOFER, M., VOISARD, C., LAVILLE, J., BURGER, U., WIRTHNER, P., HAAS, D. and DÉFAGO, G. 1992. Suppression of root diseases by *Pseudomonas fluorescens* CHA0: Importance of the bacterial secondary metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol. *Mol. Plant Microbe In.*, 5: 4-13.
- KESKİN, G. ve DÖLEKOĞLU, C. 2005. Domates ve Domates Salçası Durum-Tahmin: 2004/2005. Tarımsal Ekonomi Araştırma Enstitüsü Yayınları, Ankara, 123: 1-75.
- KESSLER, B. and PALLERONI, N.J. 2000. Taxonomic implications of synthesis of poly-beta-hydroxybutyrate and other poly-beta-hydroxyalkanoates by aerobic *Pseudomonads*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 50: 711-713.

- KIBA, E. et al. 2006. Comparative analysis of induction pattern of programmed cell death and defenserelated responses during hypersensitive cell death and development of bacterial necrotic leaf spots in eggplant. *Planta*, 224: 981-994.
- KING, E.O., WARD, M.K. and RANEY, D.E. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J. Lab. Clin. Med.*, 44: 301-307.
- KLOPPER, J.W. 1983. Effect of seed piece inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria on population of *Erwinia carotovora* on potato roots and daughter tubers. *Phytopathology*, 73: 217-219.
- KLOPMEYER, M.J. and KELMAN, A. 1988. Use of monoclonal antibodies specific for pectate lyase as serological probes in the identification of soft rot *Erwinia* spp. *Phytopathology*, 78: 1430-4.
- KOHN, S. 1982. First occurrence of *Pseudomonas corrugata* as casual agent of tomato pith necrosis in the German Federal Republic. *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes* 34 (6): 81-82.
- KOIV, V. and MAE, A. 2001. Quorum sensing controls the synthesis of virulence factors by modulating *rsmA* gene expression in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Mol. Genet. Genomics*, 265: 287-292.
- KOTOUJANSKY, A. 1987. Molecular genetics of pathogenesis by soft-rot *Erwinias*. *Ann. Rev. Phytopathol.* 25: 405-430.
- KOVACEVICH, P.A. and RYDER, M.H. 1991. Biocontrol performance characterization of *Pseudomonas corrugata* isolates PS 2140 and PS 2161. *Phytopathology*, 81: 1178.
- KOVACS, N. 1956. Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. London, *Nature*, 178: 703.
- KRAUS, J. and LOPER, J.E. 1992. Lack of evidence for a role of antifungal metabolite production by *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 in biological control of *Pythium* damping-off of cucumber. *Phytopathology*, 82: 264-271.
- KUDELA, V. and TRYNEROVA, E. 1986. Bakteriální spale zajičete v ceskoslovesku, Sborn uVTIZZahradnictvi. *Praha*, 13: 29-37.
- KUIPER, I., LAGENDIJK, E.L. BLOEMBERG, G.V. and LUGTENBERG, B.J.J. 2004. Rhizoremediation: a beneficial plant-microbe interaction. *Mol. Plant Microbe In.*, 17: 6-15.
- KUWATA, H.O. and OIKAWA, K. 1989. Tomato pith necrosis in amomori prefecture isolation of *Pseudomonas corrugata* (Roberts et Scarlett 1981) and *Pseudomonas viridiflava* (Burkholder, 1930) Dowson 1939 from diseased plants. *Annual Report of the Society of Plant Protection of North Japan*, 40: 56-58.
- LAI, M., OPGENORTH, D.C. and WHITE, J.B. 1983. Occurrence of *Pseudomonas corrugata* on tomato in California. *Plant Dis.*, 67: 110-112.
- LAURILA, J., AHOLA, V., LEHTINEN, A., JOUTSJOKI, T., HANNUKKALA, A. and RAHKONEN, A. 2008. Characterization of *Dickeya* strains isolated from potato and river water samples in Finland. *Eur. J. Plant Pathol.*, 122: 213-225.
- LAURILA, J., HANNUKKALA, A., NYKYRI, J., PASANEN, M., HELIAS, V., GARLANT, L. and PIRHONEN, M. 2010. Symptoms and yield reduction caused by *Dickeya* spp. strains isolated from potato and river water in Finland. *Eur. J. Plant Pathol.*, 126: 249-262.
- LAWONGSA, P., BOONKERD, N., WONGKAEW, S., O'GARA, F. and TEAUMROONG, N. 2008. Molecular and phenotypic characterization of

- potential plant growth-promoting *Pseudomonas* from rice and maize rhizospheres. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 24: 1877-1884.
- LAWONGSA, P., BOONKERD, N., O'GARA, F. and TEAUMROONG, N. 2012. Biocontrol of phytopathogen by *Pseudomonas fluorescens* R21, isolated from rice rhizosphere in Thailand. *IJERD – Inter. J. Environ., R. Develop.*, 3 (1): 189-195.
- LEATH, K.T., LUKEZIC, F.L., PENNYPACKER, B.W., KENDALL, W.A., LEVINE, R.G. and HILL, R.R. 1989. Interaction of *Fusarium avenaceum* and *Pseudomonas viridiflava* in root rot of red clover. *Phytopathology*, 79: 436-440.
- LEE, Y.A. and YU, C.P. 2006. A differential medium for the isolation and rapid identification of a plant soft rot pathogen, *Erwinia chrysanthemi*. *J. Microbiol. Methods.*, 64: 200-206.
- LEFORT, F., CALMIN, G., CROVADORE, J., OSTERAS, M. and FARINELLI, L. 2013. Whole-Genome Shotgun Sequence of *Pseudomonas viridiflava*, a bacterium species pathogenic to *Arabidopsis thaliana*. *Genome Announc.*, 1 (1): 116-122.
- LELLIOT, R.A. and DICKEY, R.S. 1984. *Erwinia*. IN: KRIEG NR, HOLT JG, eds. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, pp. 469-476, Baltimore, USA.
- LELLIOT, R.A. and STEAD, D.E. 1987. Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. *Methods in Plant Pathology*, 2: 216.
- LÉVESQUE, A.C. 2001. Molecular methods for detection of plant pathogens what is the future. *Can. J. Plant Pathol.*, 24: 333-336.
- LI, P., LIN, B., SHEN, H. and PU, X. 2011. Species-specific detection of *Dickeya* spp. (*Pectobacterium chrysanthemi*) in infected banana tissues, soil and water. *African Journal of Biotechnol.*, 10 (74): 16774-16780.
- LI, Z., HANSEN, J.L., LIU Y., ZEMETRA, R.S. and BERGER, P.H. 2004. Using Real-Time PCR to determine transgene copy number in Wheat. *Plant Molecular Biology Reporter*, 22: 179-188.
- LIAO, C.H., MCCLALLUS, D.E. and WELLS, J.M. 1993. Calcium dependent pectate lyase production in the soft-rotting bacterium *Pseudomonas fluorescens*. *Phytopathology.*, 83: 813-818.
- 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.
- LICCIARDELLO, G., STRANO, C., BERTANI, I., BELLA, P., FIORE, A., FOGLIANO, V., VENTURI, V. and CATARA, V. 2012. N-acyl-homoserine-lactone quorum sensing in tomato phytopathogenic *Pseudomonas* spp. is involved in the regulation of lipodepsipeptide production. *J. Biotechnol.*, 159: 274-282.
- LICCIARDELLO, G., JACKSON, R.W., BELLA, P., STRANO, C.P., CATARA, A.F., ARNOLD, D.L., VENTURI, V., SILBY, M.W. and CATARA, V. 2014. Draft genome sequence of *Pseudomonas corrugata*, a phytopathogenic bacterium with potential industrial applications. *J. Biotechnol.*, 175: 65-66.
- LIN, B.R., SHEN, H.F., PU, X.M. and TIAN, X.S. 2010. First report of a soft rot of banana in mainland China caused by a *Dickeya* spp. (*Pectobacterium chrysanthemi*). *Plant Dis.*, 94: 640.

- LINDOW, S.E. 1983. The role of bacterial ice nucleation in frost injury to plants. *Annu. Rev. Phyt.*, 21: 363.
- LITTLE, E.L. and GILBERTON, S. 1994. First report of *Pseudomonas viridiflava* causing a leaf necrosis on basil. *Plant Dis.*, 78: 831.
- LIU, C., ZHAO, K., LIANG, C., WANG, H., GUAN, T., WANG, P. and WANG, Q. 2010. First report of Cucumber White Spot disease caused by *Pseudomonas viridiflava* in China. *IEEE Sens. J.*, 104 (2): 1-3.
- LOPEZ, M. and NOVAL, M. 1980. Bacterial diseases of tomato in Spain, In: Proceeding of the Fifth Congress of Mediterranean Phytopathological Union, Greece: *Hellenic Phytopathological Society*, pp. 140-141, 21-27 September, Athens, Greece.
- LOPEZ, M.M., SIVERIO, F., ALBIACH, R., GARCIA, F. and RODRIGUEZ, F.R. 1994. Characterization of Spanish isolates of *Pseudomonas corrugata* from tomato and pepper. *Plant Pathol.*, 43: 80-90.
- LUCON, C.M.M. and DE MELO, I.S. 1999. Selection of antagonistic rhizobacteria to *Erwinia caratovora* subsp. *atroseptica* on potato tubers. *Sumtna Phytopathologica*, 25: 132-136.
- LUKEZIC, F.L. 1979. *Pseudomonas corrugata*, a pathogen of tomato, isolated from symptomless alfalfa roots. *Phytopathology*, 69: 27-31.
- LUKEZIC, F.L., LEVINE, R.G. and McNAB, A.A., 1983-a. *Pseudomonas viridiflava* associated with stem necrosis on geraniums. *Phytopathology*, 85: 1040.
- LUKEZIC, F.L., LEVINE, R.G. and McNAB, A.A., 1983-b. *Pseudomonas viridiflava* associated with stem necrosis of mature tomato plants. *Phytopathology*, 73: 370.
- LUMB, V.M., PEROMBELON, M.C.M. and ZUTRA, D. 1986. Studies of a wilt disease of the potato plant in Israel caused by *Erwinia chrysanthemi*. *Plant Pathol.*, 35: 196-202.
- 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, B., HIBBING, M.E., KIM, H.S., REEDY, R.M., YEDIDIA, I. and BREUER, J. 2007. The host range and molecular phylogenies of the soft rot Enterobacterial genera *Pectobacterium* and *Dickeya*. *Phytopathology*, 97: 1150-1163.
- MACAGNAN, D., ROMEIRO, R.S., MACEDO, D.M. and SCHURT, D.A. 2007. Podridão em pós-colheita de batata (*Solanum tuberosum*) incitada por *Pseudomonas viridiflava*. *Summa Phytopathol.*, 33: 307-308.
- MAGYAROSY, A.C. and BUCHANAN, B.B. 1995. First report of *Pseudomonas corrugata* causing pith necrosis on geraniums. *Phytopathology*, 85: 1040.
- MALATRAKIS, N.E. and GOUMAS, D.E., 1987. Bacterial soft rot of tomato in plastic greenhouses in crete. *Ann. of Applied Biology.*, 111: 115-123.
- MALIN, E.M., ROTH, D.A., and BELDEN, E.L. 1983. Indirect immunofluorescent staining for were detection and identification of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* in naturally infected bean injected into marginal ear veins of New seed. *Plant Dis.*, 67: 645-647.
- MARIANO, R.L.R. and McCARTER, S.M. 1993. Epiphytic survival of *Pseudomonas viridiflava* on tomato and selected weed species. *Microb. Ecology*, 26: 47-58.

- MARINGONI, M. et al. 2003. First report of *Pseudomonas cichorii* on turmeric (*Curcuma longa*) in Brazil. *Plant Pathology*, 52: 794.
- MARK, G.L., MORRISSEY, J.P., HIGGINS, P. and O'GARA, F. 2006. Molecular based strategies to exploit *Pseudomonas* biocontrol strains for environmental biotechnology applications. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 56: 167-177.
- MARQUES, A.S.A., MARCHAISON, A., GARDAN, L. and SAMSON, R. 2008. BOX PCR-based identification of bacterial species belonging to *Pseudomonas syringae* - *P. viridiflava* group. *Gen. Mol. Biology*, 31 (1): 106-115.
- MARTIN-SANZ, A., PALOMO, J.L., PEREZ DE LA VEGA, M. and CAMINERO., C. 2010. First report of bacterial blight caused by *Pseudomonas viridiflava* on pea in Spain. *Plant Dis.*, 94: 128.
- MASCHER, F., HASE, C., MOE'NNE-LOCCOZ, Y. and DE'FAGO. G. 2000. The viable-but- nonculturable state induced by abiotic stress in the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0 does not promote strain persistence in soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66: 1662-1667.
- MAVRODI, O.V., MCSPADDEN GARDENER, B.B., MAVRODI, D.V., BONSALE, R.F., WELLER, D.M. and THOMASHOW, L.S. 2001. Genetic diversity of phlD from 2,4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* spp. *Phytopathology*, 91: 35-43.
- MAVRODI, D.V., MAVRODI, O.V., MCSPADDEN-GARDENER, B., LANDA, B., WELLER, D.M. and THOMASHOW, L.S. 2002. Identification of differences in genome content among phlD-Positive *Pseudomonas fluorescens* strains by using PCR-based subtractive hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68 (10): 5170-5176.
- MAVRODI, O.V., MAVRODI, D.V., THOMASHOW, L.S. and WELLER, D.M. 2007. Quantification of 2,4-Diacetylphloroglucinol-Producing *Pseudomonas fluorescens* strains in the plant rhizosphere by Real-Time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73 (17): 5531-5538.
- MAYAK, S., TIROSH, T. and GLICK, B.R. 2004. Plant growth promoting bacteria that confer resistance to water stress in tomato and pepper. *Plant Sci.*, 166: 525-530.
- MAZZOLLA, M., COOK, R.J., THOMASHOW, L.S., WELLER, D.M. and PIERSON, L.S. 1992. III Contribution of phenazine antibiotic biosynthesis to the ecological competence of fluorescent *Pseudomonas* in soil habitats. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58: 2616-2624.
- MAZZUCCHI, U. and BAZZI C. 1980. Il colpo di fuoco batterico: riconoscimento del materiale infetto ed identificazione del patogeno. *Inf. Fitopatol.*, 30: 3-20.
- McCARTER-ZORNER, N.J., HARRISON, M.D., FRANK, G.D., QUINN, C.E., ANSELLS, I. and GRAHAM, D.C. 1985. Soft rot *Erwinia* bacteria in the rhizosphere of weeds and crop plants in Colorado, United States and Scotland. *J. Appl. Bacteriol.*, 59: 357-368.
- McCARTNEY, H.A., FOSTER, S.J., FRAAIJE, B.A. and WARD, E. 2003. Molecular diagnostics for fungal plant pathogens. *Pest Manage. Sci.*, 59: 129-142.
- McFADDEN, L.A. 1961. A bacterial leaf spot of florists chrysanthemum, *Chrysanthemum morifolium*. *Plant Dis.*, 45: 16-19.
- McGUIRE, R.G., JONES, J.B. and SASSER, M. 1986. Tween medium for semiselective isolation of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* from soil and plant materials. *Plant Dis.*, 70: 887-891.

- McMILLAN, G.P., BARRETT, A.M. and PÈROMBELON, M.C.M. 1994. An isoelectric focusing study of the effect of methyl-esterified pectic substances on the production of extracellular pectin isoenzymes by soft rot *Erwinia* spp. *J. App. Bacteriol.*, 77: 175-184.
- MEYER, J.M., GEOFFROY, V.A., BAIDA, N., GARDAN, L., IZARD, D., LEMANCEAU, P., ACHOUAK, W. and PALLERONI, N.J. 2002. Siderophore typing, a powerful tool for the identification of fluorescent and nonfluorescent *Pseudomonads*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68: 2745-2753.
- MIGULA, W. 1895. Ueber ein neues System der Bakterien. *Arb. bakt. Inst. Karlsruhe*, 1: 235.
- MIJATOVIC, M., MARANKOVIC, N., MARKOVIC, Z. and ALECSIZ, Z. 1988. *Pseudomonas* spp. Prouzrokovac necroze srzi I uvenuca paradajza. *Zastita Bilja*, 39: 89-93.
- MİRİK, M., AYSAN, Y. and SAHİN, F. 2011. Characterization of *Pseudomonas cichorii* isolated from different hosts in Turkey. *Int. J. Agric. Biol.*, 13: 203-209.
- MOLAN, Y. and İBRAHİM Y. 2006. First report of tomato (*Lycopersicon esculentum*) Pith necrosis caused by *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas corrugata* in the Kingdom of Saudi Arabia. *Plant Dis.*, 91: 110.
- MORRISSEY, J.P., ABBAS, A., MARK, L., CULLINANE, M. and O'GARA, F. 2004. Biosynthesis of antifungal metabolites by biocontrol strains of *Pseudomonas*. *Biosynthesis of Macromolecules and Molecular Metabolism*, 3: 635-670.
- MOURA, M., JACQUES, M., BRITO, L., MOURAO, I. and DUCLOS, J. 2005. Tomato pith necrosis (TPN) caused by *P. corrugata* and *P. mediterranea*: severity of damages and crop loss assessment. *Acta Horticulturae*, 695: 365-372.
- NASSAR, A., DARRASE, A., LEMATTRE, M., KOTOUJANSKY, A., DERVIN, C. and VEDEL, R. 1996. Characterization of *Erwinia chrysanthemi* by pectinolytic isozyme polymorphism and restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified fragments of *pel* genes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62: 2228-2235.
- NATSCH, A., KEEL, C., PFIRTER, H.A., HAAS, D. and DE'FAGO, G. 1994. Contribution of the global regulator gene *gacA* to persistence and dissemination of *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strain CHA0 introduced into soil microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60: 2553-2560.
- NAUMANN, K. 1980. Die 'bacterielle stengelmark-necrose der tomate' ein neues krankheitsbild in gewachshaus kulteren. *Nachrichtenblatt für den Pflanzenschutz in der DDR*, 34: 226-231.
- NAUMANN, K., GRIESBACH, E. and LATTASCHKE, E. 1989. Occurrence and importance of bacterial stem pith necrosis of tomato in the GDR. In: *Proceedings of the 7<sup>th</sup> International Conference of Plant Pathogenic Bacteria* (Klement, Z., ed.), pp. 473-478, 11-16 June, Budapest: Akadémiai Kiadó.
- NETO, J.R., MALAVOLTA, V.A., RAMOS, R.S. and SINIGAGLIA, C., 1990. *Summa. Phytopathologica*, 16: 279-284.
- NORMAN, D.J., YUEN, J.M.F., RESENDIZ, R. and BOSWELL, J. 2003. Characterization of *Erwinia* populations from nursery retention ponds and lakes infecting ornamental plants in Florida. *Plant Dis.*, 87: 193-196.



- NOTZ, R., MAURHOFER, M., SCHNIDER-KEEL, U., DUFFY, B., HAAS, D. and DEFAGO, G. 2001. Biotic factors affecting expression of the 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis gene *phlA* in *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strain CHA0 in the rhizosphere. *Phytopathology*, 91: 873-881.
- OĞUZ, A. 2010. Bazı yerel domates genotiplerinde farklı yöntemler kullanarak, domates lekeli solgunluk virüsü (*Tomato Spotted Wilt Virus* = TSWV)'ne dayanıklılığın ve genetik varyasyonun araştırılması. Doktora tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara, 166 s.
- OLIVERA, E.R., CARNICERO, D., JODRA, R., MINAMBRES, B., GARCIA, B., ABRAHAM, G.A., GALLARDO, A., ROMÁN, J.S., GARCÍA, J.L., NAHARRO, G. 2001. Genetically engineered *Pseudomonas*: a factory of new bioplastics with broad applications. *Environ. Microbiol.*, 3: 612-618.
- OPIO, F.A., ALLEN, J.D. and TERI, M.J. 1996. Pathogenic variation in *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*, the causal agent of common bacterial blight in *Phaseolus beans*. *Plant Pathol.*, 45: 1126-1133.
- PADAGA, M., HEARD, G.M., PATON, J.E. and FLEET, G.H. 2000. Microbial species associated with different sections of broccoli harvested from three regions in Australia. *Int. J. Food Microbiol.*, 60: 15-24.
- PALACIO-BIELSA, A., CAMBRA, M.A. and LOPEZ, M.M. 2006. Characterization of potato isolates of *Dickeya chrysanthemi* in Spain by a microtiter system for biovar determination. *Ann. Appl. Biol.*, 148: 157-164.
- PALLERONI, J.N. 2005. Genus I. *Pseudomonas* Migula 1894, In: G.M. Garrity, D.J. Brenner, N.R. Krieg, J.R. Staley (Editors), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume Two: The Proteobacteria, Part C*, Springer. pp. 325-340, Verlag.
- PANDEY, A., PALNI, L.M.S. and NILADRI, B. 2000. Biological hardening of tissue culture raised plants through rhizosphere bacteria. *Biotechnol. Lett.*, 22: 1087-1091.
- PANDEY, A., PALNI, L.M.S. and HEBBAR, K.P. 2001. Suppression of damping off in maize seedlings by *Pseudomonas corrugata*. *Microbiol. Res.*, 156: 191-194.
- PARK, T.H., CHOI, B.S., CHOI, A.Y., CHOI, I.Y., HEU, S. and PARK, B.S. 2012. Genome sequence of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* strain PCC21, a pathogen causing soft rot in Chinese cabbage. *J. Bacteriol.*, 194 (22): 6345-6346.
- PAULITZ, T., ZHOU, C. and RANKIN, L. 1992. Selection of rhizosphere bacteria for biological control of *Pythium aphanidermatum* on hydroponically grown cucumber. *Biol. Control.*, 2: 226-237.
- PAULSEN, T. et al. 2006. Complete genome sequence of the plant commensal *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Nat. Biotechnol.*, 23: 873-878.
- PEKHTEREVA, E.S., KORNEV, K.P., MATVEEVA, E.V., POLITYKO, V.A., BUDENKOV, N.I., IGNATOV, A.N. and SCHAAD N.W. 2006. Pith necrosis of tomato in Russia. ISHS Acta Horticulture 808: II International Symposium on Tomato Disease, pp. 251-253, 8-12 October, Russia.
- PERALTA, I. E. and SPOONER, D.M. 2005 . Morphological characterization and relationships of wild tomatoes. (*Solanum* L. section *Lycopersicon*). *Mon. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.*, 104: 227-257.

- PEREZ, F.E., SILVERA, P.E. and GEPP, W.V. 2004. *Pseudomonas viridiflava* (BURKHOLDER) Dowson agente causal de manchas necroticas en nojas de cebolla Yajo (*Allium* spp.) en Uruguay. *Agrociencia*, 8 (2): 33-38.
- PÉROMBELON, M.C.M. and KELMAN, A. 1980. Ecology of soft rot *Erwinias*. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 18: 361-367.
- PÉROMBELON, M.C.M. and KELMAN A, 1987. Blackleg and other potato diseases caused by soft rot *Erwinias*: proposal for revision of terminology. *Plant Dis.*, 71: 283-285.
- PÉROMBELON, M.C.M. and SALMOND, G.P.C. 1995. Bacterial soft rots. In: Pathogenesis and host specificity in Plant Disease I: Prokaryotes (Singh, U.S., Singh, R.P. and Kohmoto, K., eds), pp. 1-20. Oxford, UK: Pergamon. In: Toth, I.K., Bell, K.S., Holeva, M.C. and Birch, P.R.J. 2003. Soft rot *Erwinia*: from genes to genomes. *Mol. Plant. Pathol.*, 4 (1): 17-30.
- PÉROMBELON, M.C.M. 2002. Potato diseases caused by soft rot *Erwinias*: an overview of pathogenesis. *Plant Pathol.*, 51: 1-12.
- PETERSEN, M. and WENGEL, J. 2003. LNA: a versatile tool for therapeutics and genomics. *Trends Biotechnol.*, 21: 74-81.
- PFENDER, W.F., KRAUS, J. and LOPER, J.E. 1993. A genomic region from *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 required for pyrrolnitrin production and inhibition of *Pyrenophora tritici-repentis* in wheat straw. *Phytopathology*, 83: 1223-1228.
- PICARD, C. and BOSCO, M. 2003. Soil antimony pollution and plant growth stage affect the biodiversity of auxin-producing bacteria isolated from the rhizosphere of *Achillea ageratum* L. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 46: 73-80.
- PIERSON, E.A., and WELLER, D.M. 1994. Use of mixtures of fluorescent *Pseudomonas* to suppress take-all and improve the growth of wheat. *Phytopathology*, 84: 940-947.
- PRITCHARD, L., HUMPHRIS, S., SADDLER, G.S., ELPHINSTONE, J.G., PIRHONEN, M. and TOTH, I.K. 2013. Draft genome sequences of 17 isolates of the plant pathogenic bacterium *Dickeya*. *Genome Announc.*, 21 (1): 6.
- POPKOVA, K. V., and NOSOVA, O. N. 1989. Osobennosti razvitiya bacterozov tomato u teplichnoj kulture. *Izvestiya Timiryazevskoj Sel'skokhozyajstvennoj Akademii*, 1: 100-106.
- PUJOL, M., BADOSA, E., MANCEAU, C. and MONTESINOS, E. 2006. Assessment of the environmental fate of the biological control agent of Fire Blight, *Pseudomonas fluorescens* EPS62e, on apple by culture and Real-Time PCR methods. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72 (4): 2421-2427.
- QUTRY, M.F., CEREZ, M.T., DE CLEENE, M., SWINGS, J. and MEV, T.W. 1992. Pathogenic *Pseudomonas* associated with steath rot and grain discoloration of rice. In: Abstracts of the 8<sup>th</sup> International Conference on plant pathogenic bacteria, pp. 1-5, 9-12 June, France.
- QIN, X., EMERSON, J., STAPP, L., ABE, P. and BURNS, J.L. 2003. Use of Real-Time PCR with multiple targets to identify *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermenting Gram-negative bacilli from patients with cystic fibrosis. *J. Clin. Microbiol.*, 41 (9): 4312-4317.
- RAAIJMAKERS, J.M., WELLER, D.M. and THOMASHOW, L.S. 1997. Frequency of antibiotic-producing *Pseudomonas* spp. in natural environments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63: 881-887.

- RAAIJMAKERS, J.M. and WELLER, D.M. 1998. Natural plant protection by 2,4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas* spp. in take-all decline soils. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 11: 144-152.
- RAEYMAEKERS, L. 2000. Basic principles of quantitative PCR. *Mol. Biotechnol.*, 15: 115-122.
- RAMAMOORTHY, V., VISWANATHAN, R., RAGUCHANDER, T., PRAKASAM, V. and SAMIYAPPAN, R. 2001. Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pest and diseases. *Crop Protect.*, 20: 1-11.
- RAMESHKUMAR, N., THIRUMALAI, A.V. and GUNASEKARAN, P. 2002. Genotyping of antifungal compounds producing plant growth promoting rhizobacteria. *Pseudomonas fluorescence. Curr. Sci.*, 12: 1463-1466.
- RAMETTE, A., FRAPOLLI, M., DÉFAGO, G. and MOËNNE-LOCCOZ, Y. 2003. Phylogeny of HCN synthase-encoding *hcnBC* genes in biocontrol fluorescent *Pseudomonas* and its relationship with host plant species and HCN synthesis ability. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 16: 525-535.
- REZZONICO, F., MOËNNE-LOCCOZ, Y. and DÉFAGO, G. 2003. Effect of stress on the ability of a *phlA*-Based quantitative competitive PCR assay to monitor biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69: 686-690.
- REZZONICO, F., MARCELLO, Z., KEEL, C., DUFFY, B., MOËNNE-LOCCOZ, Y. and DÉFAGO, G. 2006. Is the ability of biocontrol fluorescent *Pseudomonads* to produce the antifungal metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol really synonymous with higher plant protection?. *New Phytologist*, 173: 861-872.
- RHODES, M.E. 1959. The characterization of *Pseudomonas fluorescens*. *J. Gen. Microbiol.*, 21: 221-265.
- RHODES, D. 2008. Department of horticulture and landscape architecture hort 410-vegetable crops tomatoes – notes. <http://www.hort.purdue.edu.tr> (Son erişim tarihi: 13.09.2014).
- RINTALA, H., NEVALAINEN, A., RONKA, E. and SUUTARI, M. 2001. PCR primers targeting the 16S rRNA gene for the specific detection of streptomycetes. *Mol. Cell. Probes.*, 15: 337-347.
- RISSE, D., BEIDERBECK, H., TARAZ, K., BUDZIKIEWICZ, H. and GUSTINE, D. 1998. Corrugatin, a lipopeptide siderophore from *Pseudomonas corrugata*. *Z. Naturforsch.*, 53: 295-304.
- RODRIGUEZ, F. and PFENDER, W.F. 1997. Antibiosis and antagonism of *Sclerotinia homoeocarpa* and *Drechslera poae* by *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 *in vitro* and in planta. *Phytopathology*, 87: 614-621.
- RUIZ, J.J., ALONSO, A., GARCIA-MARTINEZ, S., VALERO, M., BASCO, P. and RUIZ-BEVIA, F. 2005. Quantitative analyses of flavour volatiles detects differences among closely related traditional cultivars of tomato. *J. Sci. Food Agric.*, 85: 54-60.
- RYDER, M.H. and BORRETT, M.A. 1991. Root colonization by non-fluorescent *Pseudomonads* used for the control of wheat take-all. *Bull. Srop.*, 14: 302-307.
- RYDER, M.H. and ROVIRA, A.D., 1993. Biological control of take-all of glasshouse-grown wheat using strains of *Pseudomonas corrugata* isolated from wheat field soil. *Soil Biol. Biochem.*, 25: 311-320.

- SADOWSKA, R.M., PEIN, B. and BUTTNER, C. 1997. Transmission of *Pseudomonas corrugata* by watering and by nutrient solutions of low tide-high tide-irrigation-systems. *Gesunde Pflanzen*, 49: 226-229.
- SAIKI, R.K., SCHARF, S., FALOONA, F., MULLIS, K.B., HORN, G.T., ERLICH, H.A. and ARNHEIM, N. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230 (4732): 1350-1354.
- SALM, H. and GEIDER, K. 2004. Real-time PCR for detection and quantification of *Erwinia amylovora*, the causal agent of fireblight. *Plant Pathol.*, 53 (5): 602-610.
- SAMSON, R., FOUTIER, F., SAILLY, M. and JOUAN, B. 1987. Caracterisation des *Erwinia chrysanthemi* isolees de *Solanum tuberosum* et d'autres plantes-hotes selon les biovars et serogroupes. *EPPO Bull.*, 17: 11-16.
- SAMSON, R., LEGENDRE, J.B., CHRISTEN, R., SAUX, M.F.L., ACHOUAK, W. and GARDAN, L. 2005. Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Burkholder et al. 1953) Brenner et al. 1973 and *Brenneria paradisiaca* to the genus *Dickeya* gen. nov. as *Dickeya chrysanthemi* comb. nov. and *Dickeya paradisiaca* comb. nov. and delineation of four novel species, *Dickeya dadantii* sp. nov., *Dickeya dianthicola* sp. nov., *Dickeya dieffenbachiae* sp. nov. and *Dickeya zea* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 55: 1415-1427.
- SANCHEZ, L. et al. 2003. Distribution and pathogenicity of *Pseudomonas cichorii* (Swingle Stapp) in coffee in Puerto Rico. *Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico*, 87 (3-4): 123-135.
- SARAVANAKUMAR, D. and SAMIYAPPAN, R. 2007. ACC deaminase from *Pseudomonas fluorescens* mediated saline resistance in groundnut (*Arachis hypogea*) plants. *J. Appl. Microbiol.*, 102: 1283-1292.
- SAYGILI, H., ŞAHİN, F., AYSAN, Y. and MİRİK, M., 2004. New symptoms of tomato soft rot diseases in Turkey. Proceedings of the 1<sup>st</sup> International Symposium on Tomato Diseases and 19<sup>th</sup> Annual Tomato Disease Workshop, Acta Hort. 695, pp. 291-294, 21-24 June, Orlando, Florida, USA.
- SBRANA, C., AGNOLUCCI, M., BEDINI, S., LEPERA, A., TOFFANIN, A., GIOVANNETTI, M. and NUTI, M.P. 2002. Diversity of culturable bacterial populations associated to *Tuber borchii* ectomycorrhizas and their activity on *T. borchii* mycelial growth. *FEMS Microbiol. Lett.*, 211: 195-201.
- SCALONI, A. et al. 2004. Structure, conformation and biological activity of a novel lipodepsipeptide from *Pseudomonas corrugata*: cormycin. *A. Biochem. J.*, 384: 25-36.
- SCARLETT, C.M., FLETCHER, J.T., ROBERTS, P. and LELLIOTT, R.A. 1978. Tomato pith necrosis caused by *Pseudomonas corrugata*. *Ann. Appl. Biol.*, 88: 105-114.
- SCHAAD, N.W. and BRENNER, D. 1977. Bacterial wilt and root rot of sweet potato caused by *Erwinia chrysanthemi*. *Phytopathology*, 67: 302-308.
- SCHAAD, N.W., BERTHIER-SCHAAD, Y., SECHLER, A. and KNORR, D. 1999. Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in potato tubers by BIO-PCR and automated Real-Time fluorescence detection system. *Plant Dis.*, 83 (12): 1095-1100.
- SCHAAD, N.W. and FREDERICK, R.D. 2002. Real-Time PCR and its application for rapid plant disease diagnostics. *Can. J. Plant Pathol.*, 24: 250-258.

- SCHAAD, N.W., OPGENORTH, D. and GAUSH, P. 2002. Real-Time Polymerase Chain Reaction for one-hour on-site diagnosis of pierce's disease of grape in early season asymptomatic vines. *The Am. Phytopathol. Soc.*, 92 (7): 721-728.
- SCHAAD, W.N., BERTHIER-SCHAAD, Y. and KNORR, D. 2007. A high throughput membrane BIO-PCR technique for ultra-sensitive detection of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Plant Pathol.*, 56: 1-8.
- SCHISLER, D.A. and SLININGER, P.J. 1994. Selection and performance of bacterial strains for biologically controlling *Fusarium* dry rot of potatoes incited by *Gibberella pulicaris*. *Plant Dis.*, 78: 251-255.
- SCORTICHINI, M. 1989. Occurrence in soil and primary infections of *Pseudomonas corrugata* Roberts and Scarlett. *J. Phytopathol.*, 125: 33-40.
- SCORTICHINI, M., 1992. Consideration on the appearance of *Pseudomonas corrugata* as a new plant pathogen. *Plant Pathogenic Bacteria*, 66: 149-154.
- SCORTICHINI, M. and ROSSI, M.P. 1993. Response of some wild species of *Lycopersicon* and tomato cultivars to *Pseudomonas corrugata* Roberts et Scarlett. *Phytopathology*, 32: 223-227.
- SCORTICHINI, M. and MORONE, C. 1997. Apoplexy of peach trees caused by *Pseudomonas viridiflava*. *J. Phytopathology*, 145 (8-9): 397-399.
- SELVAM, D.G., THATHEYUS, A.J. and VIDHYA, R. 2013. Biodegradation of the synthetic pyrethroid, fenvalerate by *Pseudomonas viridiflava*. *Am. J. Microbiol. Res.*, 1 (2): 32-38.
- SEO, S.T., FURUYA, N., LIM, C.K., TAKANAMI, Y. and TSUCHIYA, K. 2002. Phenotypic and genetic diversity of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* strains from Asia. *J. Phytopathol.*, 150: 120-127.
- SERFONTEIN, S., LOGAN, C., SWANEPOEL, A.E., BOELEMA, B.H. and THERON, D. J. 1991. A potato wilt disease in South Africa caused by *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* and *E. chrysanthemi*. *Plant Pathol.*, 40: 382-386.
- SESTO, F., AREDDIA, R. and CATARA, V. 1996 Identification of *Pseudomonas corrugata* in tomato plant lets in nursery. *Informatore Fitopatologico*, 46 (1): 62-64.
- SHANAHAN, P., O'SULLIVAN, D.J., SIMPSON, P., GLENNON, J.D. and O'GARA, F. 1992. Isolation of 2,4-diacetylphloroglucinol from a fluorescent *Pseudomonas* and investigation of physiological parameters influencing its production. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58: 353-358.
- SHARIFI-TEHRANI, A., ZALA, M., NATSCH, A., MOENNE-LOCCOZ, Y. and DEFAGO, G. 1998. Biocontrol of soil-borne fungal plant diseases by 2,4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonads* with different restriction profiles of amplified 16S rDNA. *Eur. J. Plant Pathol.*, 104: 631-643.
- SIJAM, K., CHANG, C.J. and GITAITIS, R.D. 1992. A medium for differentiating tomato and pepper strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Can. J. Plant Pathol.*, 14: 182-184.
- SIVERIO, F., CAMBRA, M., GORRIS, M.T., CORZO, J. and LOPEZ, M.M. 1993. Lipopolysaccharides as determinants of serological variability in *Pseudomonas corrugata*. *Appl Environ. Microbiol.*, 59: 1805-1812.
- SIVERIO, F., CARBONELL, E.A., GARCIA, F. and LOPEZ, M.M. 1996. Characteristics of the whole cell fatty acid profiles of *Pseudomonas corrugata*. *Eur. J. Plant Pathol.*, 102: 519-526.

- SKOUDRIDAKIS, M., 1986. Problemes des maladies bacteriennes en cultures maraicheres protees en Crete. *OEPP/EPP Bulletin*, 16: 437-439.
- SLAWIAK, M., VAN BECKHOVEN, J.R., ADRIANUS, G.C.M., SPEKSNIJDER, C.L., CZAJKOWSKI, R., GRABE, G. and VAN DER WOLF, J.M. 2009-a. Biochemical and genetical analysis reveal a new clade of biovar 3 *Dickeya* spp. strains isolated from potato in Europe. *Eur. J. Plant Pathol.*, 125: 245-261.
- SLAWIAK, M., LOJKOWSKA, E. and VAN DER WOLF, J.M. 2009-b. First report of bacterial soft rot on potato caused by *Dickeya* spp. (syn. *Erwinia chrysanthemi*) in Poland. *Plant Pathol.*, 58: 794.
- SMILANICK, J.L., DENIS-ARRUE, R., BOSCH, J.R., GONZALEZ, A.R., HENSON, D. and JANISIEWICZ, W.J. 1993. Control of postharvest brown rot of nectarines and peaches by *Pseudomonas* species. *Crop Prot.*, 12: 513-520.
- SMITH, C. and BARTZ, J.A. 1990. Variation in pathogenicity and aggressiveness of strains of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* isolated from different hosts. *Plant Dis.*, 74: 505-509.
- SNIJDER, R.C. and VAN TUYL, J.M. 2002. Evaluation of tests to determine resistance of *Zantedeschia* spp. *Araceae* to soft rot caused by *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Eur. J. Plant Pathol.*, 108: 565-571.
- SOLAIMAN, D.K.Y., ASHBY, R.D. and FOGLIA, T.A. 2000. Rapid and specific identification of medium-chain-length polyhydroxyalkanoate synthase gene by polymerase chain reaction. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 53: 690-694.
- SOLAIMAN, D.K.Y., CATARA, V. and GRECO, S., 2005. Poly(hydroxyalkanoate) synthase genotype and PHA production of *Pseudomonas corrugata* and *P. mediterranea*. *Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 32: 75-82.
- SPEIGHTS, D.E., HALLIWELL, R.S., HORNE, C.W. and HUGHES, A.B. 1967. A bacterial stem rot of greenhouse grown tomato plants. *Phytopathology*, 57: 902-904.
- STAPP, C. 1928. Schizomycetes (Spaltpilze oder Bakterien). In P. Sorauer (Ed.), *Handbuch der Pflanzenkrankheiten* Berlin: Paul Parey, 1-295 p.
- STEAD, D.E. 1992. Grouping of plant-pathogenic and some other *Pseudomonas* spp. by using cellular fatty acid profiles. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 42: 281-295.
- STEFANOVA, M., OVIES, J. and RODRIQUEZ, I. 1984. Detection and serological study of *Erwinia chrysanthemi* on tomato. *Plant Pathol.*, 64: 2167.
- STUTZ, E., DEFAGO, G. and KERN, H. 1986. Naturally occurring *fluorescent Pseudomonads* involved in suppression of black root rot of tobacco. *Phytopathology*, 76: 181-185.
- SUBRAMANIAN, S., GADHAVE, K.R., MOHANRAJ, P. and THANGAMALAR, A. 2009. Use of 16S rRNA probes for characterization of gut microflora of silkworm (*Bombyx mori* L.) breeds. *Karnataka J. Agric. Sci.*, 22 (3): 476-478.
- SUTRA, L., SIVERIO, F., LOPEZ, M.M., HUNAUULT, G., BOLLET, C. and GARDAN, L. 1997. Taxonomy of *Pseudomonas* strains isolated from tomato pith necrosis. emended description of *Pseudomonas corrugata* and proposal of three unnamed *Fluorescent Pseudomonas* genomospecies. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 47: 1020-1033.
- SWINGLE, D.B. 1925. Center rot of 'French endive' or wilt of chicory (*Chichorium intybus* L.). *Phytopathology*, 15: 730.

- ŞAHİN, F., AYSAN, Y. and SAYGILI, H. 2005. First observation of pith necrosis on tomato caused by some *Pseudomonas* species in Turkey. *Acta. Hortic.*, 695: 93-96.
- ŞENİZ, V. 1992. Domates, biber ve patlıcan yetiştiriciliği. TAV Yayınları, Yayın No; 26, Yalova, 23-127 s.
- TANPRASERT, P. and REED, B.M. 1997. Detection and identification of bacterial contamination from strawberry runner explants. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant.*, 33: 221-226.
- TAYLOR, J.B. 1986. Biosystematic of the tomato in J. G. Atherton and J. Rudich (eds.) The tomato crop: A scientific basis for improvement. *Chapman and Hall.*, pp. 1-34, London.
- TEKMAN, H. 2005. Domateste öz nekrozuna neden olan tanılanamayan *Pseudomonas* spp. izolatların morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve serolojik yöntemlerle tanılanması ve karakterizasyonu. Yüksek lisans tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana, 53 s.
- THOMASHOW, L.S. and WELLER, D.M. 1996. Current concepts in the use of introduced bacteria for biological disease control: mechanisms and antifungal metabolites. In G. Stacey and N. T. Keen (ed.), *Plant-microbe interactions*, 1: 187-236.
- THOMASHOW, L.S., BONSALE, R.F. and WELLER, D.M. 2002. Antibiotic production by soil and rhizosphere microbes in situ. In C. J. Hurst, R. L. Crawford, G. R. Knudsen, M. J. McInerney, and L. D. Stetzenbach (ed.), *Manual of environmental microbiology*, 2<sup>nd</sup> ed. *American Society for Microbiology*, pp. 638-647, Washington.
- THOMSON, S.V., HILDEBRAND, D.C. and SCHROTH, M.N. 1981. Identification and nutritional differentiation of the *Erwinia* sugarbeet pathogen from members of *Erwinia carotovora* and *Erwinia chrysanthemi*. *Phytopathology.*, 71: 1037-1042.
- THORNLEY, M.J. 1960. The differentiation of *Pseudomonas* from other Gram-negative bacteria on the basis of arginine metabolism. *J. Appl. Bacteriol.*, 23: 37-52.
- TIGCHELAAR, E.C. 1986. Tomato Breeding. In *Breeding Vegetable Crops* (M.J. Bassett ed.), pp. 135-171. Avi Publishing Company, Inc. Westport, Connecticut.
- TİTİZ, Ş. 2004. Modern Seracılık: Yatırımcıya Yol Haritası. ANSIAD Yayınları, Antalya, 124 s.
- TOKGÖNÜL, S. 1995. Akdeniz Bölgesinde örtü altında yetiştirilen domateslerde sorun olan bakteriyel hastalıklar. 7. Türkiye Fitopatoloji Kongresi, ss. 402-406, 26-29 Eylül, Adana.
- TOTH, I.K., AVROVA, A.O. and HYMAN, L.J. 2001. Rapid identification and differentiation of the soft rot *Erwinias* by 16S-23S integenic transcribed spacer and restriction fragment length polymorphism analysis. *App. Env. Microbiol.*, 67: 4070-4076.
- TOTH, I.K., BELL, K.S., HOLEVA, M.C. and BIRCH, P.R.J. 2003. Soft rot *Erwiniae*: from genes to genomes. *Mol. Plant Pathol.*, 4: 17-30.
- TOTH, I., VAN DER WOLF, J.M., SADDLER, G., LOJKOWSKA, E., HE'LIASE, V., PIRHONEN, M., TSROR, L.L. and ELPHINSTONEH, J.G. 2011. *Dickeya*

- species: an emerging problem for potato production in Europe. *Plant Pathol.*, 60: 385-99.
- TRANTAS, A.E., SARRIS, F.P., MPALANTINAKI, E.E., PENTARI, G.M., VERVERIDIS, N.F. and GOUMAS, E.D. 2013. A new genomovar of *Pseudomonas cichorii*, a causal agent of tomato pith necrosis. *Eur. J. Plant Pathol.*, 137: 477-493.
- TRANTAS, E.A., SARRIS, P.F., PENTARI, M.G., MPALANTINAKI, E.E., VERVERIDIS, F.N. and GOUMAS, D.E. 2014. Diversity among *Pseudomonas corrugata* and *Pseudomonas mediterranea* isolated from tomato and pepper showing symptoms of pith necrosis in Greece. *Plant Pathol.*, Doi: 10.1111/ppa.12261 (Son erişim tarihi: 24.10.2014).
- TROXLER, J., ZALA, M., NATSCH, A., MOE'NNE-LOCCOZ, Y., KEEL, C. and DE'FAGO, G. 1997. Predominance of nonculturable cells of the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0 in the surface horizon of large outdoor lysimeters. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63: 3776-3782.
- TSROR, L.L., ERLICH, O., LEBLUSH, S., HAZANOVSKY, M., ZIG, U., SLAWIAK, M, GRABE, G., VAN DER WOLF, J.M. and VAN DE HAAR, J.J. 2009. Assessment of recent outbreaks of *Dickeya* spp. (syn. *Erwinia chrysanthemi*) slow wilt in potato crops in Israel. *Eur. J. Plant Pathol.*, 123: 311-320.
- TSROR, L.L., ERLICH, O., HAZANOVSKY, M., BEN DANIEL, B., ZIG, U. and LEBIUSH, S. 2012. Detection of *Dickeya* spp. latent infection in potato seed tubers using PCR or ELISA and correlation with disease incidence in commercial field crops under hot-climate conditions. *Plant Pathol.*, 61: 161-168.
- ÜLKE, G. 2003. Domates öz nekrozu etmenleri *Pseudomonas cichorii* ve *Pseudomonas corrugata*'nın tanısı, epidemiyolojileri ve entegre mücadelesi üzerinde araştırmalar. Doktora tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana, 122 s.
- ÜRÜN, Ş. 2008. Bitki patojenleri *Pectobacterium carotovorum*, *Pectobacterium atrosepticum* ve *Erwinia amylovora*'da *RelA* proteininin western blot yöntemiyle araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta, 61 s.
- ÜSTÜN, N. and SAYGILI, H., 2001. Pith Necrosis on greenhouse tomatoes in Aegean region of Turkey. 11<sup>th</sup> Congress of the Mediterranean Phytopathological Union and 3rd Congress of the Sociedade Portuguesa de Fitopatologia, pp. 70-73, 17-20 September, Evora-Portugal.
- VAN BECKHOVEN, J.R.C.M., STEAD, D.E. and VAN DER WOLF, J.M. 2002. Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* by AmpliDet RNA, a new technology based on Real-Time monitoring of NASBA amplicons with a molecular beacon. *J. Appl. Microbiol.*, 93 (5): 840-849.
- VAN DER WOLF, J.M., HYMAN, L.J., JONES, D.A.C., GREVESSE, C., VAN BECKHOVEN, J.R., VAN VUURDE, J.W. and PÉROMBELON, M.C. 1996. Immunomagnetic separation of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* from potato peel extracts to improve detection sensitivity on a crystal violet pectate medium or PCR. *J. Appl. Bacteriol.*, 80: 487-95.
- VERDONCK, L., MERGAERT, J., RIJCKAERT, C., SWINGS, J., KERSTERS, K. and DE LEY, J. 1987. Genus *Erwinia*: numerical analysis of phenotypic features. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 37: 4-18.



- VERSALOVIC, J., KOEUTH, T. and LUPSKI, J.R. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.*, 19: 6823-6831.
- VICTORIA, J.I. and GRANADA, G.A., 1981. Soft rot of tomatoes induced by *Erwinia chrysanthemi* in Colombia. Fifth International Conference on Plant Pathogenic Bacteria. pp. 22-26, 16-23 August, Colombia.
- VICTORIA, J.I. and GRANADA, G.A. 1983. A bacterial soft rot of tomatoes induced by *Erwinia chrysanthemi* in Cauca Valley (Columbia). *Fitopatologia.*, 18: 31-33.
- VINCENT, M.N., HARRISON, L.A., BRACKIN, J.M., KOVACEVICH, P.A., MURKERJI, P., WELLER, D.M. and PIERSON, E.A. 1991. Genetic analysis of the anti-fungal activity of a soilborne *Pseudomonas aureofaciens* strain. *Appl. Environ. Microb.*, 57: 2928-2934.
- VIVEKANANTHAN, R., RAVI, M., RAMANATHAN, A. and SAMIYAPPAN, R. 2004. Lytic enzymes induced by *Pseudomonas fluorescens* and other biocontrol organisms mediate defence against the anthracnose pathogen in mango. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 20: 235-244.
- VOGELSANGER, V.J. and GRIMM, R. 1983. Bakterienkrankheiten in unseren tomatenkulturen, verursacht durch *Corynebacterium michiganense*, *Pseudomonas syringae* var. *tomato* und *Pseudomonas corrugata*. *Gesunde Pflanzen*, 35: 222-22.
- VURAL, H. 1998. Endüstriyel amaçlı sebze üretiminin sorunları, çözüm önerileri. Ege Bölgesi I. Tarım Kongresi, ss. 127-131, 7-11 Eylül 1998, Aydın.
- VURAL, H., EŞİYOK, D. ve DUMAN, I. 2000. Kültür sebzeleri (sebze yetiştirme). Ege Üniversitesi Basım Evi, Bornova, İzmir, 440 s.
- WALDEE, E.L. 1945. Comparative studies of some peritrichous phytopathogenic bacteria. *Iowa State Journal of Science*, 19: 435-84.
- WALKER, C., GOODYEAR, C., ANDERSON, D. and TITBALL, R.W. 2000. Identification of arsenic-resistant bacteria in the soil of a former munitions factory at Locknitz, Germany. *Land Contamination Reclamation*, 8: 13-18.
- WANG, X., DODDAPANENI, H., CHEN, J., and YOKOMI, R.K. 2014. Improved Real-Time PCR diagnosis of citrus stubborn disease by targeting prophage genes of *Spiroplasma citri*. *Plant Dis.*, <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-06-14-0572-RE> (Son erişim tarihi:20.08.2014).
- WATTIAU, P.M.E., RENARD, P., LEDENT, D.V., BLACKMAN, G. and AGATHOS, S.N. 2001. A PCR test to identify *Bacillus subtilis* and closely related species and its application to the monitoring of waste water bio-treatment. *Appl. Microbiol. Biot.*, 56: 816-819.
- WEHLBURG, C. 1963. A bacterial spot of cabbage caused by *Pseudomonas cichorii*. *P. Fl. St. Hortic. Soc.*, 76: 119-122.
- WEHLBURG, C., SEYMOUR, C.P. and STALL, R.E. 1966. Leaf spot of *Araceae* caused by *Pseudomonas cichorii*. *P. Fl. St. Hortic. Soc.*, 79: 433-436.
- 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.

- WHITEHEAD, N. et al. 2002. The regulation of virulence in Phytopathogenic *Erwinia* species: quorum sensing, antibiotics and ecological considerations. *A. Van Leeuw. J. Microb.*, 81: 222-231.
- WICK, R.L. and SHRIER, R. 1990. Tomato pith necrosis caused by *Erwinia chrysanthemi*. *Plant Dis.*, 74: 615.
- WILKIE, J.P., DYE, D.W. and WATSON, D.R.W. 1973. Further host of *Pseudomonas viridiflava*. *New Zeal. J. Crop Hort.*, 16 : 315-323.
- WILKIE, J.P. and DYE, D.W. 1974. *Pseudomonas cichorii* causing tomato and celery disease in New Zealand. *New Zeal. J. Crop Hort.*, 17: 123-130.
- WONG, M.L. and MEDRANO, J.F. 2005. Real-Time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*, 39 (1): 75-85.
- WRIGHT, P.J. 1998. A soft rot of calla (*Zantedeschia* spp.) caused by *Erwinia carotovora* subspecies *carotovora*. *New Zeal. J. Crop Hort.*, 26: 331-334.
- WRIGHT, P.J., GRANT, D.G. and TRIGGS, C.M. 2001. Effects of onion (*Allium cepa*) plant maturity at harvest and method of topping on bulb quality and incidence of rots in storage. *New Zeal. J. Crop Hort.*, 29: 85-91.
- YAP, M.N., BARAK, J.D. and CHARKOWSKI, A.O. 2004. Genomic diversity of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* and its correlation with virulence. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70: 3013-3023.
- YAPRAK, F. 2009. bitki patojenleri *Pectobacterium carotovorum*, *Pectobacterium atrosepticum* ve *Erwinia amylovora*'da SpoT proteininin western blot yöntemi ile araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta, 59 s.
- YILDIZ, H.N. ve AYSAN, Y. 2002. Domates gövde nekrozu etmenlerinden *Pseudomonas viridiflava*'ya karşı çeşitli mikroorganizmaların antagonistik özelliklerinin saptanması. Türkiye 5. Biyolojik Mücadele Kongresi, ss. 437-442, 4-7 Eylül, Erzurum.
- YILDIZ, H.N., AYSAN, Y., SAHİN, F. and ÇINAR, O. 2004 Potential inoculum sources of tomato stem and pith necrosis caused by *Pseudomonas viridiflava* in the Eastern Mediterranean Region of Turkey. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 111 (4): 380-387.
- YING, F.X., HU, X.F. and CHEN, J.S. 2007. First report of soft rot caused by *Pectobacterium carotovorum* on *Pinellia ternata* in China. *Plant Dis.*, 91: 1359.
- YISHAY, M., BURDMAN, S., VALVERDE, A., LUZZATTO, T., OPHIR, R. and YEDIDIA, I. 2008. Differential pathogenicity and genetic diversity among *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* isolates from monocot and dicot hosts support early genomic divergence within this taxon. *Environ. Microbiol.*, 10 (10): 2746-2759.
- YOUNG, J.M., CHEESMUR, G.J., WELHAM, F.V. and HENSHALL, W.R. 1988. Bacterial blight of kiwifruit. *Ann. Appl. Biol.*, 112: 91-105.
- YOUNG, J.M., SADDLER, G.S., TAKIKAWA, Y., DE BOER, S.H., VAUTERIN, L., GARDAN, L., GVOZDYAK, R.I. and STEAD, D. 1996. Names of plant pathogenic bacteria 1864-1995. *Rev. Plant Pathol.*, 75: 721-863.
- XU, W.G. and GROSS, D.C. 1986. Field evaluation the among fluorescent *Pseudomonads*, *Erwinia carotovora* and potato yields. *Phytopathology*, 76: 423-430.

- XU, X., BAYSAL-GUREL, F. and MILLER, S.A. 2012. First report of Tomato Pith Necrosis caused by *Pseudomonas mediterranea* in the United States and *P. corrugata* in Ohio. *Plant Dis.*, 97 (7): 988.
- ZHOU, T. and PAULITZ, T.C. 1993. *In vitro* and *in vivo* effects of *Pseudomonas* spp. on *Pythium aphanidermatum*: zoospore behavior in exudates and on the rhizoplane of bacteria-treated cucumber roots. *Phytopathology*, 83: 872-876.
- ZUTRA, D. and KRITZMAN, G. 1983. New bacterial diseases in Israel. *Phytoparasitica*, 11: 3-4.



## ÖZGEÇMİŞ

### KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı : Derya BAKİ  
Doğum Yeri : Ankara  
Doğum Tarihi : 02.05.1987  
Medeni Hali : Evli

### EĞİTİM DURUMU

Lise : 2000-2003 Anamur Lisesi  
Lisans : 2006-2012 Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü  
Yüksek Lisans : 2012-(Devam Ediyor) Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Ana Bilim Dalı  
Yabancı Dil : İngilizce  
Stajı : İsrail Kibutz Programı

### ÖDÜLLER

Yüksek Onur Belgesi  
Ziraat Fakültesi ve Bitki Koruma Bölüm Birinciliği

### İLETİŞİM

E-posta Adresi : derya.baki@hotmail.com  
Tarih : 2014