

**ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI
2012-YL-002**

**AYDIN ve İZMİR İLLERİ BEZELYE ÜRETİM
ALANLARINDA GÖRÜLEN BAKTERİYEL
HASTALIKLARIN SAPTANMASI**

Duygu ERTAN

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Kemal BENLİOĞLU**

AYDIN

ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Bitki Koruma Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Duygu ERTAN tarafından hazırlanan Aydın ve İzmir İlleri Bezelye Üretim Alanlarında Görülen Bakteriyel Hastalıkların Saptanması başlıklı tez, 5.01.2012 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

	Ünvanı, Adı Soyadı	Kurumu	İmzası
Başkan:	Prof.Dr. Kemal BENLİOĞLU	ADÜ
Üye:	Prof.Dr. Hüseyin BASIM	AÜ
Üye:	Prof. Dr. Hatice ÖZAKTAN	EÜ

Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu Yüksek Lisans tezi, Enstitü Yönetim Kurulunun Sayılı kararıyla tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Cengiz ÖZARSLAN

Enstitü Müdürü

ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Bu tezde sunulan tüm bilgi ve sonuçların, bilimsel yöntemlerle yürütülen gerçek deney ve gözlemler çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce, sonuç ve bilgilere bilimsel etik kuralların gereği olarak eksiksiz şekilde uygun atıf yaptığımı ve kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

23/01/2012

Duygu ERTAN

ÖZET

AYDIN ve İZMİR İLLERİ BEZELYE ÜRETİM ALANLARINDA GÖRÜLEN BAKTERİYEL HASTALIKLARIN SAPTANMASI

Duygu ERTAN

Yüksek Lisans Tezi, Bitki Koruma Anabilim Dalı
Tez Danışmanı: Prof. Dr. Kemal BENLİOĞLU
2012, 89 sayfa

Bu çalışma, İzmir ilinin Torbalı, Tire, Ödemiş ilçelerindeki ve Aydın ilinin Nazilli, Çine, Buharkent ilçelerindeki bezelye ekiliş alanlarında bezelye bakteriyel hastalıkların varlığının belirlenmesi ve *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* (*Psp*) ırklarının saptanması amacıyla ele alınmıştır. 2009-2010 yıllarında İzmir ilinde 40, Aydın ilinde 15 tarladan gövde, yaprak ve kapsüllerinde suda haşlanma, kahverengileşme ve yelpaze şeklinde nekrotik lezyonlar gösteren bezelye bitki örnekleri toplanmıştır. Bakteriler King B (KB) besiyerine izolasyonu yapılarak, saflaştırılmış ve ileriki çalışmalarda kullanılmak üzere -80°C'de saklanmıştır. Toplam 47 bakteriyel izolat, KB besiyerinde floresans oluşumu, KOH ve LOPAT (levan oluşumu, oksidaz, patateste yumuşak çürüklük testi, arginin hidrolizi, tütünde aşırı duyarlılık reaksiyonu) testleri ile ön tanılaması yapılmıştır. Patojenisite testleri saksıda yetiştirilen Bolero ve Geneva, virülenslik testleri Kelvedon Wonder çeşidi bezelye bitkilerinde yapılmıştır. Tüm 47 izolat biyokimyasal, serolojik ve 16S rDNA sekans analizi ile tanılanmıştır. Ayrıca tüm *Psp* ırklarına karşı farklı duyarlılık gösteren 8 bezelye çeşidi ile ırklar belirlenmiştir. İzolatlar sadece bazı karbon kaynaklarını kullanımı (D-ksiloz, D-mannitol, D-maltoz, D-sorbitol, eritritol, trehaloz, L-tartarik asit ve laktik asit), jelatin sıvılaşması, eskulin hidrolizi, buz çekirdeklenme aktivitesi ve homoserin kullanımı açısından farklılık göstermiştir. Ticari poliklonal antiserum (Neogen, Europe, UK) ve tavşanda ısı uygulanmış *Psp*'e (Bz4 ve NCPPB-2585) karşı üretilen antiserum ile ELISA ve IFAS testleri uygulanmıştır. Sonuç olarak 46 izolat *Psp* olarak tanılanmıştır ve 3 ırkı (ırk 2, 4 ve 5) belirlenmiştir. Sürvey yapılan alanlarda ırk 2'nin yaygın olduğu tespit edilmiştir. Bir izolat ise *Pseudomonas viridiflava* olarak tanılanmıştır. Bu çalışmayla Türkiye'de bezelyelerde hastalığa neden olan *P. viridiflava* ve *Psp*'nin 3 ırkının varlığı ilk kez belirlenmiştir.

Anahtar Sözcükler: Bakteriyel yanıklık, *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*, *Pseudomonas viridiflava*, bezelye

ABSTRACT**DETERMINATION of BACTERIAL DISEASES on PEA GROWING AREAS of AYDIN and IZMIR PROVINCES**

Duygu ERTAN

M.Sc. Thesis, Department of Plant Protection

Supervisor: Prof. Dr. Kemal BENLİOĞLU

2012, 89 pages

The study has been conducted to investigate the presence of bacterial diseases of pea and to determine races of *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* (*Psp*) on the pea growing areas of Torbalı, Tire, Ödemiş counties in İzmir province and Nazilli, Çine, Buharkent counties in Aydın province. During 2009 and 2010, pea plant samples exhibiting water-soaked, browning and fan like necrotic lesions on stem, leaves and capsules were collected from 40 fields in İzmir and 15 fields in Aydın provinces. Bacteria were isolated on King's medium B (KB), purified and stored at -80°C for further identification. A total of 47 bacterial isolates were tested for presumptive diagnosis by using fluorescence on KB medium, KOH solubility and LOPAT (production of levan, oxidase, potato soft rot, arginine dihydrolase, hypersensitive reaction on tobacco) tests. Pathogenicity and virulence tests were performed in potted pea plants cv. Bolero, Geneva and Kelvedon Wonder, respectively. All 47 isolates were tested for further identification by using biochemical, serological and 16S rDNA sequence analysis. All *Psp* strains were also characterized based on differential pathogenicity on 8 pea cultivars. The isolates were only differentiated by utilization of some carbon sources (D-xylose, D-mannitol, D-maltose, D-sorbitol, erythritol, trehalose, L-tartaric acid and lactic acid), gelatin liquefaction, hydrolysis of aesculin, ice nucleation activity and homoserine utilization. ELISA and IFAS tests were applied by using commercial polyclonal antibody (Neogen Europe, UK) and rabbit antibody produced against heat-killed cells of *Psp* (strain Bz4 and NCPPB-2585). As a result, 46 isolates were identified as *Psp* and divided into three races (race 2, 4 and 5). Race 2 was found to be widespread in the survey area. One bacterial isolate was identified as *Pseudomonas viridiflava*. This is the first report of *P. viridiflava* causing a disease of pea, and the presence of three races of *Psp* in Turkey.

Key Words: Bacterial Blight, *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*, *Pseudomonas viridiflava*, pea

ÖNSÖZ

Bu çalışma; bezelye tarımının yaygın olarak yapıldığı İzmir ilinin Torbalı, Tire, Ödemiş ilçeleri ve Aydın ilinin Nazilli, Çine ve Buharkent ilçelerindeki bezelye ekim alanlarında bezelye bakteriyel hastalıklarının varlığının belirlenmesi amacıyla ele alınmıştır. Bu konuda yapmış olduğumuz ön çalışmalar sonrası Bezelye Bakteriyel Yanıklık hastalığı etmeni *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*'nin ülkemizdeki varlığı ilk defa tarafımızca belirlenmiştir (Benlioğlu vd., 2010). Bu çalışma ile toplanan hastalıklı bitki örneklerinden bakteriler izole edilerek patojenisite, biyokimyasal, serolojik ve 16S rDNA'a dayalı tekniklerle etmenlerin tanılanması ve *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* izolatlarının ırklarının belirlenmesi hedeflenmiştir.

Çalışmalarım boyunca her türlü yardımını esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Sayın Kemal BENLİOĞLU başta olmak üzere test çalışmamda pozitif kültür olarak *Pseudomonas viridiflava* izolatını verdiği için Dr. Sayın Nursen Üstün (Bornova Ziraî Mücadele Araştırma İstasyonu)'e, antiserum üretiminde yardımlarından dolayı Öğr. Gör. Sayın Birol BİRİNCİOĞLU (Adnan Menderes Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Zootečni Bölümü, Aydın)'a, tavşanlardan kan alımında yardımcı olan Yrd. Doç. Dr. Sayın Cengiz ÜNSAL (Adnan Menderes Üniversitesi, Veterinerlik Fakültesi, Veteriner Hekimliği Temel Bilimler Bölümü, Aydın)'a, elde edilen bakterilerin tanılanmasında kullanılan API ID 32 GN test kitlerinin okunmasında cihazlarını kullandırdıkları için Bornova Veterinerlik Kontrol Enstitüsüne (İzmir), arazi çalışmalarında her türlü yardımı gösteren Özgörkey Gıda Ürünleri Sanayi ve Ticaret. A.Ş. firmasına (İzmir) ve yardımını eksik etmeyen Dr. Sayın Ümit ÖZYILMAZ (Adnan Menderes Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Aydın)'a teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışma Adnan Menderes Üniversitesi Araştırma Projelerince ZRF-11037 nolu proje ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI	v
ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
ÖNSÖZ	xi
SİMGELER DİZİNİ	xv
ŞEKİLLER DİZİNİ	xvii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xxi
EKLER DİZİNİ	xxiii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	5
2.1. Bezelye Bakteriyel Yanıklık Hastalığı	5
2.2. Kahverengi Leke Hastalığı	10
2.3. Yaprak ve Gövde Yanıklığı Hastalığı	11
3. MATERYAL VE YÖNTEM	13
3.1. Materyal	13
3.2. Yöntem	14
3.2.1. Hastalıklı Bitki Örneklerinin Toplanması	14
3.2.2. İzolasyon ve Ön Tanılama	14
3.2.2.1. İzolasyon	14
3.2.2.2. Ön tanılama LOPAT testleri	15
3.2.3. Patojenisite Testleri	16
3.2.3.1. Bezelye bitkilerinde patojenisite testleri	16
3.2.3.2. Limon meyvelerinde patojenisite testi	19
3.2.4. Bakterilerin Tanılanması	19
3.2.4.1. Biyokimyasal testler	19
3.2.4.2. Serolojik testler	23
3.2.4.3. 16S rDNA baz dizileri analizi	28
3.2.5. <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>pisi</i> Irklarının Belirlenmesi	29
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	33
4.1. Hastalıklı Bitki Örneklerinin Toplanması	33

4.2. İzolasyon ve Ön Tanılama	39
4.3. Patojenisite Testleri	41
4.4. Biyokimyasal Testler.....	49
4. 5. Serolojik Testler	55
4.6. 16S rDNA Baz Dizileri Analizi.....	62
4.7. Irkların Belirlenmesi.....	63
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	68
KAYNAKLAR.....	79
EKLER... ..	87
ÖZGEÇMİŞ.....	89

SİMGELER DİZİNİ

°C	Derece Santigrad
As	Antiserum
bç	Baz çifti
BSA	Bovin Serum Albumin
C	Karbon
cm	Santimetre
da	Dekar
dNTP	Deoksi-Nükleozid Trifosfat
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EPPO	Avrupa ve Akdeniz Bitki Koruma Teşkilatı
FAO	Food and Agriculture Organisation
g	Nispi Santrifugal Kuvvet
ha	Hektar
IFAS	İndirekt Fluorescent Antibody Staining
IgG	İmmunoglobulin G
KB	King B
L	Litre
M	Molar
mg	Miligram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
N	Normalite
NA	Nutrient Agar
NCPPB	National Collection of Plant Pathogenic Bacteria
nm	Nanometre
OD	Optik Dansite
PBS	Phosphate Buffered Saline
PBST	Phosphate Buffered Saline, Tween 20
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
pH	Hidrojen İyonu Konsantrasyonu
ppm	Parts Per Million
rDNA	Ribozomal Deoksiribonükleik Asit
UV	Ultraviolet

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. Gövde inokulasyon yöntemi [(a) yaprağın gövde ile bağlandığı noktaya bakterinin inokule edilmesi, (b) enjektör ile inokulum üzerinden giriş yolunun açılması].....	18
Şekil 3.2. Değerlendirmede kullanılan 0-4 skalası.....	18
Şekil 3.3. (a) ID 32 GN şeritlerine bakterilerin inokule edilmesi ve (b) şeritlerin mini API cihazı ile okunması	22
Şekil 3.4. (a) Kullanılan Yeni Zelanda tipi tavşan, (b) antiserum için kan alımı, (c) kan alınımı sonrası santrifüj tüpünde antiserum	24
Şekil 3.5. Lamdaki kuyucukların antijenler ile kaplanması	27
Şekil 3.6. Bitki parçalarının ezilmesi (a) ve mikropleyitin örnek süspansiyonları ile kaplanmış hali (b)	28
Şekil 3.7. Tünel altındaki (a) Partridge ve (b) Early Onward bezelye çeşitlerinin tohum ekiminden 15 gün sonraki görünümü	30
Şekil 3.8. Kafes altında bitkilerin görünümü	31
Şekil 3.9. Kapsül bağlayan (a) Hurt's Greenshaft ve (b) Vinco çeşitlerine ait bezelye tohumları.....	31
Şekil 4.1. Torbalı'da Geneva çeşidi bezelye bitkisinde <i>Psp</i> 'nin oluşturduğu tipik yanıklık ve yelpaze şeklindeki belirtiler	34
Şekil 4.2. İzmir ili Torbalı, Tire ve Ödemiş ilçelerinde 31 örnekleme noktasından örnek alınan bezelye tarlaları.....	35
Şekil 4.3. Aydın ili Nazilli, Buharkent ve Çine ilçelerinde 15 örnekleme noktasından örnek alınan bezelye tarlaları.....	36
Şekil 4.4. Torbalı'da Bolero çeşidi bezelye bitkisinin yapraklarında yelpaze şeklindeki belirtiler	37
Şekil 4.5. Buharkent'te Utrillo çeşidi bezelye bitkisinin yapraklarında yelpaze benzeri belirtiler ve gövde ile saplarında suda haşlanma belirtileri.....	37

- Şekil 4.6. Torbalı ilçesinde 8.2.2010 tarihinde Bolero çeşidi ekili bir bezelye tarlasında soğuk ve Bakteriyel Yanıklık hastalığı nedeniyle bitkilerin yanmış gibi görüntüsü..... 38
- Şekil 4.7. Buharkent'te Utrillo çeşidi bezelye bitkisinin (a) gövdesinde (Bz20 izolatu) ve (b) yapraklarında (Bz19 izolatu) Bakteriyel Yanıklık belirtileri 40
- Şekil 4.8. Ödemiş'te (a) Carina çeşidi bezelye bitkisinin kapsüllerinde (Bz16/1 izolatu) ve Torbalı'da (b) Sienna çeşidi bezelye yapraklarında (Bz12/2 izolatu) Bakteriyel Yanıklık belirtileri 40
- Şekil 4.9. Geneva çeşidi bezelye bitkisinde (a) Bz18 ve (b) Bz13 izolatlarının yaprak ve gövde de oluşturduğu suda haşlanma belirtileri 41
- Şekil 4.10. (a) Bz9 ve (b) Bz2 izolatının inokulasyondan 14 gün sonra Bolero çeşidi bezelye bitkisinin gövde ve yapraklarında oluşturduğu belirtiler 42
- Şekil 4.11. Solda *Pss* (NCPPB-281) sağda *Psp* (NCPPB-2585) ile inokule edilen limon meyvelerinde belirti oluşumu [(a) pozitif, (b) negatif sonuç] 43
- Şekil 4.12. Kelvedon Wonder çeşidi bezelye bitkisinde patojenisite testleri süresince iklim odasında kaydedilen sıcaklık ve nem verileri 44
- Şekil 4.13. Kelvedon Wonder çeşidi bezelye bitkisinde bazı izolatların yaprak ve gövdede oluşturduğu belirtiler [(a) Bz4, (b) Bz32/2, (c) Bz31/1, (d) *Psp* (NCPPB-2585)]..... 45
- Şekil 4.14. Kelvedon Wonder çeşidi bezelye bitkisinde Bz7 ile inokulasyondan 14 gün sonra inokulasyon noktasında görülen bakteriyel akıntı 46
- Şekil 4.15. Kelvedon Wonder çeşidi bezelye bitkisinde Bz11 izolatının inokulasyondan 14 gün sonra tepe sürgüne kadar ilerleyerek çiçeği enfekte etmesi (solda) ve enfekteli çiçekten enfekteli kapsül oluşumu (26 gün sonra) (sağda) 46
- Şekil 4.16. Bz9 izolatu ile inokule edilen Kelvedon Wonder çeşidi bezelye bitkisinin inokulasyondan 14 gün sonra inokulasyon noktasının görünümü 47

- Şekil 4.17. Referans izolatlardan (a) *P. viridiflava* ve (b) *P.s. pv. syringae* Kelvedon Wonder çeşidi bezelye bitkisinin inokulasyon noktasında oluşturduğu nekrotik lezyonlar47
- Şekil 4.18. Bz15, Bz16/1 ve Bz16/2 nolu izolatlar dışında diğer izolatların (a) homoserin ve (b) D-sorbitol karbon kaynaklarını kullanımı53
- Şekil 4.19. İzolatların küme analizi ile sınıflandırılması54
- Şekil 4.20. İndirekt ELISA testinde farklı bakteri konsantrasyonlarının 6 farklı antiserum seyreltme serisine karşı reaksiyonlar55
- Şekil 4.21. Antiserumların 1/500 konsantrasyonunda (a) Bz5/1 ve (b) Bz8/1 bakterileri hücrelerinin floresan mikroskopta 100x objektif altında görünümü59
- Şekil 4.22. Ticari IF kiti ile yapılan IFAS testlerinde floresan mikroskobunda 100x objektif altında (a) Bz22 ve (b) Bz4 bakteri hücrelerinin görünümü.....60
- Şekil 4.23. PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezdeki görünümü [sütun: M, 5000 bç Marker (Fermentas); 1, Bz1; 2, Bz2; 3, Bz3; 4, Bz4; 5, Bz5/1; 6, Bz5/2; 7, Bz5/4; 8, Bz6/1; 9, Bz6/2; 10, Bz7; 11, Bz8/1; 12, Bz8/2; 13, Bz9; 14, Bz10/1; 15, Bz10/2; 16, Bz11; 17, Bz12/1; 18, Bz12/2; 19, Bz13; 20, Bz14/1; 20, Bz14/2; 21, Bz14/3; 22, Bz15; 23, Bz16/1; 24, Bz16/2]62
- Şekil 4.24. Irkların belirlenmesi çalışmalarında iklim odasında kaydedilen sıcaklık ve nem verileri63
- Şekil 4.25. Irk 2 olduğu belirlenen bazı izolatların 4 farklı bezelye çeşidi bitkisinin yaprak ve gövdede oluşturduğu belirtiler [(a) Kelvedon Wonder; Bz5/4, (b) Belinda; Bz10/2, (c) Hurt's Greenshaft; Bz18, (d) Partridge; Bz5/1]64
- Şekil 4.26. (a) Sleaford Triump çeşidinin inokulasyon noktasında Bz13'ün, (b) Fortune çeşidinin inokulasyon noktasında Bz14/2'nin oluşturduğu nekrotik lezyonlar64

Şekil 4.27 Irk 4 olduğu belirlenen Bz3 izolatının (a) Kelvedon Wonder, (b) Belinda, (c) Early Onward ve Bz17'nin Vinco bezelye çeşidi bitkilerinin yapraklarındaki belirtileri..... 65

Şekil 4.28. Bz25 ve Bz1'in sırasıyla (a) Kelvedon Wonder ve (b) Hurt's Greenshaft bezelye çeşidi bitkilerinde oluşturduğu belirtiler..... 66

Şekil 4.29. Bz1 izolatının Early Onward çeşidi bezelye bitkisinin inokulasyon noktasında oluşturduğu nekrotik alan 66

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. 2009 yılı Dünya taze ve kuru bezelye üretimi	2
Çizelge 1.2. 2010 yılı Aydın ve İzmir ilçelerindeki taze bezelye üretimi.....	3
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan referans bakteri izolatları ve orijinleri.....	13
Çizelge 3.2. Hastalığın değerlendirilmesinde kullanılan 0-4 skalası	18
Çizelge 3.3. ELISA testi için en uygun antijen ve antiserum konsantrasyonlarının belirlenmesinde kullanılan pleytin şematik görünümü	26
Çizelge 3.4. <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>pisi</i> ırklarının bezelye çeşitleri arasındaki ilişkileri.....	30
Çizelge 4.1. Bezelyede patojen izolatlar ve referans kültürlerle ait bilgiler.....	48
Çizelge 4.2. Bezelye izolatları ve referans kültürlerin biyokimyasal test sonuçları	51
Çizelge 4.3. Antiserum Bz4 ve 2585'in iki sulandırma serisinde yapılan ELISA testi OD=405 nm absorbans değerleri ve IFAS sonuçları	57
Çizelge 4.4. Ticari <i>Psp</i> poliklonal antiserum ile yapılan ELISA ve IFAS test sonuçları.....	61
Çizelge 4.5. İzolatların çeşitlerle olan reaksiyonları	67
Çizelge 5.1. Elde edilen <i>Psp</i> izolatlarının test sonuçları ile diğer araştırmacıların sonuçlarının karşılaştırılması	72
Çizelge 5.2. <i>Pseudomonas viridiflava</i> izolatının referans ve diğer araştırmacıların biyokimyasal test sonuçlarının karşılaştırılması	75

EKLER DİZİNİ

3.1. Etik kurul belgesi	87
-------------------------------	----

1. GİRİŞ

Fabaceae (Baklagiller) familyası içerisinde yer alan bezelye, karbonhidrat, protein ve çeşitli vitaminlerce zengin olması bakımından iyi bir bitkisel besin kaynağıdır (Şalk vd., 2008). Bezelye bitkisi taze ve kuru olarak insan beslenmesinde kullanıldığı gibi yeşil iç tanesinden konserve sanayisinde de geniş ölçüde yararlanılmaktadır. Ayrıca sap ve samanı da hayvan yemi olarak değerlendirilmektedir (Ekinci, 1972).

Genetik çeşitlilik dikkate alındığında Orta Asya, Yakın Doğu, Etiyopya ve Akdeniz havzası olmak üzere bezelyenin dört orijin merkezi olduğu bilinmektedir (Gritton, 1980).

Tek yıllık kültür bitkisi olan bezelyenin köklerinin büyük kısmı 10-15 cm'lik toprak derinliğinde toplanmıştır. Köklerin üzerinde nodüller bulunur. Nodüller, içerisinde simbiyotik bakteriler (*Rhizobium leguminosarum*) vardır ve bu bakteriler havanın serbest azotunu fiske etmekte ve toprağın azotça zenginleşmesini sağlamaktadır. Bitkinin gövdesi ince, dört köşeli, otsu yapılı ve içi boştur. Gövdesinin boş olması, hızlı gelişmesi ve hasadından sonra kalan bitki artıklarının C/N oranının düşük olması nedeniyle iyi bir yeşil gübre bitkisi olmasını sağlamaktadır. Gövde üzerinde boğumlar bulunur ve her boğumdan birer yaprak çıkar. Bezelye yaprakları bileşik yaprak şeklindedir. Yaprak ayası yaprakçıklara parçalanmış ve yaprak sapı üzerinde karşılıklı olarak dizilmiştir. Bileşik yaprak eksenini bir sülük ile son bulmaktadır. Çiçekler, yaprak koltuklarından çıkan çiçek sapı üzerinde meydana gelir. Bezelye kendine döllen bir sebzedir fakat doğada yabancı döllenme % 2-4 oranında meydana gelebilmektedir. Bezelye meyvesi tipik bir bakla meyvesidir. Meyve içindeki bezelye tohumları funiculus ile plasentaya bağlı olarak bulunur. Bezelye serin iklim sebzesidir, optimal sıcaklık isteği 15-20°C arasındadır. Bezelye tohumlarının çimlenmesi için en ideal toprak sıcaklığı 10-25°C'dir ve -5°C'e kadar dayanabilmektedir. Ülkemizde bezelye ekimi kasım ayından mayıs ayına kadar yapılabilmektedir. Ege ve Akdeniz sahil kuşağında kışlık olarak ekim, kasım veya aralık aylarında, Orta Anadolu ve geçit bölgelerde kış sonu ve erken ilkbaharda ekim yapılabilir. Toprak isteği olarak derin, geçirgen, su tutma kapasitesi iyi, hafif asidik (pH 5.5-6.7), tınlı topraklarda iyi gelişmektedir (Kaya ve Şanlı, 2005; Şalk vd., 2008).

Bezelye, dünyada fasulye ve nohuttan sonra en fazla ekilen, fasulyeden sonra en fazla üretilen, gerek dünyada gerekse ülkemizde birim alandan en fazla verim alınan yemeklik tane baklagil bitkisidir (Özdemir, 2002). Bezelye üretimi Avrupa ve Amerika ülkelerinde yoğunluk kazanmıştır (Akova, 2009). Dünyada taze bezelye üretimi 2009 yılı verilerine göre yaklaşık 16,000,000 ton ve Türkiye'deki üretim ise 95,046 tondur. Dünyada kuru bezelye üretimi 2009 yılı verilerine göre ise yaklaşık 10,500,000 ton ve Türkiye'deki üretim ise 3604 tondur. Dünya taze bezelye üretiminde 11. sırada yer alan Türkiye'nin ekim alanı 14,000 ha'dır, ülkemizdeki kuru bezelye ekim alanı ise 1224 ha'dır (Çizelge 1.1). FAO (Food and Agriculture Organisation) verileri incelendiğinde taze bezelye üretiminde ABD 11,4 ton/ha verim elde ederken bunu yaklaşık 11,3 ton/ha ile Kırgızistan izlemektedir. Ülkemizdeki verim ise yaklaşık olarak 7 ton/ha civarındadır (Anonim, 2011a)

Çizelge 1.1. 2009 yılı Dünya taze ve kuru bezelye üretimi (Anonim, 2011a)

Ülke	Taze Bezelye			Kuru Bezelye		
	Alan ha	Üretim x1000 ton	Verim ton/ha	Alan ha	Üretim x1000 ton	Verim ton/ha
Dünya	2,116,110	15,998	7,6	6,182,296	10,486	1,7
Çin	1,200,856	9,599	8,0	875,000	960	1,0
Hindistan	348,000	2,916	8,3	603,233	755	1,3
ABD	83,100	949	11,4	339,090	777	2,3
Türkiye	14,000	95	6,7	1,224	3,6	2,9

Ülkemizde 2010 yılı verilerine göre en fazla üretim sırasıyla Marmara, Akdeniz ve Ege Bölgelerinde gerçekleşmiştir. İl bazında baktığımızda ise Bursa, Hatay, Balıkesir, Adana ve İzmir illerinde en fazla taze bezelye üretimi yapılmaktadır (Anonim, 2011b). İzmir ili Türkiye taze bezelye üretiminin % 7.3'ünü ve Ege Bölgesi taze bezelye üretiminin de % 46'sını sağlamaktadır. Bu durumu Aydın ili için incelediğimizde Türkiye taze bezelye üretiminin % 2'sini, Ege Bölgesi taze bezelye üretiminin ise % 13'ünü sağlamaktadır. Aydın ve İzmir ilinde ilçeler düzeyinde taze bezelye üretimi Çizelge 1.2'de verilmiştir (Anonim, 2011b).

Çizelge 1.2. 2010 yılı Aydın ve İzmir ilçelerindeki taze bezelye üretimi (Anonim, 2011b)

İl	İlçe Adı	Üretim (ton)	İl	İlçe Adı	Üretim (ton)
Aydın	Nazilli	640	İzmir	Torbali	2.876
	Çine	420		Tire	1.200
	Buharkent	250		Ödemiş	840
	Kuyucak	200		Bayındır	720
	Didim	147		Menemen	350
	Merkez	72		Bergama	175
	Söke	65		Kemalpaşa	150
	Koçarlı	56		Diğer 9 ilçe	282

Aydın ilinde bezelye tarımı daha çok küçük aile işletmelerinde yapılmaktadır. İzmir ilinde konservecilik ve dondurulmuş gıda endüstrisinin yaygın olmasından dolayı bezelye tarımı yaygınlaşmıştır. Özellikle Torbalı ilçesinde bezelye tarımı, yüksek verim elde etmek amacıyla sulama, mekanizasyon, gübreleme ve ilaçlama programları gibi tüm tarımsal işlevlerin kullanıldığı entansif bir tarım şeklinde gerçekleştirilmektedir.

Üretimde verimi kısıtlayan en önemli sorunların başında bitki koruma problemleri gelmektedir. Diğer kültür bitkilerinde olduğu gibi yabancı otlar, zararlılar ve hastalıklar bezelye bitkisinde de kalite ve kantite kayıplarına neden olmaktadır. Bezelye bitkisinde sorun olan otuzdan fazla fungus türü ve yediden fazla viral etmen bulunmaktadır (Tonguç vd., 2009). Bezelye üretim alanlarında görülen en önemli bakteriyel hastalık, *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* (Sackett) Young, Dye ve Wilkie (*Psp*) (syn. *P. pisi* Sackett)'nin neden olduğu Bezelye Bakteriyel Yanıklık hastalığıdır. Etmen; gram negatif, aerobik, 0.7 x 2-3 µm boyutunda, çubuk şeklinde 1-5 polar kamçıya sahip bir bakteridir (Lawyer, 1984; Martin-Sanz vd., 2005). Besiyerinde grimsi beyaz renkte, çok fazla kabarıklık olmayan, parlak, saydam ve kenarları düz koloniler oluşturmaktadır. Bakteri 7-37.5°C arasında gelişim göstermektedir. Optimum gelişim sıcaklığı 26-28°C ve pH değeri 6.5-7.5'dir (Lawyer, 1984). Bir çok ırkı King B besiyerinde sarımsı yeşil pigment oluşturur, ultraviyole ışık altında ise mavi floresans vermektedir (Martin-Sanz vd., 2005).

Diğer önemli hastalık ise *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* van Hall (*Pss*)'nin neden olduğu Kahverengi Leke hastalığıdır (Lawyer, 1984). Etmen geniş bir konukçu dizisine sahip olup, gram negatif, aerobik, çubuk şeklinde, floresans pigment veren bir veya birden fazla polar kamçıya sahip bir bakteridir. Optimum gelişme sıcaklığı 24°C'dir (Lawyer, 1984).

Ayrıca bezelye bitkilerinde bakteriyel yanıklık belirtilerine *Pseudomonas viridiflava*'nın da neden olduğu belirtilmiştir (Martin-Sanz vd., 2010). Etmen bir çok kültür bitkisinde (fasulye, bezelye, domates, kabak vs.) yanıklık, çürüme ve yapraklarında lekelerle neden olan gram negatif, King B besiyerinde floresans veren pektolitik aktiviteye sahip bir bakteridir (Wilkie vd., 1973).

Bu çalışma bezelye tarımının yaygın olarak yapıldığı İzmir ilinin Torbalı, Tire, Ödemiş ilçeleri ve Aydın ilinin Nazilli, Çine ve Buharkent ilçelerindeki bezelye ekim alanlarında bezelye bakteriyel hastalıklarının varlığının belirlenmesi amacıyla ele alınmıştır. Bu konuda yapmış olduğumuz ön çalışmalar sonrası Bezelye Bakteriyel Yanıklık hastalığı etmeni *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*'nin ülkemizdeki varlığı ilk defa tarafımızca belirlenmiştir (Benlioğlu vd., 2010). Bu çalışma ile toplanan hastalıklı bitki örneklerinden bakteriler izole edilerek patojenisite, biyokimyasal, serolojik ve 16S rDNA'a dayalı tekniklerle bakteriyel etmenlerin tanılanması ve *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* izolatlarının ırklarının belirlenmesi hedeflenmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Bezelye Bakteriye Yanıklık Hastalığı

Bezelye Bakteriye Yanıklık hastalığı etmeni olan *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* (*Psp*) ABD'nin Kolorado eyaletinde 1915 yılında ilk kez W. G. Sackett tarafından rapor edilmiştir (Lawyer, 1984). Etmen ılıman iklime sahip ve yağışın bol olduğu yerlerde önemli verim kayıplarına neden olmaktadır.

Psp, bezelye tohumlarında toleransı sıfır olan bakteriye bir etmendir. Bu nedenle pek çok ülkenin karantina listesinde yer almaktadır. Hastalığın dünyada pek çok bezelye ekim alanlarında mevcut olduğu bilinmektedir. Hastalık Avrupa'da (Ermenistan, Bulgaristan, Hırvatistan, Çek Cumhuriyeti, Danimarka, Fransa, Gürcistan, Yunanistan, Macaristan, İtalya, Litvanya, Moldova, Hollanda, Romanya, Rusya, Sırbistan, Slovakya, Ukrayna, İngiltere), Asya'da (Hindistan, Endonezya, İsrail, Japonya, Kazakistan, Kırgızistan, Lübnan, Nepal, Pakistan, Suriye), Afrika'da (Kenya, Malavi, Kuzey Afrika, Güney Afrika, Tanzanya, Zimbabve), Amerika'da (Arjantin, Bermuda, Brezilya, Kanada, Kolombiya, Kosta Rika, Meksika, Amerika Birleşik Devletleri, Uruguay) ve Okyanusya'da (Avusturalya, Yeni Kaledonya, Yeni Zelanda) görülmektedir. Hastalığın en çok görüldüğü ülkeler ise Fransa, Kuzey Afrika, Kanada ve Yeni Zelanda'dır (EPPO, 2011). Hastalığın ülkemizdeki varlığı ilk defa 2010 yılında Söke, Torbalı ve Ödemiş ilçelerindeki bezelye üretim alanlarında yapılan sürveyler sonucunda belirlenmiş ve etmenin *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* olduğu bildirilmiştir (Benlioğlu vd., 2010).

Bakteriye Yanıklık hastalığı bezelye bitkisinin tüm toprak üstü aksamında görülmektedir. Hastalığın başlangıçtaki tipik belirtileri yaprak, kapsül ve gövde üzerinde belirgin, parlak ve suda haşlanmış şeklinde görülen lekelerdir. Patojen hücrelerarası boşluklarda gelişerek bitki hücrelerinin içeriklerinin dışarı çıkmasına neden olur sonuçta dokularda suyla doygunluk sonrası tipik suda haşlanmış lezyonlar meydana gelir. Daha sonra lezyonlar koyulaşarak nekrotik lekeler dönüşür. Yaprak ve yaprakçıklardaki belirtiler başlangıçta parlak ve suda haşlanmış gibidir ve daha sonra lekelerin olduğu alanlar kahverengiye döner. Nemli hava koşullarında yaprak damarları boyunca uzanan lekeler yelpaze şeklini almaktadır. Yaprakta meydana gelen lekeler birleşerek yaprağın incelmesine ve

kağıt gibi bir görünüm almasına neden olabilir. Patojen yaprakçıklardan bitişik sap ve diğer yapraklara doğru yayılır. Çanak yaprak enfeksiyonları çiçeklerin dökülmesine ve küçük kapsül oluşumuna neden olabilmektedir. Meyve kapsüllerinde de suda haşlanmış şekilde başlayan daha sonra güneş yanığı şeklinde koyu kahverengi dokuya batık lekeler oluşmaktadır. Kapsül enfeksiyonları sonrası tohumlar enfekte olurlar. Enfekteli tohumlarda renk değişimi ve tohumun hilum kısmında koyu lekeler görülebilmektedir (Lawyer, 1984; Steven vd., 2007).

Bakteriyel Yanıklık hastalığının en önemli inokulum kaynağı tohumdur. Tohumun yüzeyinde ve içinde yaklaşık 3 yıl kadar canlılığını sürdürebilmektedir (Reeves vd., 1996; Martin-Sanz vd., 2005). Bakterinin kotiledon ve embriyodan giriş yapamadığı ancak bulaşık tohum çimlenirken plumulanın bakteri ile bulaşması sonucu etmen bitkinin diğer kısımlarına yayılabilmektedir. Hastalıklı bitkilerde özellikle en alt üç boğumundaki yaprak sapının gövde ile bağlandığı noktada görülen suda haşlanmış şeklindeki belirtiler tipik tohum enfeksiyonlarının göstergesi olduğu belirtilmiştir (Lawyer, 1984). Patojen genel olarak tohumda kışlamakla birlikte bir yıl önce tarlada kalan bitki artıklarında da kışı geçirebildiği belirtilmiştir (Parry, 1990).

Bakteri stomalardan ve yaralardan giriş yapmaktadır. Soğuk ve yağışlı havalar hastalığın yayılmasında ve ürün kayıpları oluşturmasında önemli rol oynamaktadır. Şiddetli yağmur, kuvvetli rüzgarlar, dolu ve özellikle don gibi etmenler bitkilerde yara oluşturarak sekonder enfeksiyonlara neden olmaktadır (Steven vd., 2007). Toprak hastalığın yayılmasında önemli bir inokulum kaynağı değildir (Hollaway vd., 2007). Bakteriyel yanıklık patojeni bezelye bitkilerinin yüzeyinde çoğalmakta ve yağmur damlaları ile bitkiden bitkiye bulaşabilmektedir (Roberts, 1997). Grünwald vd. (2004) *Psp*'nin 60 çeşit bitki üzerinde epifitik olarak yaşayabildiğini belirtmişlerdir. Grondeau ve Samson (1997) yapmış oldukları çalışmada duyarlı bezelye çeşitlerinde etmenin epifitik olarak çoğaldığını, dayanıklı çeşitlerde ve konukçusu olmayan bitkilerde epifitik olarak çoğalmadığını ancak canlılığını sürdürebildiğini belirtmişlerdir. Yapılan çalışmalar *Pisum sativum* var. *arvense*, *Lathyrus odoratus* (kokulu bezelye), *Lathyrus latifolius* (mürdümük), *Vigna* spp. (börülce), *Dolichos lablab* (sümbül fasulye), *Vicia atropurpurea* (mor fiğ), *Vicia benghalensis*, *Vicia villosa* (tüylü fiğ), *Trifolium pratense* (üçgül) ve *Glycine max* (soya fasulyesi) patojenin önemli alternatif konukçuları olduğunu göstermiş, üçgül ve soya fasulyesinde ise *Psp*'nin 2 nolu ırkının patojen olduğu belirlenmiştir (Lawyer, 1984).

Taylor vd. (1989) *Psp*'nin yedi ırkının olduğunu ve ırkların bezelye çeşitleri ve bunlarda bulunan dayanıklılık genlerine göre ayrılabilmesini bildirmişlerdir. Dünyada en yaygın *Psp* ırkı 2'dir ve bunu sırasıyla ırk 6 ve ırk 4 izlemektedir (Martin-Sanz vd., 2005).

Bevan vd. (1995) sekiz farklı bezelye (*Pisum sativum*) çeşidi kullanarak *Psp*'nin 7 ırkının ayrımını yapmışlardır. *Psp* ırklarından 2, 3, ve 4'ün her biri farklı tek avirulent gen taşıdığı, ırk 6'nın avirulent gen taşımadığı, ırk 7'nin A2, A3 ve A4, ırk 1'in A1, A3, A4 ve muhtemelen A6, ırk 5' in A2, A4 yanısıra muhtemelen A5 ve A6 avirulent genlerini taşıdığı sonucuna varmışlardır.

Hollaway vd. (1997) bu yedi ırkın ayrımının DNA parmak izi yöntemi ile yapılabildiğini belirtmiştir.

Hildebrand (1972) *Psp*'nin tanımlanmasında homoserin kullanımının önemli bir kriter olduğunu bildirmiştir. Araştırmacı bezelyenin bol miktarda homoserin içerdiğini ve sadece *Psp*'nin bu derece yüksek homoserinden yararlanabildiğine değinmiş ve yüksek homoserin varlığının bezelyede *Psp* dışında birçok Pseudomonads cinsi patojenin enfeksiyonunu önleyebildiğini belirtmiştir.

Taylor (1972) bezelyelerden izole ettikleri 47 bakteri izolatının faj, serolojik testleri ve belirti tiplerine bakarak 36'sının *Psp* olduğunu saptamışlardır. Serolojik testlerde ısı uygulanmayan antijen ile üretilen antiserumdan % 26 çapraz reaksiyon alırken, ısı uygulananlar da % 12 çapraz reaksiyon verdiğini bildirmiştir. Araştırmacı ısı uygulamasının *Pss* ile çapraz reaksiyonu ortadan kaldırdığını ifade etmiştir. *Psp* tanılamalarında ısı ile öldürülmüş antijenlerle serolojik testlerin ve faj testlerinden yararlanabileceğini belirtmiştir.

Bashan ve Kenneth (1983) İsrail'de ilk kez Bezelyede Bakteriyel Yanıklık hastağını saptamışlardır. İki gerçek yapraklı dönemde bezelye fidelerinin yapraklarına bakteri süspansiyonunu sprey yöntemiyle inokule etmişler ve doğada bezelyelerde görülen belirtileri gözlemlemişlerdir. Yaptıkları laboratuvar çalışmalarında levan oluşumu, jelatin sıvılaşması, nitrattan nitrit oluşumu, amonyak oluşumu, katalaz ve proteaz aktivitesi, bakteriyel motilite, King B besiyerinde floresans oluşumu, sorbitol, sakkaroz,

mannitol, inositol, homoserin kullanımı pozitif; nişasta hidrolizi, H₂S veya indole oluşumu, oksidaz, arginin hidrolizi, 41°C'de gelişim, benzoate, sellobiyoz, trehaloz, L-tartarat, D-tartarat, D-arabinoz, L-laktat, L-valin, L-izolösin ve 2-ketoglukonat kullanımının negatif olduğunu bulmuşlardır. Ayrıca *Psp* izolatlarını domates ve biberde aşırı duyarlılık reaksiyonuna neden olduğunu belirtmişlerdir.

Samson ve Saunier (1987) *Pseudomonas syringae*'nin 12 patovarına karşı ürettikleri antiserum ile ilgili bakterileri testlemişler ve sonuç olarak bu bakterilerin 6 serogruba toplandığını (TAB, LAC, PHA, MOP, APT-PIS, PER-TOM-SAV) bildirmişlerdir. Bu çalışmaya göre; *P.s. pv. pisi*, *P.s. pv. aptata*, *P.s. pv. glycinea* bakterileri APT-PIS grubu içinde yer aldığı belirtilmiştir.

Grondeau vd. (1992) 2673 *Psp* izolatının somatik antijenlere (O) göre serogruplarını, biyokimyasal testlere göre de fenotipik gruplarını incelemişlerdir. Kelvedon Wonder bezelye çeşidi kullanılarak yapılan patojenisite denemelerinde; *Psp*'nin tüm izolatlarının suda haşlanmış belirtilere neden olduğunu, diğer *Pseudomonas*lar ile yapılan inokulasyonlar da ise ya reaksiyon vermediği ya da aşırı duyarlılık reaksiyonuna neden olduğunu bildirmişlerdir. Yapılan testlerde *Psp* izolatları düzenli bir fenotipik sonuç göstermemiş, farklı biyokimyasal testlerdeki sonuçları floresans oluşumu % 93 pozitif; eskulin % 86 negatif; dl-laktate % 85 negatif; homoserin % 75 pozitif; buz çekirdeği aktivitesi % 97 pozitif olarak bulunmuştur. Sonuç olarak *Psp* izolatlarının sekiz farklı fenotip özelliğe sahip olduğunu ve üç farklı serogrup (APT-PIS (% 88,5), HEL2 (% 11,4), RIB (% 0,1)) içerisinde toplandığını bildirmişlerdir.

Roberts (1992) tarafından *Psp*'nin neden olduğu Bakteriyel Yanıklık hastalığının tohumdan fideye taşınmasında toprak neminin etkisini saptamak amacıyla saksılarda yapılan denemelerde su stresi ve hastalığın yayılması arasındaki ilişkiyi araştırarak tarlada bakteriyel yanıklık enfeksiyonlarını tahmin etmeye çalışmıştır. Bu çalışma sonunda hastalığın tohumdan fideye taşınmasında toprak neminin önemli bir etken olduğu saptanmıştır.

Roberts (1993) serada saksı koşullarında Kelvedon Wonder ve Solara çeşidi bezelyelerde bitkilerin üreme, vejetatif ve her iki dönemde de olmak üzere Bakteriyel Yanıklık hastalığı etmeni ile bitkileri inokule etmişlerdir. Denemeler sonunda tohum veriminde sırasıyla % 24, 47 ve 71 azalma tespit etmişlerdir.

Roberts vd. (1996) *Psp*'nin tohumdan fideye taşınmasında, inokulasyon metodu, inokulum miktarı, sıcaklık ve toprak su potansiyelinin etkisini araştırmışlardır. Solara çeşidi bezelye tohumlarını farklı bakteri konsantrasyonları ile daldırma ve vakum infiltrasyonu ve de doğal enfekteli olmak üzere farklı yöntemlerle inokule ederek saksılara ekmişlerdir. Farklı sıcaklık ve toprak su potansiyellerinde hastalığın çıkışını araştırmışlardır. Araştırmacılar hastalığın çıkışında; ortalama bakteri sayısının ve toprak su kapasitesinin yapraktaki lezyon sayısı ile doğrudan ilişkili olduğunu fakat inokulasyon yönteminin etkisi olmadığı, ayrıca 5-18 °C aralığındaki sıcaklığın lezyon sayısı ve hastalığın çıkış oranında değişiklik oluşturmadığını saptamışlardır.

Mansfield vd. (1997) 1995 yılında kışlık bezelye çeşitlerini (Rafale, Frilene, Froidune) ve yazlık bezelye çeşitlerini (Baccara, Conquest, Bahatyr) kullanarak altı farklı ekim zamanında (ekim, kasım, aralık, mart ortası, mart sonu ve nisan) tarla denemeleri yapmışlardır. Denemelerde tüm parsellerde temmuz ortasında hastalığın % 100'e ulaştığı görülmüştür. Denemeler değerlendirildiğinde kışın ekilen (ekim, kasım, aralık) tüm bezelye çeşitlerinde yazın ekilenlere göre hastalık şiddetini ve hastalığın bulunma oranını önemli derecede farklı bulmuşlardır. Benzer şekilde bu oranlar kış ekimlerinde yazlık çeşitlerde kışlık olanlara göre daha yüksek bulunmuştur.

Suzuki vd. (2003) Japonya'da *Psp*'nin White Top (Beyaz Uç) adı verilen bitkilerde en uç yaprakların beyazlaşması şeklinde bir hastalığa neden olduğunu belirtmişlerdir. Beyaz uç belirtisi gösteren bezelye bitkilerinden alınan 34 bakteri izolatının Bezelye Bakteriyel Yanıklık etmeni 16 adet *Psp* izolatı ile birlikte karakterizasyonu ve tanılamasını yapmışlardır. Hastalığa neden olan bakterinin gram negatif, çubuk şeklinde ve 1-6 polar kamçıya sahip olduğu belirlenmiştir. LOPAT (Levan, Oksidaz, Patateste Yumuşak Çürüklük, Arginin dehidrolaz ve Tütünde Aşırı Duyarlılık) testi sonuçları + - - - +'dır. Bakteriyel izolatlar ile bezelye bitkilerine gövde batırma yöntemi ile yapılan inokulasyondan 14 gün sonra suda haşlanmış lekelerle birlikte beyaz uç belirtileri görülmüştür. Diğer 16 *Psp* izolatıyla yapılan inokulasyonlarda ise tipik yanıklık belirtileri görülmüştür. Fenotipik özellikler dikkate alındığında farklı beyaz uç izolatları ve diğer *Psp* izolatlarının grup A ve B olmak üzere 2 grup altında toplanmıştır. Tekrarlanan sekansa dayalı PCR analizleri her iki grubun varlığını doğrulamış olup Beyaz Uç hastalığına neden olan *Psp*'nin diğer *Psp* izolatlarından farklı olmadığını ancak belirti oluşumu açısından farklılık olduğu sonucuna varılmıştır.

Benlioğlu vd. (2010) Ege Bölgesinde bezelye üretim alanlarından (Söke, Torbalı ve Ödemiş) toplanan hastalıklı bitki örneklerinden izole edilen bakteriler, LOPAT, patojenisite, biyokimyasal ve 16S rDNA dayalı yöntemler kullanarak Bezelye Bakteriyel Yanıklık hastalık etmeninin varlığını saptamışlar ve hastalığın Türkiye’de varlığını rapor etmişlerdir. 2009 yılında yapılan sürveyelerde 13 bezelye tarlasında hastalığın varlığı saptanmış ve bulunma oranının % 45 olduğu bildirilmiştir.

2.2. Kahverengi Leke Hastalığı

Bezelyelerde görülen diğer bakteriyel hastalık, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (*Pss*)’nin neden olduğu özellikle sonbahar veya kışın ekilen bezelyelerde görülen Bezelye Kahverengi Leke hastalığıdır (Grünwald vd., 2004). Etmen bezelyelerde ilk kez ABD’nin Wisconsin eyaletinde 1966 yılında rapor edilmiştir (Hoitink vd., 1968).

Pss, tohum kaynaklı bir patojendir ve tohum yüzeyinde kolonize olabilmektedir (Hoitink vd., 1968). Patojen 8 aydan fazla saprofit olarak toprakta yaşamını devam ettirebilmektedir. Pek çok bitki yüzeyinde yaşamını sürdüren *Pss* özellikle fasulye ve soya fasulyesinin önemli patojenlerden birisidir. *Psp* sadece bezelyede hastalık oluştururken *Pss* hem bezelye hem de fasulyede patojendir (Grünwald vd., 2004).

Kontrollü sera koşullarında *Pss* ile inokulyondan 3-5 gün sonra yaprak, yaprak sapı ve gövde de *Psp*’nin tipik suda haşlanmış belirtilerine benzer belirtiler meydana gelmektedir. Birkaç gün sonra Kahverengi Leke hastalığı etmeninin oluşturduğu suda haşlanmış belirtiler kaybolmakta ve lekeler fiziksel yaralanmaya benzeyen açık kahverengi bir nekroza dönüşmektedir. Gövde üzerindeki lezyonlar batık ve uzunlamasınadır ayrıca gövde, yaprak sapı ve büyüme noktalarında şiddetli biçim bozukluğuna neden olabilmektedir. Gövdedeki kahverengi leke lezyonları yukarıya doğru ilerlemekte ve ksilem borusuna doğru ilerleme göstermektedir. Aynı dönemde *Psp*’nin neden olduğu lezyonların rengi koyu ve suda haşlanmış görünümündedir fakat gövde dokularına ulaşmamıştır. Yapraklar kuruyarak, dökülür ve nemli koşullar sağlanamadığında hastalık ilerleyememektedir. İnokulasyondan 5-8 gün sonra bile *Psp*’nin neden olduğu enfeksiyon bölgeleri genişlemeye devam etmektedir. Yüksek nem koşulları kaybolduğunda hastalık daha fazla ilerleyememektedir. Tarla koşullarında ise sera koşullarındaki gibi genç bezelye bitkilerinin yapraklarında yanmış belirtiler ve geniş, nekrotik gövde lezyonları görülmektedir. Hastalıklı bitkilerden her iki

etmeni ayırt etmek mümkün olmadığı ancak laboratuarda yapılan testlerle birbirinden ayırt edilmesi mümkündür (Lawyer, 1984).

Jindal ve Pathania (1997) tarafından Kahverengi Leke hastalığının taşınmasında toprak neminin önemli bir role sahip olduğunu belirtmişlerdir. % 30 toprak neminde patojenin tohumdan fideye taşınmasının maksimum (% 39,22 hastalıklı fide), % 10 toprak neminde ise hastalığın taşınmasının minimum (% 3,68 hastalıklı fide) etkili olduğunu saptamışlardır.

Mazarei ve Kerr (1990) *Pss* ile *Psp*'i ayırt etmek için duyarlı bezelye çeşitleri (Rovar ve Blue-Prussian) ile gövde inokulasyon testinin güvenilir bir yöntem olduğunu belirtmişlerdir. Elde edilen sonuçları limon meyvelerine inokulasyon testi ile doğrulamışlardır. Bu iki bakterinin daha hızlı ve kolay ayırt edilebilmesi için bir serolojik yöntem geliştirmişlerdir. Gluteraldehit ile fikse edilen hücrelere karşı antiserumlar, Ouchterlony jel difüzyon testinde ve heterolog antijenler ile absorpsiyondan sonra indirekt ELISA yönteminde yüksek seviyede spesiflik elde etmişler ve *Psp* antiserumu kullanılarak bu patojenler ile enfekteli bezelye tohumlarında etmenin saptanabileceğini belirtmişlerdir.

2.3. Yaprak ve Gövde Yanıklığı Hastalığı

Pseudomonas viridiflava (*Pv*)'nin bezelyelerde neden olduğu bakteriyel hastalık Watson ve Dye tarafından Yeni Zelanda'da 1971 yılında ilk kez bildirilmiştir (Wilkie vd., 1973). Hastalık genellikle sonbahar ve erken ilkbahar dönemindeki ürünlerin yaprak, stipule ve gövdelerinde meydana gelmektedir. Bezelye bitkisinde suda haşlanmış belirtiler hızla gelişmekte ve yumuşak kahverengi lezyonlara dönüşmektedir. Hastalığın don ve yağmur zararıyla ilişkili olduğu bilinmektedir (Wilkie vd., 1973).

Pv, birçok bitkide hastalık oluşturabilmektedir ve epifitik olarak bulunabilmektedir. Jones vd. (1984)'in bildirdiğine göre; Billing, bakterinin bir zayıflık paraziti olduğu veya başka bir patojenin girişini takip ederek sekonder olarak saldırdığını belirtmiştir. Diğer birçok araştırmacı ise yaralı veya stress altındaki bitkilere saldırdığından fırsatçı bir patojen olarak tanımlamışlardır. Bezelyelerde *P. fluorescens* ve *P. viridiflava* bitki içinde endofitik olarak kolonize olabilmektedir (Elvira-Recuenco ve van Vuurde, 2000).

Elvira-Recuenco ve van Vuurde (2000) Kanada’da bezelye yetiştirilen alanlardaki saptaki endofitik bakterilerin doğal bulunma sıklığı araştırmışlardır. Çiçeklenme dönemindeki 11 bezelye kültüründeki endofitik bakterilerin varlığını göstermek için yüzeyi dezenfekte edilmiş saplardan % 5 Trypticase Soy Agar (TSA) besiyerine ekim yapılmış ve 5 bezelye kültüründe kolonizasyon görülmüştür. En sık *Pantoea agglomerans* ve *Pseudomonas fluorescens*, az sıklıkta ise *Pseudomonas viridiflava* ve *Bacillus megaterium* izole etmişlerdir.

Martin-Sanz vd. (2010) 2004-2006 yılları arasında İspanya’da yapılan bir araştırma sonucunda bezelyelerde Bakteriyel Yanıklık hastalığına *Pseudomonas viridiflava*’nın neden olduğu ilk kez rapor etmişlerdir. Yaptıkları çalışma sonucunda hastalıklı bitkilerden gram negatif King B besiyerinde floresans veren, sarımsı mukoid koloniler oluşturan 30 adet bakteriyel izolat elde etmişlerdir. Tüm izolatlar levan pozitif, Hugh-Leifson ortamında oksidatif glukoz metabolizması göstermiş ayrıca oksidaz negatif, patatestte yumuşak çürüklük pozitif, arginin dehidroliz negatif ve tütünde aşırı duyarlılık reaksiyonu pozitif olarak bulunmuştur. Bu sonuçların *Pss* ve *Psp*’den farklı olduğunu belirtmişlerdir. Testlenen tüm izolatlar karbon kaynağı olarak gliserol, eritritol, L-arabinoz, riboz, D-ksiloz, galaktoz, D-glukoz, D-fruktoz, D-mannoz, inositol, mannitol, sorbitol, D-raffinoz, D-fukoz ve D-arabitol’u kullanmışlardır. Yapılan patojenisite testi sonucunda 30 izolattan 9’unun bezelye bitkilerinde patojen olduğu bulunmuştur.

Türkiye’de farklı kültür bitkilerinde *Pv*’nin neden olduğu hastalıklar araştırılmıştır. Üstün (2000) *Pv*’nin Ege Bölgesi domates ekim alanlarında, Aysan vd. (2004) Akdeniz Bölgesinde domateslerde Gövde Öz Nekrozu hastalığına neden olduğunu bildirmişlerdir. Aysan vd. (2003) *Pv*’nin kavunlarda Bakteriyel Leke ve Nekroz hastalığına neden olduğunu ilk kez ülkemizde rapor etmişlerdir. *Pv*’nin bezelye bitkilerinde hastalık oluşturduğu yönünde ülkemizde herhangi bir kayıt bulunmamaktadır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Çalışmada, Aydın ve İzmir ili bezelye alanlarından elde edilen hastalıklı bitki örnekleri, patojenisite çalışmalarında kullanılan Geneva, Bolero, Kelvedon Wonder, *P. syringae* pv. *pisi* ırklarının belirlenmesinde ise John Innes Centre (İngiltere) ve van Waveren (Almanya) tohum firmalarından temin edilerek doğada çoğaltılan Kelvedon Wonder, Early Onward, Berlinda, Hurt's Greenshaft, Partridge, Sleaford Triumph, Vinco ve Fortune bezelye çeşitlerine ait tohumlar bitkisel materyali oluşturmuştur. Ayrıca tütünde aşırı duyarlılık testlerinde White Burley çeşidi tütün bitkileri ve limon testlerinde İnterdonat limon çeşidinden yararlanılmıştır. Hastalıklı bezelye örneklerinden izole edilen 47 adet bakteriyel izolat, çalışma boyunca pozitif ve negatif kontrol amacıyla kullanılan orijinleri bilinen (referans) bakteri izolatları (Çizelge 3.1) ve antiserum üretimi için iki adet bir yaşlı Yeni Zelanda tipi tavşan çalışmanın canlı materyalini oluşturmuştur.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan referans bakteri izolatları ve orijinleri

Bakteri türü	Orijin
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>pisi</i>	NCPPB-2585
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	NCPPB-281
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>	NCPPB-52
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>morsprunorum</i>	NCPPB-2995
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>maculicola</i>	NCPPB-2039
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lachrymans</i>	NCPPB-277
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	Pt D*
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>mori</i>	NCPPB-1034
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>glycinea</i>	NCPPB-2895
<i>Pseudomonas viridiflava</i>	Pv3 Dr. Nursen Üstün
<i>Pseudomonas putida</i>	6k4 Dr. Ümit Özyılmaz
<i>Pseudomonas corrugata</i>	NCPPB-2445
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	6B2* Dr. Ümit Özyılmaz
<i>Xanthomonas vesicatoria</i>	NCPPB-422
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	Cmm-9*
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i>	Ecc-133*
<i>Erwinia amylovora</i>	NCPPB-595
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	At7*

* Prof. Dr. Kemal Benlioğlu ADÜ Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü stokları
NCPPB National Collection of Plant Pathogenic Bacteria, İngiltere

3.2. Yöntem

3.2.1. Hastalıklı Bitki Örneklerinin Toplanması

2009 yılının Nisan ayında İzmir ilinin Torbalı ilçesindeki 9 bezelye üretim alanlarından alınan hastalıklı bitki örnekleri ile ön çalışma yapılmıştır. Bunu takiben Aydın ve İzmir illerindeki en fazla bezelye üretimi yapılan alanlardan 2010 yılı Şubat, Mart ve Nisan ayları boyunca hastalıklı bitki örnekleri toplanmıştır. İzmir ilinin Torbalı, Tire ve Ödemiş ilçelerinde 31, Aydın ilinin Nazilli, Çine ve Buharkent ilçelerinde ise 15 bezelye üretim alanı gezilmiştir.

Bezelye bitkilerinin gövde, kapsül ve yapraklarında suda haşlanmış görünüm, kahverengi nekroz ve yapraklarda yelpaze benzeri belirtiler gösteren hastalıklı bitkiler toplanmıştır. Alınan örnekler ayrı ayrı polietilen torbalara konmuş ve üretim alanına ait bilgiler (Örnek No, tarih, çeşit, ekim tarihi, mevki ve koordinatlar) yazılarak etiketlenmiştir. Toplanan örnekler buz kutusu içerisinde ADÜ Bitki Koruma Bölümüne ait Fitopatoloji laboratuvarına getirilmiş ve +4°C'de muhafaza edilerek 24 saat içerisinde izolasyon çalışmalarına başlanmıştır.

3.2.2. İzolasyon ve Ön Tanılama

3.2.2.1. İzolasyon

Laboratuara getirilen suda haşlanmış, kahverengileşmiş ve yelpaze şeklinde nekroz oluşumu gösteren hastalıklı bitki örneklerinin gövde, sap, yaprak ve kapsüllerinden izolasyonlar yapılmıştır. Örnek bitkilerin hem hastalıklı hem de sağlıklı dokularını içerecek şekilde 3-4 cm uzunluğunda parçalar alınarak % 1'lik sodyum hipoklorit (NaClO) çözeltisinde 3 dakika bekletilerek yüzey dezenfeksiyonu yapılmıştır. Daha sonra steril damıtık su ile durulanmış ve steril kurutma kağıtları ile kurulanmıştır. Steril porselen havan ile gövde ve yaprak parçaları 0.3-0.5 ml steril damıtık su içerisinde iyice ezerek süspansiyonlar hazırlanmıştır. Hazırlanan süspansiyonlardan bir öze dolusu alınarak 100 ppm cycloheximide içeren King B (King vd., 1954) besiyerine (*Pseudomonas* agar F (Merck) çizgi ekim yapılmıştır. İnokule edilen besiyerleri 24°C'de 24-48 saat inkübe edilmiştir. King B (KB) besiyerinde gelişen farklı koloni morfolojisine sahip bakteriler tekrar KB besiyerine ekimi yapılarak, saflaştırılmıştır.

3.2.2.2. Ön tanılama LOPAT testleri

Saf kültürler önce KB besiyerinde UV ışık (366 nm) altında floresans pigment oluşturup oluşturmadığına bakılmış daha sonra % 3'lük potasyum hidroksit testi (Fahy ve Hayward, 1983) ve LOPAT (levan, oksidaz, patates yumuşak çürüklük, arginin hidrolizi ve tütünde aşırı duyarlılık) testleri uygulanmıştır (Lelliott vd., 1966). LOPAT testi "+ - - - +" olarak değerlendirilen kültürlerin *Psp* veya *Pss*; "- - + - +" olarak değerlendirilenlerin ise *P. viridiflava* olabileceği dikkate alınarak patojenisite ve daha ileri düzeyde tanılanmak üzere % 15 gliserol içeren Nutrient Broth (Difco) besiyeri içinde -80°C'de derin dondurucuda saklanmıştır.

Levan oluşumu: Bakteri kültürleri Nutrient Sakkaroz Agar (NSA) (Nutrien agar + % 5 sakkaroz) besiyerine öze ile çizgi ekim yapılmış ve 24°C'de 24-48 saat inkube edilmiştir. Besiyerinde beyaz, kubbeli, mukoid koloniler oluşturan bakteriler levan pozitif olarak değerlendirilmiştir (Lelliott vd., 1966).

Oksidaz testi: Kovacs (1956) metodu kullanılmıştır. 24 saatlik Nutrient Agar (NA) besiyerindeki kültürden bakteriler platin öze ile alınmış ve filtre kağıdı üzerine yaydırılmıştır. Kurutma kağıdındaki bakteri kitlesi üzerine % 1'lik tetra methyl-p-phenylendiamine dihydrochloride süspansiyonundan 50 µl damlatılmıştır. Kültürün renginin 10 saniye içerisinde maviye dönmesi pozitif, 15-60 saniye içerisinde maviye dönmesi geç pozitif, 60 saniye içerisinde değişmemesi ise negatif olarak değerlendirilmiştir.

Patates yumuşak çürüklük testi: Patatesler iyice yıkanarak, kabukları soyulmuştur. Patateslerden 7-8 mm kalınlığında dilimler kesilerek, % 70'lik etil alkole daldırılıp alevden geçirilerek yüzey dezenfeksiyonu yapılmıştır. Petrilere petri çapına uygun steril kurutma kağıdı yerleştirilip, steril damıtık su ile nemlendirilmiştir. Her bir dilim bir petriye yerleştirilerek dilimlerin ortasına V şeklinde uzunlamasına yarık açılmıştır. NA besiyerinde geliştirilen 24 saatlik kültürlerden bir öze dolusu alınıp, oyuk kısma sürülmüştür. 24 saat inkübe edildikten sonra inokulasyon noktasında yumuşama var ise sonuç pozitif olarak değerlendirilmiştir (De Boer ve Kelman, 2001).

Arginin hidrolizi: Thornley (1960)'da belirtilen yöntemle göre 2A besiyerinden (L(+)) arginin hidroklorit 10 g, NaCl 5 g, peptone 1 g, K₂HPO₄ 0.3 g, fenol kırmızısı 0.01 g, agar 3 g, damıtık su 1000 ml, pH 7.2) 3 ml içeren tüpler

kullanılmıştır. 24 saatlik NA kültürleri ile tüplere batırma inokulasyon yapılarak besiyerlerinin yüzeyine 1 ml steril mineral yağ ilave edilmiştir. 27°C’de 24-48 saat inkubasyon sonrasında amonyak oluşumu meydana geldiyse renk kırmızıya dönmüş ve sonuç pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Tütünde aşırı duyarlılık testi: Bunun için 24 saatlik NA kültürlerinden 10^8 hücre/ml (McFarland 1) yoğunluğunda bakteri süspansiyonları hazırlanmıştır. İklim odasında yetiştirilen White Burley çeşidi tütün bitkisinin yapraklarının damar aralarına ince uçlu (26 gauge) bir insulin enjektörü yardımıyla bakteri süspansiyonu inokule edilmiştir. 24-48 saat içerisinde inokulasyon noktasında derimsi, açık kahverengi nekroz belirtisi pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Klement, 1963).

3.2.3. Patojenisite Testleri

Ön tanılama testleri (LOPAT) sonrası seçilen bakteri izolatları iki haftalık Geneva, Bolero ve Kelvedon Wonder çeşidi bezelye bitkilerinde gövde inokulasyon yöntemiyle patojenisite testleri yapılmıştır. Ayrıca *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* ve *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* izolatlarının ayrımı için olgunlaşmamış yeşil limon meyvelerinde patojenisite testi yapılmıştır.

3.2.3.1. Bezelye bitkilerinde patojenisite testleri

Çalışma Adnan Menderes Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü iklim odasında 22-25°C sıcaklık, % 40-61 nispi nem ve 16 saat aydınlık 8 saat karanlık ışıklanma periyodunda tesadüf parselleri deneme desenine göre üç tekerrürlü olarak yürütülmüştür. Sıcaklık ve nem verileri iklim odasında bulunan sıcaklık ve nem kaydedici tarafından kaydedilmiştir. Patojenisite testleri öncelikle Geneva ve Bolero bezelye çeşitlerinde daha sonrada izolatların virülensini belirlemek üzere Bezelye Bakteriyel Yanıklık hastalığa duyarlı olduğu bilinen Kelvedon Wonder (Bevan vd., 1995) bezelye çeşidinde yapılmıştır.

Bezelye tohumları steril toprak, kum, torf, perlit (2:1:2:1) karışımı içeren plastik bardaklara (200 ml) ekilmiş ve iki haftalık olduğu dönemde gövde inokulasyon yöntemi ile inokule edilmiştir (Mazarei ve Kerr, 1990). Ekim öncesi bitki gelişimini sağlamak amacıyla her bardağa daha önceden geliştirilen *Rhizobium*

leguminosarum bakterisi süspansiyonu (her bardağa 6 ml olacak şekilde) ilave edilmiştir.

R. leguminosarum bakterisi İzmir ilinin Torbalı ilçesindeki bir bezelye üretim alanındaki Carina çeşidi bezelye bitkisinin köklerindeki nodüllerden izole edilmiş ve 16S rDNA sekans analizi tanımlanmıştır. Bakteriler Elkan ve Bunn (1992) tarafından belirtilen Yeast Extract Mannitol (mannitol 10 g, K₂HPO₄ 0.5 g, MgSO₄.7H₂O 0.8 g, NaCl 0.2 g, FeCl₃.6H₂O 0.01 g, yeast extract 1 g, 1000 ml damıtık su, pH 6.8) sıvı besi ortamına ekilmiş ve 28°C'de 72 saat çalkalama kültürü olarak geliştirilmiştir. Sıvı besi ortamı 4°C'de 10.000 g'de 3 dakika santrifüj edilmiştir. Supernatant kısmı dökülmüş ve pellet fizyolojik serum (% 0.85'lik NaCl) ile karıştırılarak bakterisi süspansiyonu hazırlanmıştır. Bakterisi süspansiyonu spektrofotometrede OD₆₂₀=2 olacak şekilde ayarlanmıştır.

Bitkiler her gün düzenli olarak kontrol edilmiş ve ekimden on gün sonra başlayarak deneme boyunca 3-4 günde bir ticari Haisol K (N14-P13-K13+ iz elementler, İsrail) ile gübrelenmiştir.

Ekimden iki hafta sonra bezelye bitkilerinin kotiledon yapraklarının üstündeki ikinci ve üçüncü boğumdaki yaprakçığın gövde ile bağlandığı noktaya KB besiyerinde geliştirilen 24 saatlik kültürlerden hazırlanan 10⁸ hücre/ml (Mc Farland 1) yoğunluğunda bakterisi süspansiyonlarından mikropipet yardımıyla 10 µl damlatılmıştır. Daha sonra ince uçlu (26 gauge) bir insülin enjektörü ile damlanın içinden geçecek şekilde gövde delinerek inokulasyon yapılmıştır (Şekil 3.1). Kontrol bitkileri de aynı yöntemle steril damıtık su ile inokule edilmiştir. Bitkilerin üzeri nemlendirilmiş polietilen torba ile kapatılmış ve 24 saat sonra torbalar çıkarılmıştır. İnokulasyondan sonra 4. günden itibaren bitkilerdeki belirti oluşumu incelenmiş ve inokulasyondan iki hafta sonra değerlendirme yapılmıştır. Değerlendirmeler Geneva ve Bolero çeşidi bitkilerde inokulasyon noktasından itibaren gövde ve yapraklara kadar uzanan suda haşlanmış belirtiyeye neden olan izolatlar patojen olarak değerlendirilmiştir. İzolatların hastalık oluşturma yeteneğini belirlemek için Kelvedon Wonder çeşidi bitkilerde yapılan değerlendirmeler Çizelge 3.2'de belirtilen bu çalışmada oluşturulmuş 0-4 skalasına göre yapılmıştır (Şekil 3.2). Patojenisite denemelerinde karşılaştırma amacıyla *Psp* (NCPPB-2585), *Pss* (NCPPB-281) ve *Pseudomonas viridiflava* (*Pv3*) referans kültürleri kullanılmıştır.



Şekil 3.1. Gövde inokulasyon yöntemi [(a) yaprağın gövde ile bağlandığı noktaya bakterinin inokule edilmesi, (b) enjektör ile inokulum üzerinden giriş yolunun açılması]

Çizelge 3.2. Hastalığın değerlendirilmesinde kullanılan 0-4 skalası

Skala değeri	Belirti şekli
0	Hiç belirti yok, sağlıklı bitki
1	Gövdede inokulasyon noktasında suda haşlanmış belirtiler
2	Gövdede suda haşlanmış belirti ve bitkide yaprakların %0-25'sinde kuruma
3	Gövdede suda haşlanmış belirti ve bitkide yaprakların %25-50'sinde kuruma
4	Gövdede suda haşlanmış belirti ve bitkide yaprakların >% 50'sinde kuruma



Şekil 3.2. Değerlendirmede kullanılan 0-4 skalası

3.2.3.2. Limon meyvelerinde patojenisite testi

Bu test için Interdonat çeşidi olgunlaşmamış, yeşil limon meyveleri kullanılmıştır. Meyvelerin yüzeyi % 70'lik etil alkol ile dezenfekte edilmiştir. KB besiyerinde $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de geliştirilen 24 saatlik kültürlerden 10^8 hücre/ml (Mc Farland 1) konsantrasyonunda bakteri süspansiyonları hazırlanmıştır. Meyvelerin üzerine 5 µl bakteri süspansiyonu damlattıktan sonra ince uçlu (26 gauge) iğne ile damlanın içinden geçecek şekilde batırılarak inokulasyon yapılmıştır. Ağız kapaklı bir kutunun tabanı steril kurutma kağıdı ile kaplandıktan sonra steril damıtık su ile nemlendirerek meyveler yerleştirilmiştir. Kutular $20\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 7 gün iklim odasında inkubasyona bırakılmıştır. İnokulasyondan 7 gün sonra limon meyvelerinin üzerinde derin nekrotik çukurların oluşması *Pss* olarak kaydedilmiştir (Mazarei ve Kerr, 1990). Bu çalışmada kontrol amacıyla *Pss* (NCPFB-281), *Psp* (NCPFB-2585) izolatlarının bakteri süspansiyonları ve steril damıtık su kullanılmıştır.

3.2.4. Bakterilerin Tanınması

Bakterilerin tanınmasında fenotipik özellikler açısından biyokimyasal testler, serolojik testler (ELISA ve IFAS) ve moleküler testlerden (16S rDNA sekans analizi) yararlanılmıştır.

3.2.4.1. Biyokimyasal testler

Elde edilen tüm izolatlara glikozdan asit oluşumu, jelatin sıvılaşması, eskulin hidrolizi, sakkarozdan indirgenmiş maddeler oluşumu, nitrat redüksiyonu, buz çekirdeklenme aktivitesi ve karbon kaynaklarından yararlanma testleri uygulanmıştır. Tüm biyokimyasal testlerde pozitif ve negatif kontrol olarak daha önce belirtilen referans kültürler kullanılmıştır. Tüm izolatlar ve referans *Psp*, *Pss* ve *Pv* kültürlerine ait LOPAT ve izolatlar arasında farklı sonuç alınan biyokimyasal testlerin sonuçları JMP 5.0.1 programı kullanılarak küme analizi ile sınıflandırılmıştır.

Glikozdan asit oluşumu: Hugh ve Leifson O-F (Oksitatif-Fermentatif) testi için içeriği; Peptone 1 g, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 1 g, KCl 0,2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, bromothymol blue 0.03 g, agar 3 g ve 1000 ml damıtık su, pH 7.2 olan besiyeri kullanılmıştır. 4'er ml besiyeri bulunan tüpler otoklav edildikten sonra 50°C 'e kadar soğutup son konsantrasyon % 1 olacak şekilde steril fitreden geçirilen glikoz solüsyonu

eklenmiştir. Bu amaçla testlenen her izolat için iki tüp hazırlanmıştır. 24 saatlik NA kültürleri ile besiyerlerine batırma inokulasyonu yapılmıştır. Anaerobik koşul oluşturmak için her izolat için hazırlanan tüplerden birine 1 cm kalınlığında steril mineral yağ dökülmüştür. İnokule edilen tüpler $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de inkube edilerek inokulasyondan 2, 4, 6, 21 ve 28 gün sonra tüplerdeki sarı renk oluşumu pozitif olarak değerlendirilmiştir (Bradbury, 1970).

Jelatin sınılaşması: Dye (1968) tarafından belirtilen içeriği 120 g jelatin, 1000 ml damıtık su ve pH 7.0 olan besiyerinden 3'er ml içeren tüpler kullanılmıştır. 24 saatlik NA kültürleri ile besiyerine batırma inokulasyon yapılmıştır. 20°C 'de inkube edilen tüpler 7 ve 14. günlerde önce $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 30 dakika bekletilip daha sonra tüplerde sınılaşma var ise pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Eskulin hidrolizi: Bu test için, 10 g peptone, 1 g eskulin, 0.5 g ferrik sitrat, 12 g agar, 1000 ml damıtık su ve pH 6.8 olan besiyeri hazırlanmıştır. 5'er ml besiyeri içeren tüpler eğik olarak dondurulduktan sonra çizgi ekim yapılmıştır. 24°C 'de 3-4 gün inkubasyon sonrasında besiyerinin kararması ve UV ışık (366 nm) altında floresans oluşturmaması pozitif sonuç olarak kaydedilmiştir (Lelliott ve Stead, 1987).

Sakkarozdan indirgenmiş maddeler oluşumu: Dye (1968) tarafından belirtilen besiyeri (10 g peptone, 5 g beef extract, 40 g sakkaroz, 1000 ml damıtık su) içeren tüplerde yapılmıştır. Tüpler 24 saatlik NA kültürleri ile inokule edilmiş ve 27°C 'de 2 gün boyunca çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. Daha sonra her tüpe 5'er ml Benedict ayracı ilave edilmiş ve tüpler kaynar su içerisinde 10 dakika tutulmuştur. Tüpler içerisinde sarımsı-turuncu renk oluşumu pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Benedict ayracı: Solüsyon A: 173 g sodyum sitrat, 100 g Na_2CO_3 600 ml damıtık su içerisinde ısıtılarak eritilmiştir ve eritildikten sonra hacim 850 ml'e tamamlanmıştır. Solüsyon B: 18 g CuSO_4 , 100 ml damıtık su içerisinde eritilmiş ve hacim 150 ml'e tamamlanarak yavaşça solüsyon A içerisine karıştırılmıştır (Fahy ve Hayward, 1983).

Nitrat redüksiyon testi: Bu amaçla içinde 10 g peptone, 5 g K_2HPO_4 , 1 g yeast extract, 1 g KNO_3 , 2 g agar, 1000 ml damıtık su ve pH 7.2 besiyeri bulunan cam tüpler kullanılmıştır. Tüpler 24 saatlik NA kültürleri ile inokule edilmiş ve

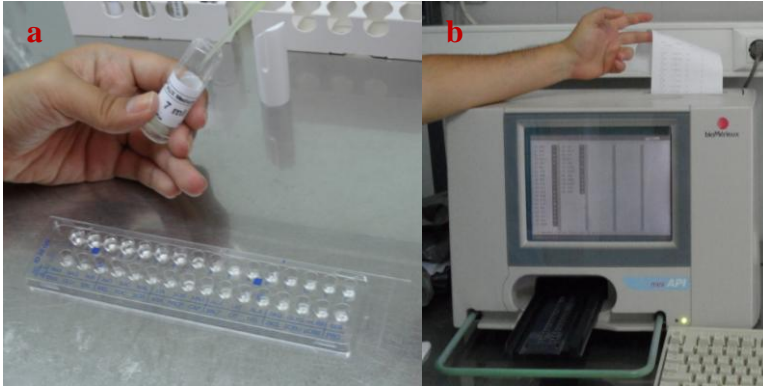
26°C’de inkube edilmiştir. Hidroksilamine varlığını belirtmek için kültürün üzerine 500 µl Gram iyot solüsyonu koyulmuştur. Daha sonra nitrat ayracı olarak 500 µl A solüsyonu (5 N CH₃COOH içerisinde % 0.8 sülfanilik asit) ve 500 µl B solüsyonu (5 N CH₃COOH içerisinde % 0.6 dimethyl- α -naphthylamine) ilave edilmiştir. Tüplerde nitratın indirgendiğini gösteren kırmızı renk oluşumu pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir. Birkaç dakika içerisinde kırmızı renk oluşmazsa spatula ucuyla çok az miktarda çinko tozu ilave edilmiştir. Tüplerde renk değişimi negatif olarak, rengin değişmemesi ise pozitif olarak değerlendirilmiştir (Bradbury, 1970).

Buz çekirdeği aktivitesi: Bu çalışmada geliştirmiş olduğumuz aşağıdaki yönteme göre yapılmıştır. Bunun için öncelikle KB besiyerinde geliştirilen 24 saatlik referans kültürlerden McFarland 2 (6.10^8 hücre/ml)’e göre oda sıcaklığındaki damıtık su içerisinde bakteri süspansiyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan bakteri süspansiyonlarından 100 µl alınarak 200 µl’lik PCR pleytlerine dağıtılmıştır. PCR pleytleri içinde metanol bulunan ve -9°C’de tutulan kaplar içerisine konmuş ve 2 dakika sonra süspansiyonların donup donmadığı gözlemlenmiştir.

Karbon kaynaklarından yararlanma: Karbon kaynaklarından yararlanmada iki yöntem kullanılmıştır. Betain, D-galaktoz, D-ksiloz, D-maltoz, D-mannitol, D-sorbitol, eritritol, gliserol, homoserin, inositol, laktik asit, L(+) askorbik asit, L-tartarik asit, malonik asit, süksinik asit, trehaloz ve α -metil glukozit kullanımlarının belirlenmesi amacıyla Cintas vd. (2002) tarafından belirtilen standart mineral temel agar besiyeri (Na₂HPO₄.H₂O 4.5 g, KH₂PO₄ 4.5 g, NH₄Cl 1.0 g, MgSO₄.7H₂O 0.5 g, % 5 ferrik amonyum sitrat 1 ml, % 0.5 CaCl₂ solüsyonu 1 ml, Noble agar 16 g, damıtık su 1000 ml) kullanılmıştır. Organik asitler (L-tartarik asit, manolik asit, askorbik asit, laktik asit ve süksinik asit) ortamın pH değerini değiştireceği için besiyerinin son pH değeri 7.2 olacak şekilde ayarlanmıştır. Otoklav edilen besiyerleri 50°C’e kadar soğutulmuş ve filtre ile sterilize edilmiş karbon kaynaklarının son konsantrasyonu % 0.3 olacak şekilde besiyerine ilave edilmiştir. Petri kaplarının altına 1 cm çaplı birbirinden 1 cm uzaklıkta 14 adet daire çizilmiştir. KB besiyerinde geliştirilen 24 saatlik kültürlerden 10^8 hücre/ml konsantrasyonunda bakteri süspansiyonları hazırlanmıştır. Petriye çizilen her daireye farklı bakteri süspansiyonlarından 5 µl inokule edilmiştir. Bu denemeler iki tekerrürlü olarak yürütülmüştür. Besiyerleri 24±1°C’de inkube edilmiş ve 3, 7 ve 14. günlerde bakterilerin gelişip gelişmediği kontrol edilmiştir.

Ayrıca karbon kaynaklarından yaralanma testi için API ID 32 GN (BioMérieux, Fransa) test kitinden yararlanılmıştır. Bu test kiti ile L-rhamnose, N-acetylglucosamine, D-riboz, inositol, D-sakkaroz, D-maltoz, itakonik asit, suberik asit, sodyum malonate, sodyum asetat, laktik asit, L-alanin, potasyum 5-ketogluconate, glycogen, 3-hydroxybenzoic asit, L-serine, D-mannitol, D-glukoz, salisin, D-melibiyoz, L-fukoz, D-sorbitol, L-arabinoz, propionik asit, kaprik asit, valerik asit, trisodyum sitrat, L-histidine, potasyum 2-ketogluconate, 3-hydroxybutyric asit, 4-hydroxybenzoic asit, L-proline olmak üzere 32 adet karbon kaynağı test edilmiştir. BioMérieux firmasınınca önerilen yöntem kullanılmıştır. 24 saat süren inkubasyon sonrasında nemlendirilmiş kutularda ID 32GN şeritleri Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsüne götürülmüştür. Okuma ve değerlendirme enstitüdeki mini API cihazı ile otomatik olarak yapılmıştır.

Şekil 3.3'de bakteri ile inokule edilen API ortamların ID 32GN şeritlerine dağıtılmasını ve inokule edilen şeritlerin mini API cihazı ile okutulması görülmektedir.



Şekil 3.3. (a) ID 32 GN şeritlerine bakterilerin inokule edilmesi ve (b) şeritlerin mini API cihazı ile okunması

3.2.4.2. Serolojik testler

Serolojik testlerde kendi üretmiş olduğumuz antiserum ve *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*'e özgü ticari (NEOGEN) poliklonal antiserum kullanılmıştır. Bu amaçla indirekt ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay = Enzime Bağlı Bağışıklık Testi) ve IFAS (İndirekt Fluorescent Antibody Staining = İndirekt Floresan Antikor Boyama) testlerinden yararlanılmıştır.

Antiserum üretimi: Antiserum üretimi için bilinen *Psp* (NCPPB-2585) izolatu ve Türkiye'den izole edilen Bz4 nolu (Benlioğlu vd., 2010) *Psp* izolatu kullanılmıştır. Isı ile öldürülmüş bakteriyel antijenler kullanılarak iki adet bir yaşlı Yeni Zelanda tipi tavşanda (Şekil 3.4a) antiserum hazırlanmıştır (Mazarei ve Kerr, 1990). Lucas ve Grogan (1969)'ın belirttiği sıvı besiyerinde (dekstroz 10 g, Difco casamino asit 6 g, KH_2PO_4 2 g, K_2HPO_4 1 g, damıtık su 1000 ml) kültürler 24°C 'de 48 saat çalkalayıcıda geliştirilmiştir. Sıvı besi ortamları 4°C 'de 10.000 g'de 3 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant kısmı dökülmüştür. Pellet 0.01 M potasyum fosfat tamponu (PBS; Na_2HPO_4 1.15 g, KH_2PO_4 0.2 g, KCl 0.2 g, NaCl 8 g, damıtık su 1000 ml, pH 7.4) ile süspanse edilerek 4°C 'de 10.000 g'de 3 dakika santrifüj edilerek 3 kez yıkama yapılmıştır. Yıkamalardan sonra pellet tekrar PBS ile karıştırılarak bakteri süspanسیونları hazırlanmıştır. Süspanسیونlar spektrofotometrede $\text{OD}_{620}=1$ olacak şekilde ayarlanmıştır. Daha sonra 121°C 'de 20 dakika otoklav edilerek antijenler hazırlanmıştır. Enjeksiyon öncesi tavşanlardan kan alınarak preimmun serum lam aglütinasyon yöntemi kullanılarak orijinal antijen ile reaksiyon verip vermediği kontrol edilmiştir. Enjeksiyonlar aşağıdaki şekilde yapılmış (Mazarei ve Kerr, 1990) ve kan alma öncesi antiserum titresi lam aglütinasyon ile saptanmıştır .

- Enjeksiyon (02.12.2010) deri altına 0.5 ml (0.5 ml antijen + 0.5 ml incomplete Freund's adjuvant)
- Enjeksiyon (09.12.2010) deri altına 0.5 ml (0.5 ml antijen + 0.5 ml incomplete Freund's adjuvant)
- Enjeksiyon (06.01.2011) kas arasına 1 ml (0.75 ml antijen + 0.75 ml incomplete Freund's adjuvant)
- Enjeksiyon (24.02.2011) kas arasına 0.5 ml (0.5 ml antijen + 0.5 ml incomplete Freund's adjuvant)
- Titre için 1 ml kan alınarak 1/10, 1/50 ve 1/100 oranlarında PBS ile seyreltilerek lam aglütinasyon testi yapılmıştır.
- Enjeksiyon (04.03.2011) kas arasına 0.5 ml (0.5 ml antijen + 0.5 ml incomplete Freund's adjuvant)



Şekil 3.4. (a) Kullanılan Yeni Zelanda tipi tavşan, (b) antiserum için kan alımı, (c) kan alınımı sonrası santrifüj tüpünde antiserum

Son enjeksiyondan 3 gün sonra ADÜ Veteriner Fakültesinde tavşanlardan kan alınmıştır (Şekil 3.4b). Alınan kanlar steril falkon tüplerine konularak ADÜ Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Fitopatoloji Laboratuvarına getirilmiştir. Tüpler 37°C'de 1 saat etüvde bekletildikten sonra +4°C'de gece boyu bekletilmiştir. Tüpler 4°C'de 2000 g'de 10 dakika santrifüj edilerek serum elde edilmiştir (Şekil 3.4c). Antiserum % 0.01 thiomersal ile karıştırılmış ve +4°C'de muhafaza edilmiştir.

Hayvan deneyleri için ADÜ Etik Kurulundan 9 Nisan 2010 tarih ve B.30.2.ADÜ.0.00.00.00/050.04/2010/47 sayılı etik kurul onay belgesi alınmış ve çalışmalar boyunca etik kurallara bağlı kalınarak denemeler yürütülmüştür (Ek 3.1).

Serumun saflaştırılması IgG elde edilmesi: Üretilen antiserumlardan immunoglobulin G (IgG) eldesi için amonyum sülfat çöktürme yönteminden yararlanılmıştır (Ball vd., 1990). Her antiserumdan 5 ml alınarak, 5 ml damıtık su ve 6.5 ml doymuş amonyum sülfat ile 30 dakika boyunca karıştırılmış ve +4°C'de gece boyu bekletilmiştir. Daha sonra +4°C'de 8000 g'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısmı dökülüp pellet üzerine 1 ml PBS, 1 ml damıtık su ve 1.02 ml doymuş amonyum sülfat ilave edilmiş, iyice karıştırıldıktan sonra +4°C'de 15 dakika bekletilmiştir. Tekrar 4°C'de 8000 g'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve pellet 2.5 ml PBS'de çözülmüştür. Daha sonra PBS içerisinde +4°C'de diyaliz tüpleri (Sigma) kullanılarak gece boyu diyaliz edilmiştir. Saflaştırılan antiserumlar 0.20 µm'lik membran filtreden geçirilerek % 0.01 olacak şekilde thiomersal ilave edilip +4°C'de saklanmıştır.

İndirekt ELISA: ELISA testlerinde Benlioğlu ve Özakman (1993)'da belirtilen protokole göre yapılmıştır. Bunun için 96 kuyuluk tabanlı düz ELISA pleytleri (Corning Costar) kullanılmıştır. Kuyular 100 µl PBS içinde süspanse edilmiş antijen ile kaplanmış, +4°C'de gece boyu inkube edilmiştir. Daha sonra kuyulara 100'er µl blokaj amacı ile % 2'lik sığır serumu ilave edilmiş ve 37°C'de 1 saat inkubasyon sonrası kuyular üç kez % 0.05 oranında Tween 20 içeren içme suyu (Damla) ile yıkanmıştır. Daha sonra kuyulara PBS ile sulandırılmış 100 µl antiserum ilave edilmiş, 37°C'de 2 saat inkubasyon sonrası benzer şekilde 3 kez yıkanmıştır. Kuyulara PBS ile 1/30.000 oranında seyreltilmiş alkaline phosphatase bağlı Antirabbit IgG serumundan (Sigma A-3687) kuyucuklara 100'er µl konmuş ve 37°C'de 1 saat inkube edilmiştir. Kuyular 3 kez daha önce belirtildiği şekilde yıkanmıştır. Enzim aktivasyonu için her kuyuya % 0.5 oranında p-nitrophenyl phosphate içeren diethanolamine substrat tamponundan (%0.1 MgCl₂, % 0.02 NaN₃, pH 9.8) 100'er µl ilave edildikten sonra 30, 45 ve 60. dakikalarda ELISA plate okuyucusunda (Organon Technica) 405 nm'de sarı renk intensitesi ölçülmüştür.

Testlenecek bakteriyel izolatların ELISA antiserum titresini belirlemek amacıyla her antiserum için kendisine karşı üretilen homolog antijenlerden (As-2585 için, *Psp* NCPPB 2585; As-Bz4 için Bz4) bakteri süspanسیونları seyreltme serileri (10⁸ hücre/ml başlangıç olmak üzere 1/5, 1/10, 1/25, 1/50, 1/100, 1/250, 1/500, 1/1000, 1/2500 ve 1/5000) hazırlanarak pleytler kaplanmış. Yukarıda belirtilen ELISA protokolü takip edilmiş ve her homolog antijen için antiserum seyreltmeleri (1/50, 1/100, 1/250, 1/500, 1/1000, 1/2500 ve 1/5000) kullanılmıştır (Çizelge 3.3). Bu denemeler 3 tekerrürlü olarak yürütülmüştür.

Her antiserum ve homolog antijen için en uygun çalışma konsantrasyonu belirlendikten sonra yine yukarıda anlatılan protokole göre bezelyelerden izole edilen 47 izolat ve 17 farklı bakteri türüne ait izolatların PBS içinde sulandırılan bakteri solüsyonları doğrudan ve otoklav edilerek her farklı antijen uygulaması için ayrı ayrı olmak üzere 3 tekerrürlü olarak ELISA testleri yapılmıştır. Ölçümler substrat tamponu ilave edildikten 45 dakika sonra yapılmış ve sonuçlar PBS ile kaplanan (antijen içermeyen) kuyulardaki absorbans değerlerinin 3.5 katı pozitif sonuç (Rowhani vd., 1994) olacak şekilde değerlendirilmiştir.

Çizelge 3.3. ELISA testi için en uygun antijen ve antiserum konsantrasyonlarının belirlenmesinde kullanılan pleytin şematik görünümü

Antijen→ Antiserum↓		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
		PBS	1/5000	1/2500	1/1000	1/500	1/250	1/100	1/50	1/25	1/10	1/5	1/1
A	1/50	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
B	1/100	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
C	1/250	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
D	1/500	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
E	1/1000	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
F	1/2500	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
G	1/5000	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
H													

İndirekt floresan antikor boyama (IFAS): IFAS testi Benlioğlu ve Özakman (1993)'da belirtilen protokole göre teflon kaplı pencereci lamalar (Şekil 3.5) kullanılarak yürütülmüştür. Öncelikle ELISA testlerinde olduğu gibi en uygun antijen ve antiserum çalışma konsantrasyonunu bulmak için antiserum (As-2585, As-Bz4) ve antijenleri (*Psp* NCPPB 2585, Bz4) için seyreltme serileri hazırlanarak IFAS testleri yürütülmüştür. Bu amaçla bakteri süspansiyonları 10^8 hücre/ml yoğunluğunda hazırlanıp 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} ve 10^{-4} oranlarında antiserumlar ise 1/100, 1/250, 1/500, 1/1000, 1/2500 ve 1/5000 oranlarında seyreltilmiştir. Her antiserum seyreltmesi için farklı lam kullanılarak testler iki tekerrürlü olarak yapılmıştır. Pencereci lamalarda her kuyuya 20 µl bakteri süspansiyonu konmuş, lamalar 50°C'de kurutulduktan sonra aseton içinde 10 dakika tutularak bakteriler lama sabitlenmiştir. Hazırlanan antiserum seyreltmelerinden 20 µl kuyucuklara dağıtılmış ve 37°C'de 1 saat nemli kutular içerisinde inkübe edilmiştir. Lamalar steril damıtık su ile yıkanmış ve 50°C'de kurutulmuştur. Daha sonra her kuyuya floresan isothiocyante bağlı Antirabbit IgG (Sigma F-0382) serumu 1/28 oranında PBS ile seyreltilerek kuyucuklara 20 µl damlatılmıştır. Lamalar nemli hücrede 37°C'de 1 saat inkübe edilerek steril damıtık su ile yıkanmıştır. Daha sonra her kuyucuk üzerine IFAS gliserol tamponu (18 ml gliserol, 2 ml PBS + 10 mg p-phenylenediamine) damlatılarak üzerine lamel kapatılıp floresan mikroskopunda (Olympus BHS-50), HBO 50 UV ışık altında uygun filtre seti kullanılarak 100x objektif altında değerlendirilmiştir.



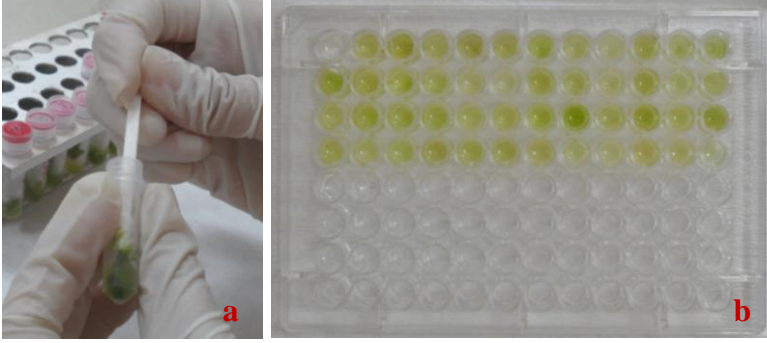
Şekil 3.5. Lamdaki kuyucukların antijenler ile kaplanması

NEOGEN firmasına ait kitler kullanılarak ELISA ve IF testlerin kullanılması

İndirekt ELISA: ADGEN firmasına ait ELISA test kiti (ADGEN 1088-25) kullanılarak elde edilen 47 izolat, referans izolatlar (17 izolat) ve kit içerisinde çıkan pozitif kontrol poliklonal *Psp* antiserumu ile 2 tekerrürlü olacak şekilde testlenmiştir. ELISA pleytleri (Corning Costar) her kuyuya 100 μ l 5.10^6 hücre/ml yoğunluğunda bakteri süspansiyonu ile kaplanmış ve pleytler $+4^{\circ}\text{C}$ 'de gece boyu inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası üç kez PBST (0,5 ml Tween 20, 1000 ml PBS) ile yıkanmıştır. Blokaj için 200 μ l % 2'lik sığır serumu ile kuyucuklar kaplanmış ve 37°C 'de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. Üç kez PBST ile yıkanan mikropleytlere 100 μ l 1/8000 oranında seyreltme tamponu (0,2 g Bovine serum albumin, 100 ml PBST) ile sulandırılmış poliklonal *Psp* antiserumu ile kaplanmıştır. 37°C 'de 2 saat inkübe edildikten sonra üç kez PBST ile yıkanmıştır. Daha sonra kuyucuklar konjugat tampon (0,2 g Bovine serum albumin, 100 ml PBST) içerisinde 1/4000 oranında seyreltilen alkalin fosfataz bağlı antirabbit IgG serumu ile kuyucuklar (100'er μ l) kaplanarak 37°C 'de inkübe edilmiştir. Her kuyuya 100 μ l substrat tampon içerisinde eritilen p-nitrophenyl-phosphate (Sigma) ilave edilmiş ve 45 dakika sonra ELISA plate okuyucusunda (Organon Technica) 405 nm'de sarı renk intensitesi ölçülmüştür. Ölçülen değerler PBS ile kaplanan (antijen içermeyen) kuyulardaki absorban değerlerinin 3.5 katı pozitif sonuç olacak şekilde değerlendirilmiştir.

Kelvedon Wonder çeşidi bezelye bitkisinde patojenisite testinden sonra bitkilerden yaklaşık 1-1,5 cm hastalıklı bitki parçacıkları alınarak -20°C 'e kaldırılmıştır. Bu bitki parçacıkları Neogen firmasına ait indirekt ELISA kiti ile testlenmiştir. Örnekler 2 ml'lik ependorf tüplerde 500 μ l coating buffer (Na_2CO_3 1.59 g,

NaHCO₃ 2.93 g, damıtık su 1000 ml) içerisinde plastik havan eli ile (mikropestle, eppendorf) ezilmiştir. Pleytler 2 tekerrürlü olarak 100 µl örnek süspansiyonları ile kaplanmıştır (Şekil 3.6). Bundan sonraki işlemler yukarıda belirtildiği gibi yapılarak sonuçlar değerlendirilmiştir.



Şekil 3.6. Bitki parçalarının ezilmesi (a) ve mikropleyitin örnek süspansiyonları ile kaplanmış hali (b)

IFAS: Neogen firmasına ait *P.s. pv. pisi*'e özgü IFAS kiti (ADGEN1088-16) kullanılarak referans izolatlar, elde edilen 47 izolat ve kit içerisinde çıkan pozitif kontrol firma tarafından belirtilen yöntem kullanılarak IFAS testi 2 tekerrürlü olacak şekilde uygulanmış ve daha önce belirtildiği şekilde değerlendirilmiştir.

3.2.4.3. 16S rDNA baz dizileri analizi

rDNA baz dizileri analizi için ön tanılama, patojenisite testleri, biyokimyasal karakterizasyon ve serolojik testler sonunda elde edilen 47 bezelye izolatın ve bezelye bitkileri nodüllerinden izole edilerek çalışmalarda kullanılan *Rhizobium* bakterisinin tanımlarının doğrulanması amacıyla 24 saatlik nutrient broth kültürlerinden DNA ekstraksiyonu yapılmıştır.

DNA ekstraksiyonu: Bakteriyel genomik DNA eldesi için Benlioğlu vd. (1998) tarafından belirtilen yöntem kullanılmıştır. 1 ml bakteri süspansiyonları (ortalama OD₆₂₀=0,230) içeren eppendorf tüpler 10.000 g'de 5 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatantlar dökülmüştür. Pelletler üzerine 200 µl T₁₀E₁ (Tris-Cl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0) tamponu ile tekrar süspansiyon edilmiş ve 10.000 g'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Pellet üzerine 200 µl lizis tamponu (0.01 M Tris-Cl (pH 8.0),

25 mM EDTA (pH 8.0), % 1.25 SDS) ilave edilmiştir. Pellet çözdürüldükten sonra 37°C'de gece boyu inkübe edilmiştir. Daha sonra hücre içeriği ve proteinler 100 µl 7.5 M amonyum asetat ile çöktürülmüş ve tüpler 14.800 g'de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatantlar steril yeni eppendorf tüplere aktarılarak üzerine 300 µl isopropanol ilave edilmiş ve -20°C'de 1 saat tutulmuştur. 14.800 g'de 25 dakika santrifüj edildikten sonra pelletlerin 600 µl % 70'lik etanol ile yıkanmıştır. Tüpler steril filtre kağıtları üzerinde ters çevrilerek 30 dakika kurumaya bırakılmıştır. DNA 50 µl MQ suda çözünerek -20°C'e stoklanmıştır.

16S rDNA'nın PCR amplifikasyonu: 16S rDNA genlerini polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çoğaltmak amacıyla 27f (Weisburg vd., 1991) ve Univ-1390R (Zheng vd., 1996) primerleri kullanılmıştır. Her izolat için 40 µl PCR karışımı (10 x PCR tamponu 4 µl, MgCl₂ 2.4 µl, dNTP (herbirinden 10 mM) 0.8 µl, Primer 27f/1390R 0.4'er µl, Taq DNA polimeraz (Fermentas) 0.4 µl, kalıp DNA 4 µl, MQ su 27.6 µl) şeklinde hazırlanmıştır. Bakteriyel izolatlara özgü 16S rDNA parçaları PCR döngüleri 94°C'de 3 dakika, 35 döngü (94°C 15 s, 53°C 15s, 72°C 20 s) ve 72°C'de 5 dakika son uzama safhası olmak üzere Eppendorf Personal[®] thermal cycler'da çoğaltılmıştır. Çoğaltılan DNA'lar % 1 agaroz jel elektroforezde 45 voltta 35 dakika yürütülmüş ve jel % 0.1 etidyum bromür ile boyanmıştır. PCR ürünleri transillimünatörde 302 nm UV ışık altında fotoğraflanarak kaydedilmiştir.

PCR örnekleri sekans analizi için Macrogen (Kore) firmasına gönderilmiş ve saptanan diziler gen bankasından (www.ncbi.nlm.nih.gov) Nucleotide-nucleotide Blast (blastn) ve alignment programları ile bakteriyel izolatlar tanılanmıştır.

3.2.5. *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* Irklarının Belirlenmesi

Psp ırklarının belirlenmesinde patojenin bilinen 7 ırkına karşı farklı duyarlılık gösteren bezelye çeşitlerinden oluşan ırk belirleme kriterleri (Çizelge 3.4) kullanılmıştır (Bevan vd., 1995). Bu amaçla John Innes genetik kaynaklar merkezi (İngiltere) ve van Waveren (Almanya) firmasından temin edilen bezelye çeşitlerine ait tohumlar az olması nedeniyle tohum üretimi yapılmıştır.

Serada daha önce belirtildiği gibi hazırlanan steril toprak karışımı önce *R. leguminosarum* ile inokule edilmiş ve 380 mm x 330 mm ebatlı sera saksılarına konmuştur. Her saksıya bezelye çeşitlerine ait tohumlardan 3'er adet ekilmiş

(21.12.2010) ve saksılar plastik tünel altına konmuştur (Şekil 3.7). Bitkiler çiçeklenme dönemine girmeden önce tünelden çıkarılarak etrafı organze tül ile kaplı, üst kısmı cam olan kafeslerin (Şekil 3.8) içinde açık havaya bırakılmıştır. Her gün düzenli olarak bitkiler sulanmış ve daha önce belirtildiği gibi haftada bir sıvı gübre verilmiştir. Nisan ayının ortasından Mayıs ayının ortalarına kadar olgunlaşan kapsüller hasat edilmiş (Şekil 3.9) ve kapsüller içerisindeki tohumlar nemsiz ortamda tül üzerinde kurutulduktan sonra kese kağıtları içerisinde +4°C’de saklanmıştır.

Çizelge 3.4. *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* ırklarının bezelye çeşitleri arasındaki ilişkileri (Bevan vd., 1995)

Çeşitler	<i>Psp</i> ırkları ve çeşitlerin reaksiyonları						
	1	2	3	4	5	6	7
Kelvedon Wonder	+	+	+	+	+	+	+
Early Onward	+	-	+	+	-	+	-
Belinda	-	+	-	+	+	+	-
Hurt' s Greenshaft	-	+	+	-	-	+	-
Partridge	-	+	-	-	-	+	-
Sleaford Triump	-	-	+	-	-	+	-
Vinco	-	-	-	+	-	+	-
Fortune	-	-	-	-	-	+	-

(+) duyarlı (-) dayanıklı



Şekil 3.7. Tünel altındaki (a) Partridge ve (b) Early Onward bezelye çeşitlerinin tohum ekiminden 15 gün sonraki görünümü



Şekil 3.8. Kafes altında bitkilerin görünümü



Şekil 3.9. Kapsül bağlayan (a) Hurt's Greenshaft ve (b) Vinco çeşitlerine ait bezelye bitkileri

Sekiz bezelye çeşidine ait çoğaltılan tohumlar 18.09.2011 tarihinde *R. leguminosarum* inokule edilmiş steril toprak karışımı bulunan 200 ml'lik bardaklara ekilmiştir. Bitkiler iki haftalık olduğu dönemde patojenisite testlerinde belirtilen inokulasyon yöntemine göre bakteri süspansiyonları (46 izolat) ve kontrol amacıyla damıtık su ve bilinen *Psp* (NCPPB-2585 ırk2) kullanılmıştır. Bu denemeler her bardakta 1 bitki olacak şekilde iklim odasında ($24\pm 2^{\circ}\text{C}$ sıcaklık, %

45-60 nispi nem, 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık ışıklanma periyodunda) 2 tekerrürlü olarak yürütülmüştür. İnokulasyondan 7 ve 14. gün sonrasında belirtiler gözlemlenmiştir. İnokule edilen bitkilerde gövde üzerinde ve yapraklarda inokulasyon noktasından itibaren yukarı doğru suda haşlanmış şekilde ortaya çıkan belirtiler pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir. Çizelge 3.4'den yararlanarak ırkların değerlendirmesi yapılmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Hastalıklı Bitki Örneklerinin Toplanması

2009 yılının Nisan ayında İzmir ilinin Torbalı ilçesinde Özgörkey Gıda Ürünleri Sanayi ve Ticaret. A.Ş. firmasının sözleşmeli olarak bezelye ekimi yapılan tarlalara ait üreticilerden gelen şikayetler doğrultusunda sürvey çalışmalarına başlanmıştır. Bu amaçla 9 bezelye üretim alanında (1025 da) Early Sweet, Geneva, Bolero ve Carina çeşidi bezelye bitkilerine ait hastalıklı bitki örnekleri toplanmıştır. Hastalık başlangıçta yaprak, kulakçık (stipül) ve gövde üzerinde koyu yeşil renkli, suda haşlanmış gibi lekeler, zamanla gövdeyi çepeçevre saran ve yukarı doğru uzanarak yaprakçık ve kulakçıklar üzerinde kahverengi yelpazeye benzeyen nekrotik lezyonlar şeklinde gelişmektedir (Şekil 4.1). Hastalıklı bitkilerden floresan *Pseudomonas* bakterileri izole edilmiş, patojenisite, biyokimyasal testler, evrensel primerler ile çoğaltılan 16S rDNA sekans analizleri (Gen Bankası erişim no: GU332546) sonrası etmen *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* (*Psp*) olarak tanımlanmış ve etmenin ülkemizdeki varlığı ilk kez rapor edilmiştir (Benlioğlu vd., 2010).

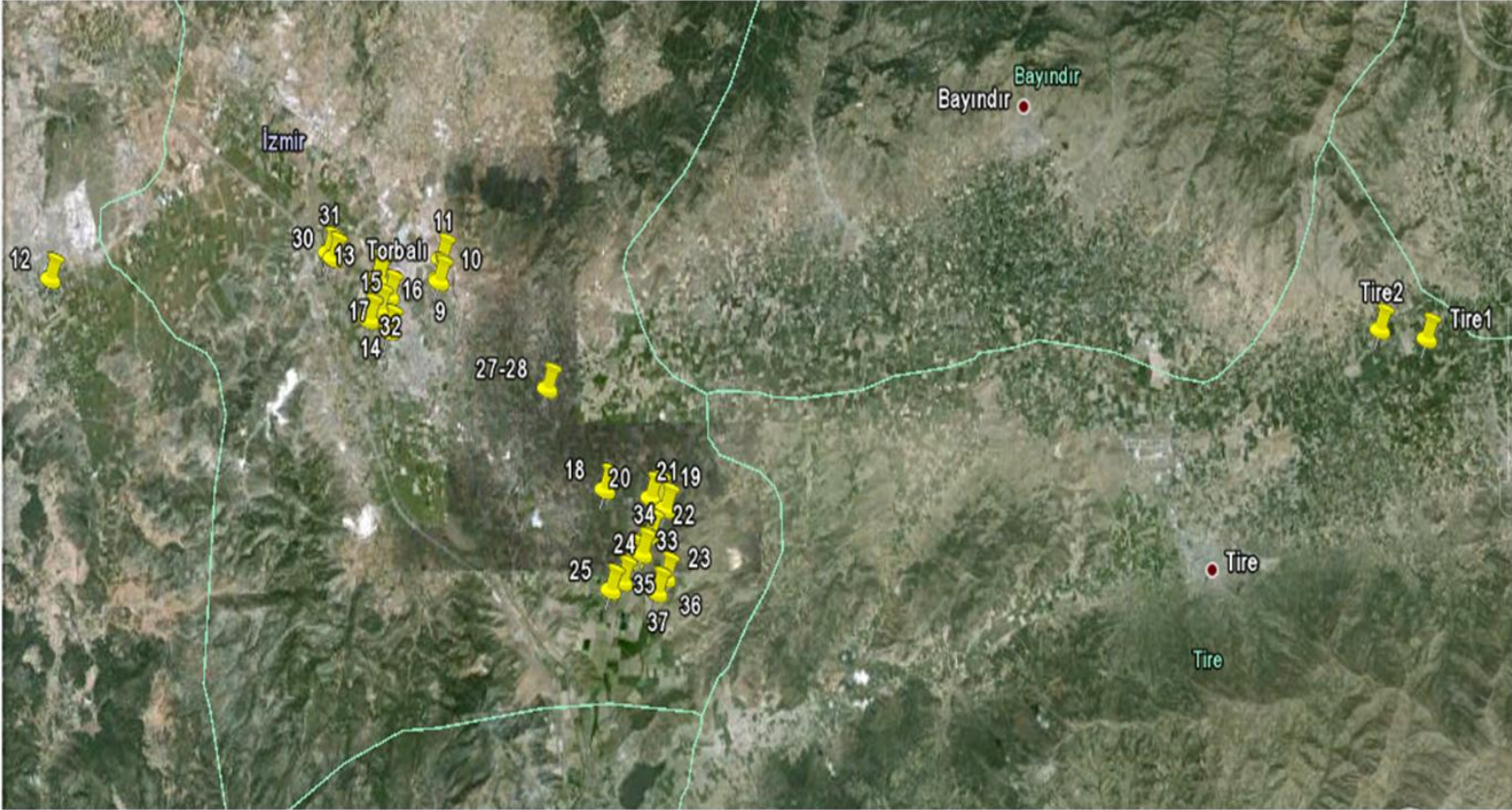
2010 yılının Şubat ve Nisan aylarında İzmir ilinin Torbalı (28), Tire (2) ve Ödemiş (1) ilçelerinde toplam 2729 da bezelye ekiliş alanında 31 bezelye tarlası incelenmiştir (Şekil 4.2). 2010 yılının Mart ayında ise Aydın ilinin Nazilli (3), Buharkent (7) ve Çine (5) ilçelerindeki 15 bezelye tarlasında, toplam 58 da bezelye ekiliş alanında sürvey yapılmıştır (Şekil 4.3). Yapılan incelemelerde İzmir ilinde bezelye ekiminin daha çok konserve amacıyla yetiştirildiği ve ekim alanlarının Torbalı ilçesinde yoğunluk kazandığı görülmüştür. Aydın ilinde ise bezelye üretiminin daha çok sofralık amaçlı taze bezelye tüketimine yönelik olarak yapıldığı dikkati çekmiştir. Aydın ilinde en yaygın bezelye üretiminin Buharkent'te yapıldığı görülmüştür. Diğer ilçelerde bezelye üretiminin çok az olduğu üreticilerin kendi ihtiyaçlarını karşılamak için sofralık bezelye yetiştirdikleri görülmüştür. Çine ilçesinde de üreticiler bezelye üretimini sınırlayan faktörlerden birinin kuş zararı olduğunu bu nedenle ekim yapmaktan kaçındıklarını dile getirmişlerdir.

Bezelye üretim alanlarında yapılan incelemelerde İzmir ilinde yaygın olarak ekimi yapılan çeşitlerin Bolero, Carina, Geneva, Durango, Early Sweet, Legacy,

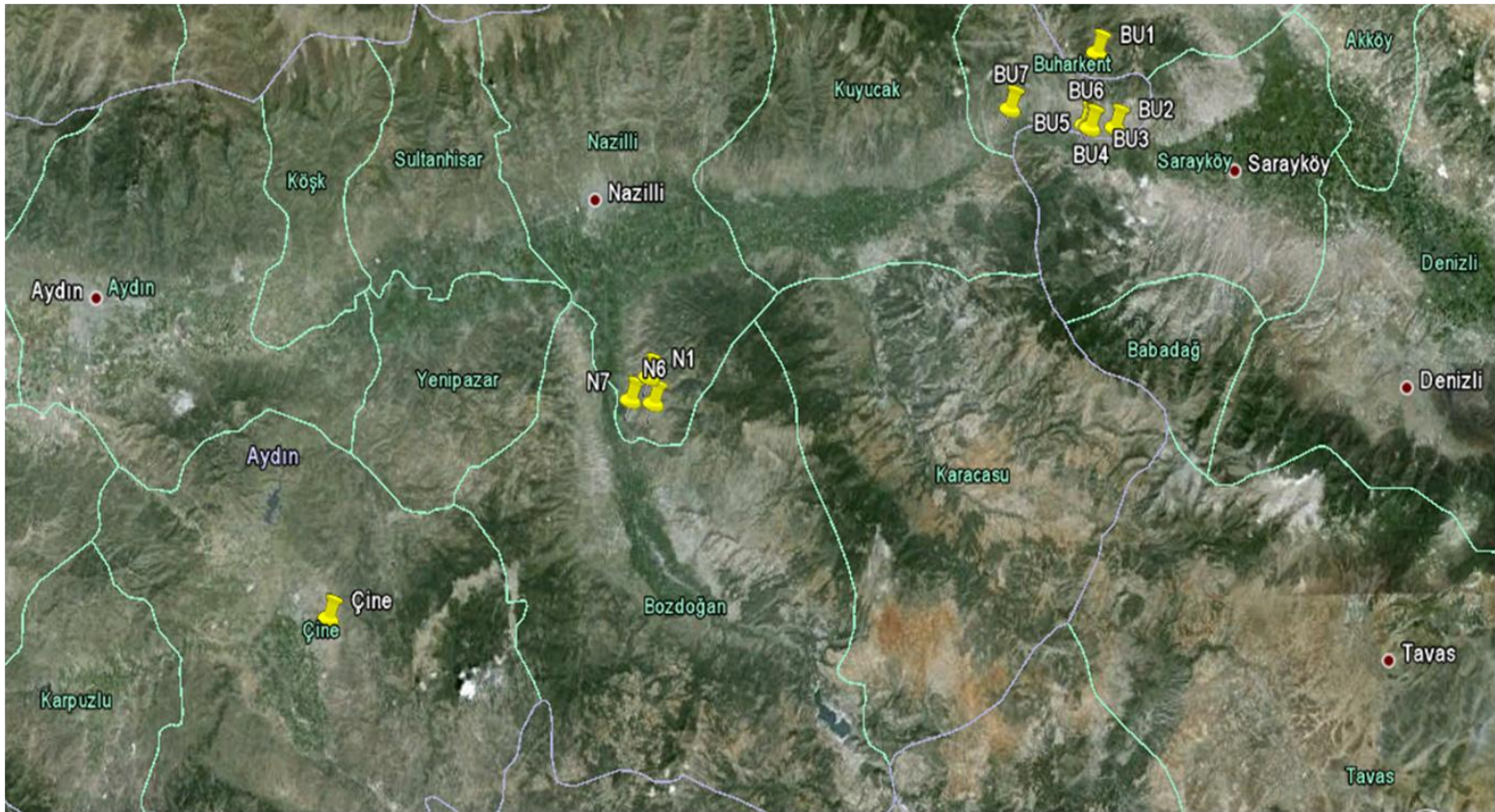
Sienna, Waverex ve Winer olduğu, Aydın ilinde ise Utrillo ve yerli çeşitlerin ekildiği görülmüştür. İzmir ilinde sürvey yapılan tarlalarda bezelye ekimleri 2009 yılında 5 Aralık-5 Ocak tarihlerinde, 2010 yılında 22-30 Kasım, 1 Aralık, 5-12 Ocak, 9-17 Şubat, 5 Mart tarihleri arasında yapıldığı ve daha çok kasım ve aralık aylarında ekimin yapıldığı dikkati çekmiştir. Aydın ilinde ise 18-22 Kasım ve 4 Aralık tarihlerinde bezelye ekimi yapıldığı kaydedilmiştir. Hastalıklı bitki örnekleri incelendiğinde gövde üzerinde ve yaprakların sapa bağlandığı kısımlarda tipik suda haşlanmış şeklinde, ileri dönemlerde kahverengi lezyonlara dönüşen belirtiler görülmüştür. Özellikle bu belirtilerin yukarı doğru uzanarak gövdeyi çepeçevre sardığı, yaprakçık ve kulakçıklar üzerinde yelpazeye benzeyen kahverengi lezyonlar dikkati çekmiştir. Şekil 4.4'de Torbalı ilçesinde Bolero çeşidi, Şekil 4.5'de Buharkent'te Utrillo bezelye çeşitlerinde *Psp*'nin neden olduğu tipik belirtiler görülmektedir.



Şekil 4.1. Torbalı'da Geneva çeşidi bezelye bitkisinde *Psp*'nin oluşturduğu tipik yanıklık ve yelpaze şeklindeki belirtiler



Şekil 4,2 İzmir ili Torbalı, Tire ve Ödemiş ilçelerinde 31 örnekleme noktasından örnek alınan bezelye tarlaları



Şekil 4.3. Aydın ili Nazilli, Buharkent ve Çine ilçelerinde 15 örnekleme noktasından örnek alınan bezelye tarlaları



Şekil 4.4. Torbalı'da Bolero çeşidi bezelye bitkisinin yapraklarında yelpaze şeklindeki belirtiler



Şekil 4.5. Buharkent'te Utrillo çeşidi bezelye bitkisinin yapraklarında yelpaze benzeri belirtiler ve gövde ile saplarında suda haşlanma belirtileri



Şekil 4.6. Torbalı ilçesinde 8.2.2010 tarihinde Bolero çeşidi ekili bir bezelye tarlasında soğuk ve Bakteriye Yanıklık hastalığı nedeniyle bitkilerin yanmış gibi görüntüsü

2010 yılında yapılan sürveyler sırasında bazı bezelye tarlalarının tamamen kuruduğu ve üreticilerin tarlayı bozarak yeniden ekim yapmak ya da başka ürün yetiştirmek zorunda kaldığı şiddetli hastalık oluşumu ile karşılaşmışlardır. Şekil 4.6'da Torbalı'da bu düzeyde hastalığın görüldüğü 4 tarladan (toplam 212 da) bir tanesinin fotoğrafı görülmektedir. Bu tarlalar ile ilgili veriler incelendiğinde bitkilerin kısmen dondan zarar gördüğü ve bazılarının da üst üste bezelye ekimi yapılan tarlalar olduğu dikkati çekmiştir. Bu tarlalardaki bezelye ekimleri kasım sonu gibi erken tarihlerde olduğu görülmüştür. Ayrıca sürvey yapılan Torbalı (5) ve Tire (1) ilçelerinde 6 bezelye üretim alanında (toplam 860 da) herhangi bakteriyel bir hastalık belirtisi görülmemiştir.

4.2. İzolasyon ve Ön Tanılama

2009-2010 yılları arasında İzmir ve Aydın illerinde örnek alınan bezelye bitkilerinin yaprak, gövde, sap ve kapsüllerden yapılan izolasyon çalışmalarında KB besiyerinde gelişen farklı koloni morfolojisine sahip bakteriler izole edilmiş ve 163 izolat saflaştırılarak stoklanmıştır. 2009 yılında İzmir ilinde 9 örnekleme noktasından 13 izolat, 2010 yılında İzmir ilinden 31 örnekleme noktasından 113 izolat ve Aydın ilinde 15 örnekleme noktasından 37 izolat elde edilmiştir. Elde edilen 163 izolat KOH testinde Gram negatif olduğu belirlenmiş ve 61 tanesi tütünde aşırı duyarlılık reaksiyonu göstermiştir. Elde edilen 61 izolat KB besiyerinde UV ışık altında floresan oluşumu, LOPAT testi ve bezelye bitkilerinde (Bolero ve Geneva çeşidi) patojenisite testleri sonrası toplam 47 bakteriyel izolataın bezelye bitkilerinde patojen olduğu belirlenmiştir. Elde edilen tüm izolatlara KB besiyerinde UV ışık altında floresans oluşturmaktadır.

Elde etmiş olduğumuz 46 izolataın LOPAT test sonuçları Levan (+), Oksidaz (-). Patateste yumuşak çürüklük (-), Arginin hidrolizi (-) ve Tütünde aşırı duyarlılık (+) olarak bulunmuş ve *Pseudomonas syringae* LOPAT Ia grubu içerisinde yer aldığı saptanmıştır. Bir izolataın LOPAT test sonuçları ise Levan (-), Oksidaz (-). Patateste yumuşak çürüklük (+), Arginin hidrolizi (-) ve Tütünde aşırı duyarlılık (+) olarak bulunarak LOPAT II grubu içerisinde yer aldığı belirlenmiştir (Lelliott vd., 1966). Bu izolatlardan 25'i Torbalı, 2'si Ödemiş, 18'i Buharkent ve 2 tanesi de Nazilli ilçelerindeki bezelye üretim alanlarından elde edilmiştir.

Çizelge 4.1'de izolatlara ait bilgiler (ilçe, çeşit, ekim alanı, ekim tarihi, izole edilen bitki organı) ile ilgili bilgiler verilmiştir. Çizelgede görüleceği gibi hastalıklı bitkilerin belirti gösteren yaprak, gövde, sap ve kapsüllerinden izolasyonlar yapılarak etmenin varlığı kesin olarak saptanmaya çalışılmış ve bu kısımlar fotoğraflanarak etmenin oluşturduğu belirti tipleri ortaya konmaya çalışılmıştır. Şekil 4.7'de Buharkent ilçesinde Utrillo çeşidi bezelye bitkilerinde Bz20 izolataının gövde, Bz19 izolataının yapraklarda oluşturduğu tipik Bakteriyel Yanıklık belirtileri görülmektedir. Şekil 4.8'de ise Ödemiş ilçesinde Carina çeşidi bezelye bitkisinin kapsüllerinde ve Torbalı ilçesinde Sienna çeşidi bezelye bitkisinin yapraklarında oluşturduğu Bakteriyel Yanıklık belirtileri gösterilmektedir.



Şekil 4.7. Buharkent'te Utrillo çeşidi bezelye bitkisinin (a) gövdesinde (Bz20 izolatu) ve (b) yapraklarında (Bz19 izolatu) Bakteriyel Yanıklık belirtileri



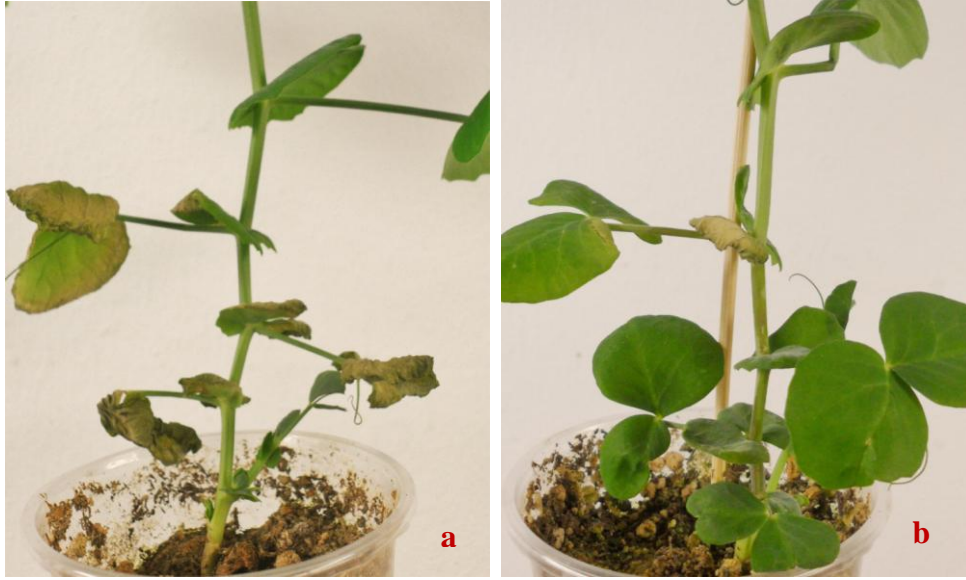
Şekil 4.8. Ödemiş'te (a) Carina çeşidi bezelye bitkisinin kapsüllerinde (Bz16/1 izolatu) ve Torbalı'da (b) Sienna çeşidi bezelye yapraklarında (Bz12/2 izolatu) Bakteriyel Yanıklık belirtileri

4.3. Patojenisite Testleri

LOPAT testleri ile ön tanılaması yapılan bitki patojeni olduğu tahmin edilen 61 izolat Geneva ve Bolero çeşidi bezelye bitkilerinde patojenisite testleri sonrasında 47 izolat bezelye bitkilerini hastalandırarak pozitif sonuç vermiştir. İlk belirtiler inokulasyondan 4 gün sonra inokulasyon noktasından çevreye doğru yayılan suda haşlanmış bir görünüm ortaya çıkmıştır. İnokulasyondan 7-10 gün sonra ise tipik suda haşlanmış şekilde belirtiler görülmeye başlamış ve inokulasyon noktasından gövde boyunca yukarı doğru yayılan bir görünüm almıştır. Daha sonra yapraklarda önce nokta şeklinde suda haşlanmış belirtiler ortaya çıkmış ve bu belirtiler birleşerek nekrotik alanlara dönüşmüş ve yaprağın kurumasına neden olmuştur. İnokulasyondan 10-15 gün sonrasında inokule edilen bitkilerin tamamen etkilendiği görülmüş ve bazı izolatların yapraklarda kurumalara neden olduğu dikkati çekmiştir. Şekil 4.9'da Geneva çeşidi bezelye bitkilerinde Bz18 ve Bz13, Şekil 4.10'da Bolero çeşidi bezelye bitkilerinde Bz9 ve Bz2 nolu izolatların neden olduğu belirtiler görülmektedir. Patojenisite denemelerinde referans kültür olarak inokule edilen *Psp* (NCPPB-2585) izolatı Bolero ve Geneva bitkilerinde tipik suda haşlanmış görünümlü belirtiler oluşturmuş ve testlenen 46 izolat ile aynı tipte belirtiler oluşturduğu görülmüştür.



Şekil 4.9. Geneva çeşidi bezelye bitkisinde (a) Bz18 ve (b) Bz13 izolatlarının yaprak ve gövde de oluşturduğu suda haşlanma belirtileri



Şekil 4.10. (a) Bz9 ve (b) Bz2 izolatının inokulasyondan 14 gün sonra Bolero çeşidi bezelye bitkisinin gövde ve yapraklarında oluşturduğu belirtiler

Patates yumuşak çürüklük testinde 46 izolatta farklı olarak pozitif sonuç veren Bz9 izolatı ise öncelikle inokulasyondan 4 gün sonra inokulasyon noktasında kahverengi nekroz oluşturmuş, 10 gün sonrasında inokulasyon noktası seviyesindeki (2. ve 3. boğum) yapraklarda kloroz ve 14 gün sonrasında da kurumalara neden olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.10a). Ancak bu izolatın diğer 46 izolatta olduğu gibi tipik suda haşlanma belirtiler oluşturmadığı dikkati çekmiştir. Bolero ve Geneva bezelye çeşitlerinde referans kültürlerden *Pss* (NCPPB-281) ve *P. viridiflava* (*Pv3*) ile inokule edilen bitkilerde de tipik suda haşlanmış belirtiler görülmemiş ancak inokulasyon noktasında kırmızı kahverengi nekrozlar görülmüştür.

Bezelye bitkilerinde patojen olduğu saptanan 47 izolat ve referans kültürler *Psp* (NCPPB-2585) ve *Pss* (NCPPB-281) ile yeşil limon meyveleri ile yapılan patojenisite testi sonucunda *Pss* (NCPPB-281) kültürü dışında hiçbir izolat pozitif sonuç vermemiştir. *Pss* (NCPPB-281) kültürü, yeşil limon meyvelerine inokulasyondan 7 gün sonra inokulasyon noktasında içine doğru çökük, kahverengi nekrotik alan etrafında sararma belirtileri oluşturduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.11). Diğer tüm izolatlara ve *Psp* (NCPPB-2585) ile inokule edilen limon

meyvelerinde ya hiçbir belirti görülmemiş yada hafif kahverengileşme görülmüştür.

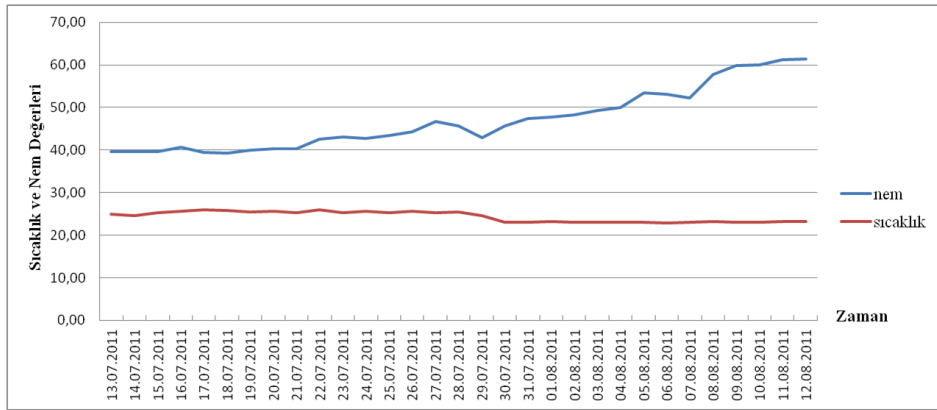


Şekil 4.11. Solda *Pss* (NCPPB-281) sağda *Psp* (NCPPB-2585) ile inokule edilen limon meyvelerinde belirti oluşumu [(a) pozitif, (b) negatif sonuç]

Kelvedon Wonder çeşidi bezelye bitkisinde yapılan patojenisite çalışması boyunca iklim odasındaki sıcaklık ve nem verileri her 15 dakikada bir kaydedilmiştir. Şekil 4.12’de görüleceği gibi sıcaklık değerleri 22-25°C arasında ve nispi nem değerleri de % 40-61 arasında seyretmektedir. Diğer çeşitlerde (Bolero ve Geneva) suda haşlanma belirtisi gösteren 46 izolat Kelvedon Wonder çeşidi bezelye bitkisinde de inokulasyondan 4 gün sonra ilk belirtiler görülmüş ve belirtiler suda haşlanma şeklinde meydana gelmiştir. Daha sonraki dönemlerde hastalık bu izolatların Bolero ve Geneva çeşidinde oluşturduğu belirtilere benzer şekilde geliştiği gözlemlenmiştir. Yapraklarda damarlar ile sınırlı suda haşlanma belirtileri oluşmuş ve ileri dönemlerde nekrotik alanlara dönüşerek yelpaze şeklinde tipik *Psp* belirtileri ortaya çıkmıştır. Bazı izolatların Kelvedon Wonder bitkisinde oluşturduğu tipik *Psp* belirtileri Şekil 4.13’de görülmektedir. Bu izolatlardan bazılarının hastalıklı bitki dokularında inokulasyondan 14 gün sonra krem rengi bakteriyel akıntı oluşturduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.14). Ayrıca bazı izolatların gövdede hızla ilerleyerek çiçek enfeksiyonlarına neden olduğu belirlenmiş ve bu bitkilerin kapsül saplarında ve kapsüller üzerinde suda haşlanmış belirtiler görülmüştür (Şekil 4.15). Hastalıklı bitkiler 0-4 skalası kullanarak 7 ve 14. günlerde değerlendirilmiştir. İnokulasyondan 2 hafta sonra 46 izolatın 4’ü sadece inokulasyon noktasında suda haşlanmış belirti oluşturmuş, 23’ü gövde ve yapraklarında suda haşlanmış belirtilerin yanı sıra yaprakların yaklaşık % 25’inin

kurumasına, 14'ü yaprak ve gövdede suda haşlanmış belirtilere ilaveten yaprakların yarısına yakın kısmının kurumasına ve 5'i ise gövde ve yapraklarda suda haşlanmış belirtiler devam ederken yaprakların yarısından fazlasının kurumasına neden olduğu saptanmıştır.

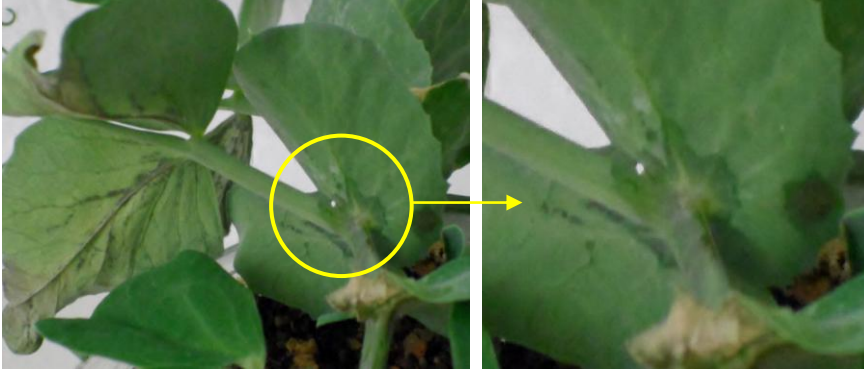
Diğer çeşitlerde de farklı belirtiler gösteren Bz9 izolatu gözlem süresince Kelvedon Wonder çeşidi bezelye bitkisinin yaprak ve gövdesinde herhangi bir hastalık belirtisi oluşturmamış sadece inokulasyon noktasında kahverengi nekrotik alan oluşmuştur (Şekil 4.16). Benzer şekilde *Pss* (NCPB-281) ve *P. viridiflava* (*Pv3*)'da Kelvedon Wonder çeşidinde hastalık belirtisi oluşturmamış sadece inokulasyon noktasında sadece nekrotik alan oluşturduğu görülmüştür (Şekil 4.17). Steril su ile inokule edilen kontrol bitkilerinde ise hastalık belirtisi veya inokulasyon noktasında kahverengi nekrotik alan görülmemiştir.



Şekil 4.12. Kelvedon Wonder çeşidi bezelye bitkisinde patojenisite testleri süresince iklim odasında kaydedilen sıcaklık ve nem verileri



Şekil 4.13. Kelvedon Wonder çeşidi bezelye bitkisinde bazı izolatların yaprak ve gövdede oluşturduğu belirtiler [(a) Bz4, (b) Bz32/2, (c) Bz31/1, (d) *Psp* (NCPFB-2585)]



Şekil 4.14. Kelvedon Wonder çeşidi bezelye bitkisinde Bz7 ile inokulasyondan 14 gün sonra inokulasyon noktasında görülen bakteriyel akıntı



Şekil 4.15. Kelvedon Wonder çeşidi bezelye bitkisinde Bz11 izolatının inokulasyondan 14 gün sonra tepe sürgüne kadar ilerleyerek çiçeği enfekte etmesi (solda) ve enfekteli çiçekten enfekteli kapsül oluşumu (26 gün sonra) (sağda)



Şekil 4.16. Bz9 izolatu ile inokule edilen Kelvedon Wonder çeşidi bezelye bitkisinin inokulasyondan 14 gün sonra inokulasyon noktasının görünümü



Şekil 4.17. Referans izolatlardan (a) *P. viridiflava* ve (b) *P.s. pv. syringae* Kelvedon Wonder çeşidi bezelye bitkisinin inokulasyon noktasında oluşturduğu nekrotik lezyonlar

Çizelge 4.1'de tüm izolatların Kelvedon Wonder çeşidi bezelye bitkisinde hastalık oluşumuna yönelik skala değerleri verilmiştir. Aynı araziden elde edilen izolatlar ise arazinin farklı alanlarından ve farklı bitkilerden izole edilmiştir.

Çizelge 4.1. Bezelyede patojen izolatlar ve referans kültürlerine ait bilgiler

İzolat No	İlçe	Çeşit	Ekim alanı (da)	Ekim Tarihi	İzolasyonun Yapılan kısım**	Kelvedon ^{***} Wonder
Bz1	Torbalı	E.Sweet	60 da	05.12.2008	Y	3
Bz2	Torbalı	E.Sweet	60 da	05.12.2008	Y	3
Bz3	Torbalı	E.Sweet	60 da	05.12.2008	Y	4
Bz4	Torbalı	E.Sweet	60 da	05.12.2008	Y	4
Bz5/1	Torbalı	Geneva	240 da	05.12.2008	G	4
Bz5/2					G	2
Bz5/4					G	3
Bz6/1	Torbalı	Bolero	160 da	05.12.2008	Y	4
Bz6/2					Y	3
Bz7	Torbalı	E.Sweet	300 da	05.01.2009	Y	3
Bz8/1	Torbalı	Carina	25 da	05.12.2009	Y	2
Bz8/2					Y	3
Bz9	Torbalı	Carina	20 da	12.01.2010	S	0
Bz10/1	Torbalı	Legancy	60 da	29.11.2009	S	2
Bz10/2					Y	3
Bz11	Torbalı	Bolero	60 da	24.11.2009	S	3
Bz12/1	Torbalı	Sienna	55 da	30.11.2009	Y	2
Bz12/2					Y	3
Bz13	Torbalı	Geneva	60 da	30.11.2009	Y	4
Bz14/1	Torbalı	Geneva	40 da	30.11.2009	S	3
Bz14/2					S	3
Bz14/3					Y	2
Bz15	Torbalı	Carina	100 da	25.11.2009	Y	2
Bz16/1	Ödemiş	Carina	125 da	01.12.2009	K	2
Bz16/2					G	3
Bz17	Torbalı	E.Sweet	34 da	09.01.2010	Y	2
Bz18	Torbalı	Geneva	90 da	01.12.2009	Y	2
Bz19	Buharkent	Utrillo	11 da	18.11.2009	Y	2
Bz20					S	2
Bz21					Y	3

Çizelge 4.1'in devamı

Bz22	Buharkent	Utrillo	5 da	04.12.2009	G	2
Bz23					G	1
Bz24/1					Y	1
Bz24/2					Y	1
Bz25	Buharkent	Utrillo	3 da	04.12.2009	Y	2
Bz26/1					S	2
Bz26/2					Y	2
Bz27/1					Y	2
Bz27/2					Y	2
Bz28					G	2
Bz29	Buharkent	Utrillo	8 da	04.12.2009	Y	2
Bz30/1					Y	2
Bz30/2					Y	2
Bz31/1	Buharkent	Utrillo	5 da	04.12.2009	Y	2
Bz31/2					Y	2
Bz32/1	Nazilli	Yerli çeşit	> 1 da	28.11.2009	S	1
Bz32/2					Y	3
<i>Psp*</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>pisi</i> (NCPBB-2585)					3
<i>Pss*</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> (NCPBB-281)					0
<i>Pv*</i>	<i>Pseudomonas viridiflava</i> (Pv3)					0

*Referans izolatlar; ** Y (yaprak), S (sap), G (gövde), K (kapsül); *** 0-4 skalasına göre değerlendirme

4.4. Biyokimyasal Testler

Ön tanılama testlerinden geçerek bezelyelerde patojen olan 47 adet bakteri izolatının tanılamasında glikozdan asit oluşumu, jelatin sivilaşması, eskulin hidrolizi, nitrat redüksiyon, sakkarozdan indirgenmiş madde oluşumu, buz çekirdeklenme aktivitesi testlerinden yararlanılmıştır. Ayrıca Cintas vd. (2002) besiyeri kullanılarak karbon kaynaklarından betain, D-galaktoz, D-ksiloz, D-mannitol, D-maltoz, D-sorbitol, eritritol, gliserol, α -metil-glikozit, homoserin, inositol, laktik asit, askorbik asit, L-tartarik asit, malonik asit ve süksinik asit kullanımı yanı sıra API ID 32GN test kitinden yararlanılmıştır.

Tüm izolatlar ve referans *Pss*, *Psp* ve *Pv* izolatları oksidatif glikoz metabolizmasına sahiptir ve sakkarozdan indirgenmiş madde oluşumu ve nitrat redüksiyon test sonuçlarının aynı olduğu belirlenmiştir. Karbon kaynaklarından betain, D-galaktoz, L(+askorbik asit, malonik asit, süksinik asit, D-riboz, inositol, L-alanin, gliserol, D-glukoz, salisin, D-melibiyoz, L-arabinoz, kaprik asit, trisodyum sitrat, L-histidin, potasyum-2-ketoglukonat, 3-hidroksibütirik asit, 4-hidroksibenzoik asit, L-serin ve L-prolin kullanımları pozitif olarak bulunmuştur. Karbon kaynağı olarak ise α -metil-glukozit, itakonik asit, sodyum asetat ve 3-hidroksibenzoik asit kullanımları negatif belirlenmiştir.

İzolatlar arasında jelatin sıvılaşması, eskulin hidrolizi, buz çekirdeklenme aktivitesi ve karbon kaynaklarından D-ksiloz, D-maltoz, D-mannitol, D-sorbitol, eritritol, homoserin, laktik asit, L-tartarik asit ve trehaloz kullanımları açısından farklılıklar bulunmaktadır. API ID 32 GN test kiti içerisinde yer alan karbon kaynaklarından L-ramnoz, N-asetil glukosamin, süberik asit, L-fukoz, potasyum-5-ketoglukonat, glikojen, sodyum malonat, propionik asit ve valerik asit kullanımları cihaz tarafından tam okunmadığı için değerlendirmeye alınmamış ve API ID 32 GN sistemi veri tabanında otomatik olarak tanılama yapılamamıştır.

Çizelge 4.2'de izolatlar ve referans kültürlerine ait farklı bulunan biyokimyasal testlerin sonuçları verilmiştir. Şekil 4.18'de bazı izolatlara ait homoresin ve D-sorbitol karbon kaynaklarını kullanmaları açısından negatif ve pozitif sonuçlar görülmektedir. Bz15, Bz16/1 ve Bz16/2 şekilde de görüldüğü gibi her iki karbon kaynağını kullanamamakta fakat petride görülen diğer izolatlar pozitif olarak değerlendirilmiştir.

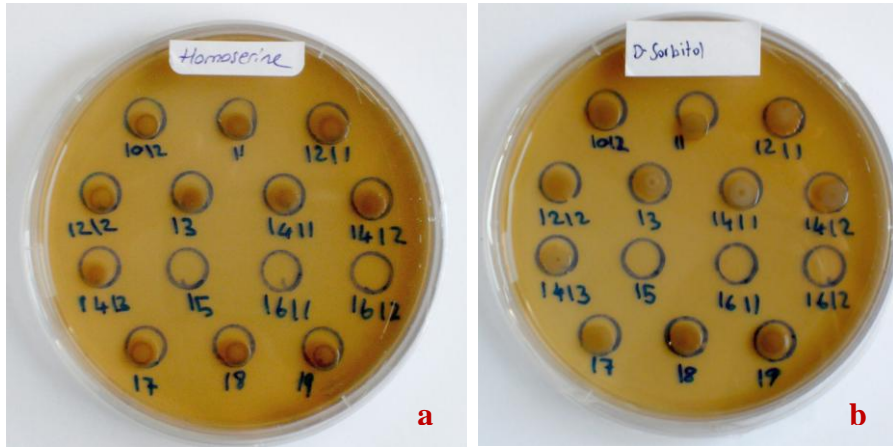
Çizelge 4.2. Bezelye izolatları ve referans kültürlerin biyokimyasal test sonuçları

İzolat no	Jelatin sıvılaşması	Eskulin hidrolizi	Buz Çek. aktivitesi	D-ksiloz	D-maltoz	D-mannitol	D-sorbitol	Eritritol	Homoserin	Laktik asit	L-tartarik asit	Trehaloz
Bz1	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-
Bz2	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-
Bz3	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+
Bz4	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+
Bz5/1	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-
Bz5/2	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-
Bz5/4	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-
Bz6/1	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+
Bz6/2	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+
Bz7	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+
Bz8/1	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-
Bz8/2	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-
Bz9	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-
Bz10/1	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-
Bz10/2	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-
Bz11	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-
Bz12/1	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-
Bz12/2	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-
Bz13	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-
Bz14/1	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-
Bz14/2	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-
Bz14/3	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-
Bz15	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-
Bz16/1	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-

Çizelge 4.2'nin devamı

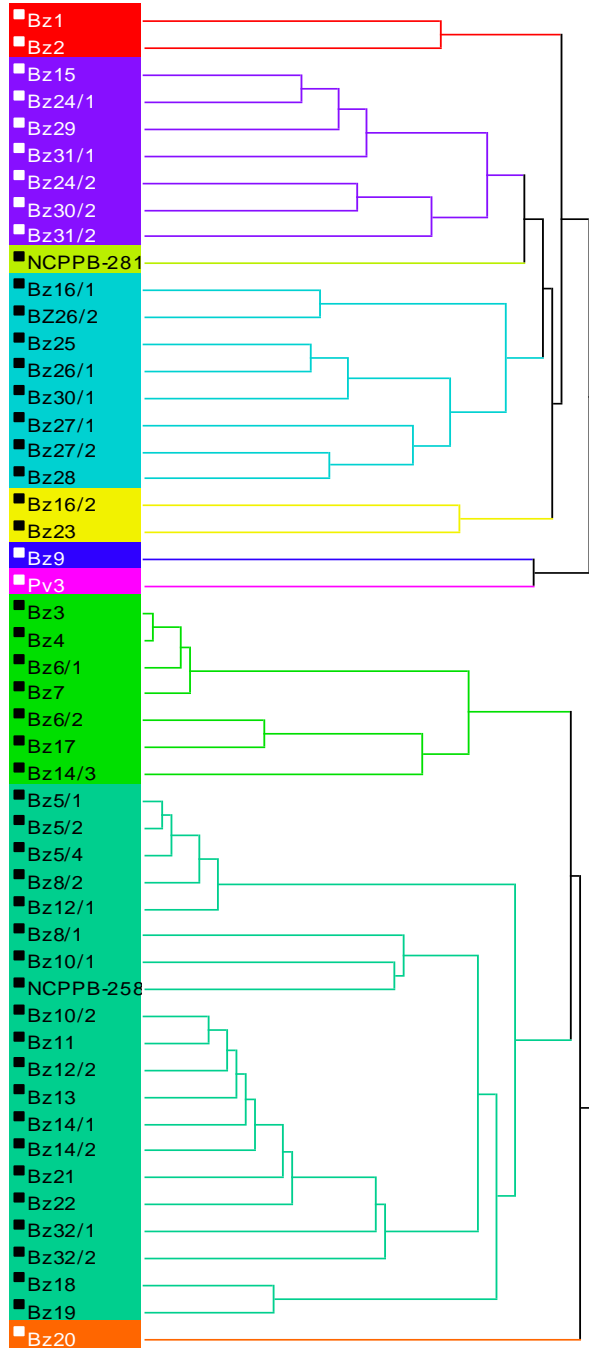
Bz16/2	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-
Bz17	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+
Bz18	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+
Bz19	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+
Bz20	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Bz21	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-
Bz22	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-
Bz23	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
Bz24/1	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-
Bz24/2	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-
Bz25	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-
Bz26/1	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-
Bz26/2	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-
Bz27/1	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-
Bz27/2	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-
Bz28	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-
Bz29	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-
Bz30/1	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-
Bz30/2	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-
Bz31/1	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-
Bz31/2	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+
Bz32/1	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-
Bz32/2	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-
Yüzde + / -	(43) -	(47) +	(75) +	(96) +	(81) -	(96) +	(81) +	(98) -	(66) +	(57) -	(98) -	(79) -
Psp	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-
Pss	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-
Pv3	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-

Referans izolatlar: *Psp* (*Pseudomonas syringae* pv. *lisi*, NCPPB-2585), *Pss* (*P. s.* pv. *syringae*, NCPPB-281), *Pv3* (*P. viridiflava*). (+) Pozitif; (-) negatif sonuç (Sonuçlar en az 3 kez yinelandikten sonra elde edilen sonuçlardır.)



Şekil 4.18. Bz15, Bz16/1 ve Bz16/2 nolu izolatlar dışında diğer izolatların (a) homoserin ve (b) D-sorbitol karbon kaynaklarını kullanımı

Tüm izolatlar ve referans kültürlerine (*Psp* NCPPB-2585, *Pss* NCPPB-281 ve *Pv3*) ait LOPAT ve izolatlar arasında farklılık gösteren biyokimyasal testler küme analizi ile sınıflandırıldığında Şekil 4.19'da görüldüğü gibi izolatlar kendi aralarında 8 gruba ayrılmaktadır. *Psp* NCPPB-2585 ile aynı grupta 19 izolatın olduğu görülmektedir. Biyokimyasal özellikler açısından Bz9 izolatu *Pv3* ile yüksek oranda benzerlik göstermekte ancak jelatin sivilaşması, eskulin hidrolizi, buz aktivitesi, homoserin ve eritritol kullanımı açısından farklılık göstermektedir. Bz20 nolu izolat eritritol kullanımı *Pss* NCPPB-281 ile benzerlik göstermesine rağmen Bz20 izolatının D-maltoz, trehaloz, homoserin, L-tartarik asit kullanımları pozitif, laktik asit ve eskulin hidrolizi negatif sonuç alınmış ve *Pss* ile tam tersi sonuçlar ortaya koymuştur.

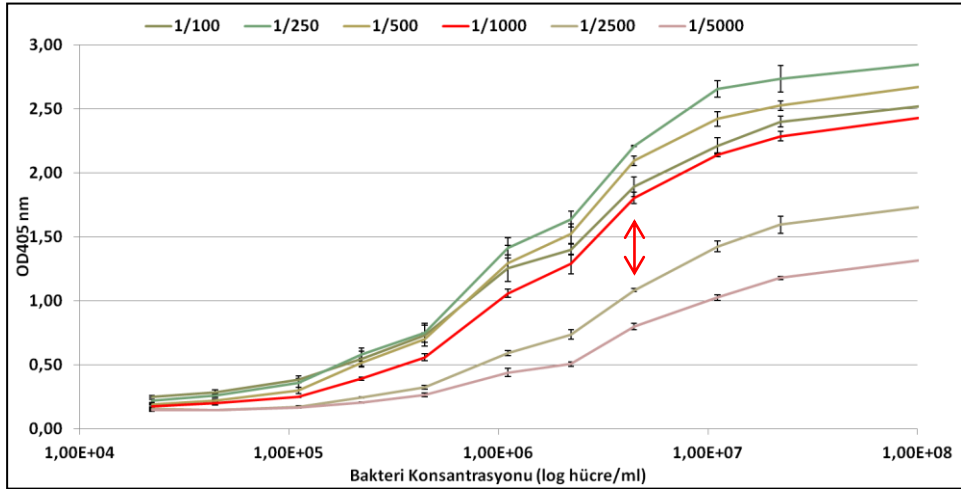


Şekil 4.19. İzolatların küme analizi ile sınıflandırılması

4. 5. Serolojik Testler

Daha önce *Psp* olarak tanılanmış olan (Bz4) ve bilinen *Psp* izolatının (NCPBB-2585) ısı ile öldürülmüş hücrelerine karşı üretilen antiserum titreleri lam aglütinasyon testlerinde 1/50 seyreltmede pozitif sonuç vermiştir. Elde edilen antiserumlar amonyum sülfat ile çöktürülüp dializ edilerek saflaştırıldıktan sonra ELISA ve IFAS testlerinde kullanılmıştır.

Saflaştırılan antiserumların en uygun antiserum konsantrasyonu ve saptanabilir antijen konsantrasyonlarının belirlenmesi için antijen ve antiserum seyreltme serileri ile yapılan ELISA test sonuçları Şekil 4.20’de grafik haline getirilmiştir. Grafikte görüleceği gibi saptanabilir en uygun antijen miktarı 5.10^6 hücre/ml, antiserum titresi de 1/500 ve 1/1000 olarak belirlenmiştir. Benzer şekilde antijen ve antiserum seyreltmeleri kullanılarak IFAS testi için en uygun antijen konsantrasyonu 10^4 hücre/ml, antiserum konsantrasyonu da 1/500 ve 1/1000 olarak saptanmıştır.



Şekil 4.20. İndirekt ELISA testinde farklı bakteri konsantrasyonlarının 6 farklı antiserum seyreltme serisine karşı reaksiyonlar

Çalışmalarımızda 3 tekerrürlü olarak yürütülen ELISA testlerinde pleytlerin 45. dakikada okutulan ortalama sarı renk intensitesi baz alınarak değerlendirme yapılmış ve antijen ile kaplı olmayan (PBS) kuyulardaki ortalama absorbans değerinin 3,5 katından (Rowhani vd., 1994) büyük olanlar pozitif olarak kaydedilmiştir. Çizelge 4.3'te ısı uygulanarak tavşanda üretilen antiserumların her iki çalışma titresi kullanılarak yapılan ELISA ve IFAS testlerinin sonuçlarına yer verilmiştir. Bezelyelerde patojen olduğu belirlenen 47 izolat için sonuçlar değerlendirildiğinde Bz4 antiserumunun 1/500 ve 1/1000 konsantrasyonlarında sırasıyla % 98-83 oranında pozitif sonuç elde edilirken As-2585'in her iki konsantrasyonunda %74 oranında pozitif sonuç elde edilmiştir. Her iki antiserum ve konsantrasyonlarında *Psp* ile pozitif sonuç elde edilmiştir. Yine her iki antiserum *P.s. pv. lachrymans*, *P. corrugata*, *P.s. pv. glycinea*, *P.s. pv. mori*, *P.s. pv. morsprunorum*, *P.s. pv. phasecolica* ve *P.s. pv. maculicola* bakterileri ile çapraz reaksiyon göstermiştir. *P. fluorescens* As-Bz4 ile çapraz reaksiyon gösterirken *P.s. pv. tomato* ise As-2585 ile çapraz reaksiyon göstermiştir. Ayrıca *P.s. pv. syringae* As-Bz4'ün her iki konsantrasyonunda çapraz reaksiyon oluştururken sadece As-2585'nin 1/1000 konsantrasyonunda negatif sonuç vermiştir (Çizelge 4.3).

Patojen izolatlardan negatif bulunan ve çapraz reaksiyon gösteren bakteriler ısı uygulamasına tabi tutulduktan sonra tekrar indirekt ELISA testi yapıldığında antiserumlar tüm izolatlarda pozitif sonuç vermiştir fakat çapraz reaksiyonu bu şekilde ortadan kaldırılamıyacağı anlaşılmıştır.

47 izolat ve referans kültürler üretilen antiserumlar ile indirekt floresan antikor boyama (IFAS) testi yapılarak da değerlendirilmiştir. Üretilen her iki antiserum 47 izolatın % 77'si ve *P.s. pv. pisi* ile pozitif sonuç vermiştir. Ayrıca antiserumlar *P. corrugata*, *P.s. pv. glycinea*, *P.s. pv. mori*, *P.s. pv. morsprunorum*, *P.s. pv. phasecolica*, *P. fluorescens*, *P.s. pv. maculicola* ve *P.s. pv. syringae* bakterileri ile pozitif sonuç vermiştir. As-2585 ile yapılan IFAS sonucunda *P.s. pv. tomato*'da pozitif bulunmuştur.

Çizelge 4.3. Antiserum Bz4 ve 2585'in iki sulandırma serisinde yapılan ELISA testi OD=405 nm absorbans değerleri ve IFAS sonuçları

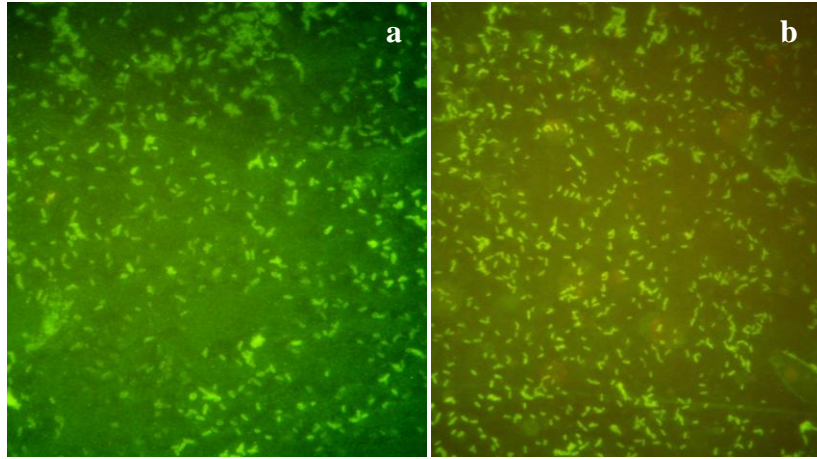
İzolatlar	Antiserum Bz4 1/500		Antiserum Bz4 1/1000		Antiserum 2585 1/500		Antiserum 2585 1/1000	
	ELISA*	IFAS	ELISA*	IFAS	ELISA*	IFAS	ELISA*	IFAS
Bz1	1,036	+	0,747	+	0,513	+	0,447	+
Bz2	0,986	+	0,746	+	0,575	+	0,516	+
Bz3	1,915	+	1,445	+	1,817	+	1,567	+
Bz4	1,608	+	1,120	+	1,538	+	1,298	+
Bz5/1	1,651	+	1,368	+	1,048	+	0,983	+
Bz5/2	2,243	+	1,687	+	2,085	+	1,799	+
Bz5/4	2,263	+	1,859	+	2,047	+	1,472	+
Bz6/1	2,192	+	1,604	+	1,943	+	1,729	+
Bz6/2	2,311	+	1,728	+	2,075	+	1,840	+
Bz7	1,417	+	0,868	+	1,321	+	1,117	+
Bz8/1	1,551	+	1,068	+	1,550	+	1,374	+
Bz8/2	1,655	+	1,094	+	1,609	+	1,420	+
Bz9	1,897	+	1,386	+	1,127	+	1,012	+
Bz10/1	1,974	+	1,494	+	1,991	+	1,693	+
Bz10/2	2,256	+	1,769	+	2,078	+	1,836	+
Bz11	1,952	+	1,239	+	1,904	+	1,635	+
Bz12/1	1,855	+	1,329	+	1,800	+	1,487	+
Bz12/2	1,655	+	1,058	+	1,517	+	1,291	+
Bz13	2,488	+	1,943	+	2,145	+	1,909	+
Bz14/1	2,373	+	1,720	+	2,071	+	1,814	+
Bz14/2	2,364	+	1,751	+	2,060	+	1,871	+
Bz14/3	2,227	+	1,624	+	1,989	+	1,823	+
Bz15	0,943	-	0,547	-	0,420	-	0,368	-
Bz16/1	0,940	-	0,689	-	0,385	-	0,345	-
Bz16/2	0,816	-	0,570	-	0,397	-	0,343	-
Bz17	1,789	+	1,336	+	1,707	+	1,417	+
Bz18	2,085	+	1,699	+	1,962	+	1,742	+
Bz19	1,948	+	1,442	+	1,865	+	1,580	+
Bz20	1,605	+	0,960	+	1,369	+	1,111	+
Bz21	1,868	+	1,327	+	1,729	+	1,011	+
Bz22	2,340	+	1,713	+	2,025	+	1,778	+
Bz23	1,049	-	0,676	-	0,438	-	0,392	-
Bz24/1	1,144	+	0,821	+	0,506	+	0,492	+
Bz24/2	0,994	-	0,616	-	0,360	-	0,316	-
Bz25	0,692	-	0,472	-	0,263	-	0,215	-
Bz26/1	0,822	-	0,581	-	0,312	-	0,266	-

Çizelge 4.3'ün devamı

Bz26/2	1,132	+	0,873	+	0,669	+	0,548	+
Bz27/1	1,200	+	0,914	+	0,642	+	0,534	+
Bz27/2	0,823	+	0,546	+	0,251	+	0,224	+
Bz28	0,786	-	0,682	-	0,355	-	0,311	-
Bz29	1,181	-	0,717	-	0,438	-	0,377	-
Bz30/1	1,016	+	0,678	+	0,566	+	0,486	+
Bz30/2	0,763	-	0,500	-	0,288	-	0,259	-
Bz31/1	0,865	-	0,611	-	0,351	-	0,310	-
Bz31/2	1,037	+	0,783	+	0,491	+	0,447	+
Bz32/1	1,979	+	1,471	+	1,795	+	1,607	+
Bz32/2	1,773	+	1,268	+	1,688	+	1,478	+
Ps.pisi**	2,099	+	2,032	+	2,114	+	1,930	+
Ps.syringae	1,215	+	0,819	+	0,544	+	0,443	+
P.viridiflava	0,548	-	0,332	-	0,365	-	0,292	-
Ps.lachrymans	1,429	-	1,073	-	0,748	-	0,686	-
P. corrugata	1,077	+	0,672	+	0,610	+	0,499	+
P. fluorescens	0,882	+	0,765	+	0,294	+	0,237	+
Ps. glycinea	1,497	+	1,018	+	1,365	+	1,151	+
Ps. mori	1,585	+	1,319	+	1,038	+	0,934	+
Ps. morsprunorum	1,554	+	1,125	+	0,895	+	0,730	+
Ps. phaseolicola	1,291	+	1,154	+	0,872	+	0,760	+
P. putida	0,558	-	0,436	-	0,320	-	0,245	-
Ps.maculicola	1,343	+	0,982	+	0,860	+	0,746	+
Ps.tomato	0,727	-	0,497	-	0,524	+	0,390	+
Xc.veicatoria	0,352	-	0,368	-	0,329	-	0,322	-
A.tumefaciens	0,213	-	0,199	-	0,143	-	0,130	-
Cm. michiganensis	0,191	-	0,177	-	0,141	-	0,124	-
Ec. carotovora	0,478	-	0,411	-	0,254	-	0,235	-
PBS (Blank)	0,216		0,185		0,140		0,127	

(*) 3 tekerrür ortalamasıdır ve $> 3,5 \times \text{Blank}$ =pozitif sonuç olarak alınmıştır (**)
referans izolatlar

Üretilen antiserum uygulanarak yapılan IFAS testinde pozitif sonuç veren bakteri hücreleri floresan mikroskobu altında yeşil ışıklar yapmıştır. Şekil 4.21'de floresan mikroskobu altında 100x büyütmede pozitif olarak kaydedilen Bz5/1 ve Bz8/1 izolatlarının bakteri hücreleri görülmektedir.



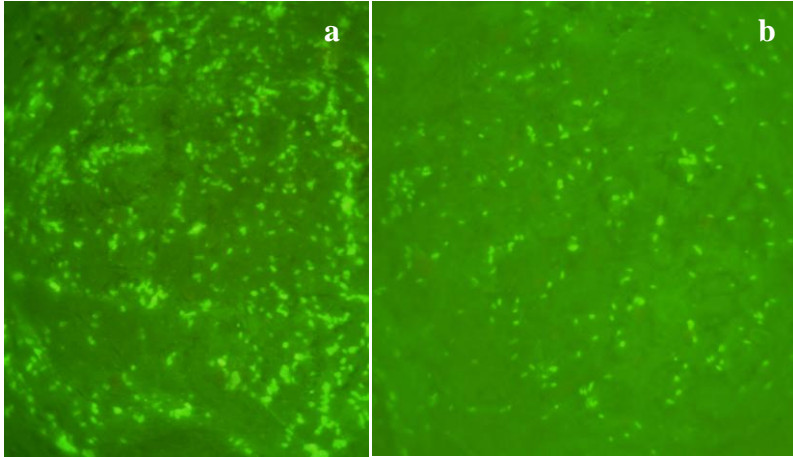
Şekil 4.21. Antiserumların 1/500 konsantrasyonunda (a) Bz5/1 ve (b) Bz8/1 bakterileri hücrelerinin floresan mikroskopta 100x objektif altında görünümü

ADGEN firmasına ait *P.s. pv. pisi*'e özgü ticari poliklonal antiserum ile 1/8000 sulandırmada tüm bakteriyel izolatların (5.10^6 hücre/ml) indirekt ELISA test sonuçları Çizelge 4.4'de verilmiştir. Çizelgedeki absorbans değerleri incelendiğinde 47 patojen izolatın % 100 pozitif sonuç verdiği saptanmıştır. Ancak ticari poliklonal antiserum 1/8000 seyreltmede referans izolatlardan *P.s. pv. lachrymans*, *P.s. pv. syringae* ve *P.s. pv. glycinea* ile çapraz reaksiyon göstermiştir. Patojenisite, biyokimyasal ve 16S rDNA sekans analizi sonucunda *P. viridiflava* olduğu belirlenen Bz9 izolatı ticari antiserum ile pozitif olarak değerlendirilmiş, referans *P. viridiflava* (Pv3) izolatı ise negatif sonuç vermiştir.

ADGEN firmasına ait *P.s. pv. pisi*'e özgü IF kiti ile yapılan IFAS testi izolatların % 85'inde ve *P.s. pv. pisi* ile pozitif sonuç vermiştir. *P.s. pv. corrugata*, *pv. glycinea*, *pv. phasecolica* ve *pv. syringae* bakterileri ile de pozitif sonuç elde edilmiştir. ELISA testinde pozitif olarak değerlendirilen Bz9 izolatı ise IFAS test sonucu negatif bulunmuştur. Şekil 4.22'de pozitif sonuç veren Bz22 ve Bz4 nolu bakteri hücrelerinin floresans mikroskobunda 100x büyütmedeki görünümü görülmektedir.

Kelvedon Wonder bitkisinde patojenisite çalışmasından sonra direkt bitkiden indirekt ELISA testi yaptığımızda ise % 85 oranında pozitif sonuç elde edilmiştir. Kelvedon Wonder bezelye bitkisinde tipik suda haşlanma belirtisi göstermesine

rağmen Bz1, Bz2, Bz15, Bz24/1, Bz25, Bz30/2 ve Bz31/1 izolatu ELISA testinde negatif olarak bulunmuş ayrıca *P.s. pv.syringae* çapraz reaksiyon oluşturmamıştır.



Şekil 4.22. Ticari IF kiti ile yapılan IFAS testlerinde floresan mikroskobunda 100x objektif altında (a) Bz22 ve (b) Bz4 bakteri hücrelerinin görünümü

Çizelge 4.4. Ticari *Psp* poliklonal antiserum ile yapılan ELISA ve IFAS test sonuçları

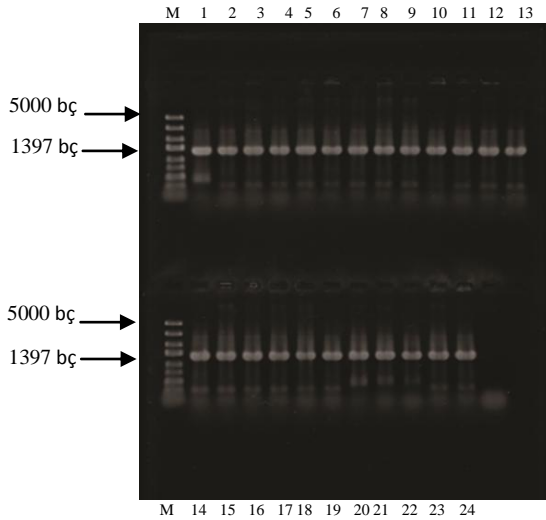
İzolatlar	<i>Psp</i> Antiserum			İzolatlar	<i>Psp</i> Antiserum		
	ELISA	IFAS	ELISA hast. bitki örnekleri		ELISA	IFAS	ELISA hast. bitki örnekleri
Bz1	0,918	-	0,433	Bz25	0,576	-	0,896
Bz2	0,693	-	0,342	Bz26/1	0,772	-	0,970
Bz3	2,321	+	2,428	Bz26/2	1,113	+	1,302
Bz4	2,233	+	2,270	Bz27/1	0,512	+	1,117
Bz5/1	1,118	+	1,948	Bz27/2	0,618	+	1,397
Bz5/2	2,534	+	2,338	Bz28	0,765	+	1,117
Bz5/4	2,754	+	3,000	Bz29	1,003	+	1,241
Bz6/1	2,796	+	3,000	Bz30/1	0,508	+	1,457
Bz6/2	2,462	+	3,000	Bz30/2	0,672	+	0,863
Bz7	1,650	+	2,795	Bz31/1	0,563	+	0,915
Bz8/1	1,291	+	2,387	Bz31/2	0,771	+	1,155
Bz8/2	1,502	+	2,645	Bz32/1	1,477	+	3,000
Bz9	1,378	-	1,570	Bz32/2	1,498	+	2,291
Bz10/1	1,618	+	3,000				
Bz10/2	2,747	+	2,613	Referans kültürler			
Bz11	1,765	+	3,000	<i>Ps.pisi</i> (NCP-2585)	2,123	+	3,000
Bz12/1	2,063	+	3,000	<i>Psp</i> (Pozitif kontrol)	2,796	+	
Bz12/2	1,509	+	2,112	<i>Ps.syringae</i>	0,512	+	0,345
Bz13	2,264	+	3,000	<i>P.viridiflava</i>	0,151	-	
Bz14/1	2,186	+	2,735	<i>Ps.lachrymans</i>	0,528	-	
Bz14/2	2,587	+	1,609	<i>P. corrugata</i>	0,219	+	
Bz14/3	2,205	+	2,960	<i>P. fluorescens</i>	0,193	-	
Bz15	0,634	+	0,903	<i>Ps. glycinea</i>	2,076	+	
Bz16/1	0,664	-	1,086	<i>Ps. mori</i>	0,397	-	
Bz16/2	0,794	+	0,948	<i>Ps. morsprunorum</i>	0,262	-	
Bz17	1,121	+	3,000	<i>Ps. phaselicola</i>	0,354	+	
Bz18	2,002	+	2,820	<i>P. putida</i>	0,205	-	
Bz19	2,419	+	3,000	<i>Ps. maculicola</i>	0,460	-	
Bz20	1,089	+	3,000	<i>Ps. tomato</i>	0,182	-	
Bz21	2,360	+	3,000	<i>Xc. veicatoria</i>	0,421	-	
Bz22	2,385	+	3,000	<i>A.tumefaciens</i>	0,126	-	
Bz23	1,098	+	3,000	<i>Cm. michiganensis</i>	0,204	-	
Bz24/1	1,355	+	0,715	<i>Ec. carotovora</i>	0,314	-	
Bz24/2	1,283	-	1,278	PBS (antijen yok)	0,144		0,262

(*) 2 tekrerrün ortalamasıdır ve > 3,5 x Blank=pozitif sonuç olarak alınmıştır

4.6. 16S rDNA Baz Dizileri Analizi

Evrensel primerler kullanılarak yaklaşık 1397 baz çiftlik (bç) kısmı 16S rDNA gen parçası PCR ile çoğaltılmış ve % 1'lik agaroz jel elektroforezde yürütülmüştür. Şekil 4.23'te bazı PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezdeki görüntüsü görülmektedir.

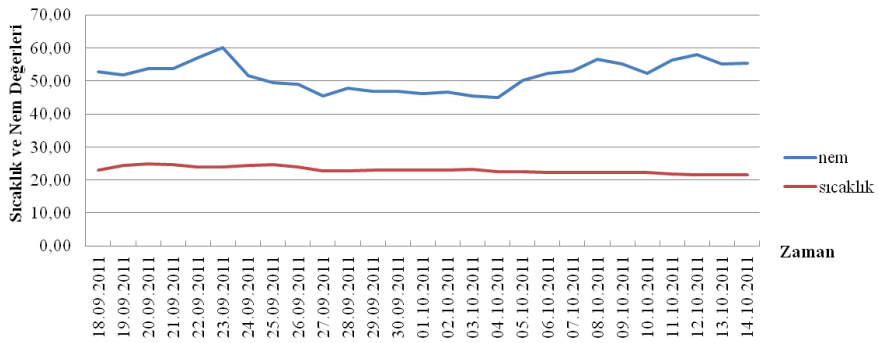
Sonuç olarak 46 izolat *P.s. pv. pisi* AB109218 ile % 99-100 oranında benzerlik gösterdiği ve bunların *P.s. pv. pisi* olduğu doğrulanmıştır. Kalan diğer bezelyede patojen izolat (Bz9) gen bankasındaki veri tabanındaki sonuçlara göre *P. viridiflava* AY604846, AY604847 ve AY604848 ile % 100 ve 1399 bç sekans uzunluğundaki GQ398128, GQ398129 ve GQ398130 (Martin-Sanz vd., 2010) ve referans izolatımız *Pv3* ile eşleştirildiğinde % 99 benzerlik indeksi ile *Pseudomonas viridiflava* olarak tanılanmıştır. Çalışmalarımızda bezelye köklerinden izole edilerek tüm patojenisite denemelerinde toprağa karıştırılarak uygulanan simbiyotik bakteri de % 100 benzerlik indeksi ile *Rhizobium leguminosarum* olarak tanılanmıştır.



Şekil 4.23. PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezdeki görünümü [sütun: M, 5000 bç Marker (Fermentas); 1, Bz1; 2, Bz2; 3, Bz3; 4, Bz4; 5, Bz5/1; 6, Bz5/2; 7, Bz5/4; 8, Bz6/1; 9, Bz6/2; 10, Bz7; 11, Bz8/1; 12, Bz8/2; 13, Bz9; 14, Bz10/1; 15, Bz10/2; 16, Bz11; 17, Bz12/1; 18, Bz12/2; 19, Bz13; 20, Bz14/1; 20, Bz14/2; 21, Bz14/3; 22, Bz15; 23, Bz16/1; 24, Bz16/2]

4.7. Irkların Belirlenmesi

Pseudomonas syringae pv. *pisi* olduğu belirlenen 46 izolatın Kelvedon Wonder, Early Onward, Belinda, Hurt' s Greenshaft, Partridge, Sleaford Triump, Vinco ve Fortune olmak üzere 8 bezelye çeşidi kullanılarak yürütülen fizyolojik ırk belirleme çalışmaları boyunca iklim odasında yürütülen bu çalışmanın sıcaklık ve nispi nem verileri Şekil 4.24'de verilmiştir. Şekilde görüleceği gibi ırk belirleme çalışmalarında sıcaklık değerleri 22-24°C arasında, nisbi nem değerleri de % 45-60 arasında seyretmiştir.



Şekil 4.24. Irkların belirlenmesi çalışmalarında iklim odasında kaydedilen sıcaklık ve nem verileri

Çeşit reaksiyon denemeleri sonrasında elde edilen bulgular Çizelge 4.5'te verilmiştir. Buna göre 20 izolat (Bz5/1, Bz5/2, Bz5/4, Bz6/2, Bz10/2, Bz11, Bz12/1, Bz13, Bz14/1, Bz14/2, Bz14/3, Bz18, Bz23, Bz24/2, Bz26/1, Bz27/2, Bz28, Bz29, Bz30/1, Bz31/1) Kelvedon Wonder, Belinda, Hurt' s Greenshaft ve Partridge bezelye çeşidi bitkilerinde tipik suda haşlanma belirtileri oluştururken, Early Onward, Sleaford Triump, Vinco ve Fortune çeşidi bezelyelerde belirti oluşturmamıştır. Bu izolatlar referans olarak kullanılan ve ırk 2 olarak bilinen *Psp* (NCPPB-2585) izolatu ile aynı grupta yer alarak Bevan vd. (1995)'deki veriler doğrultusunda (Çizelge 4.3) ırk 2 olarak belirlenmiştir. Şekil 4.25'de ırk 2 olduğu belirlenen *Psp* Bz5/4, Bz10/2, Bz18 ve Bz5/1 izolatlarının sırasıyla Kelvedon Wonder, Belinda, Hurt' s Greenshaft ve Partridge bezelye çeşidi bezelye bitkilerinin yaprak ve gövde üzerinde oluşturduğu belirtiler görülmektedir. Bz13 izolatu Sleaford Triump çeşidi, Bz14/2 izolatu Fortune çeşidi bezelye bitkilerinde sadece inokulasyon noktasında nekrotik alanlar oluşturmuştur (Şekil 4.26).

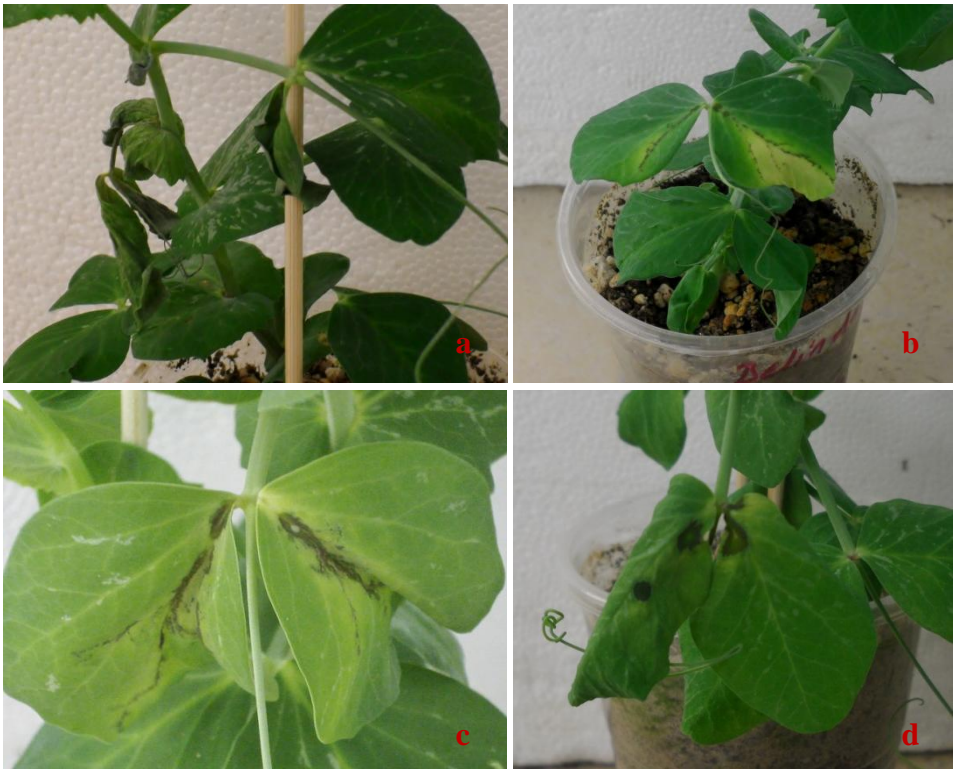


Şekil 4.25. Irk 2 olduğu belirlenen bazı izolatların 4 farklı bezelye çeşidi bitkisinin yaprak ve gövdede oluşturduğu belirtiler [(a) Kelvedon Wonder; Bz5/4, (b) Belinda; Bz10/2, (c) Hurt's Greenshaft; Bz18, (d) Partridge; Bz5/1]



Şekil 4.26. (a) Sleaford Triumph çeşidinin inokulasyon noktasında Bz13'ün, (b) Fortune çeşidinin inokulasyon noktasında Bz14/2'nin oluşturduğu nekrotik lezyonlar

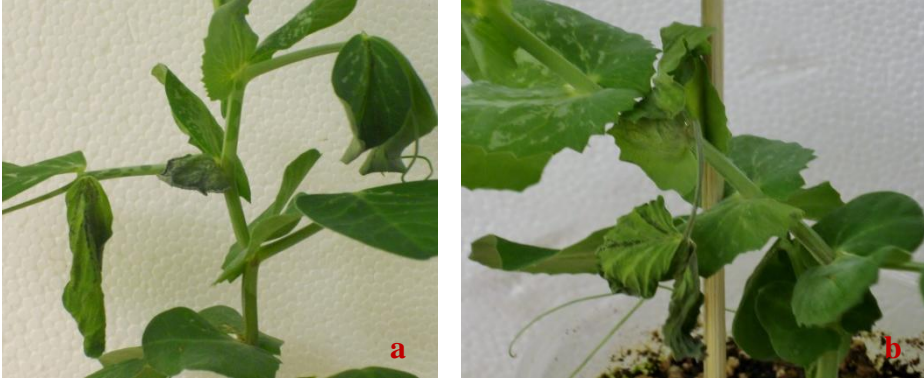
On üç izolat (Bz3, Bz4, Bz6/1, Bz7, Bz8/1, Bz8/2, Bz10/1, Bz12/2, Bz17, Bz19, Bz20, Bz21, Bz32/2) Kelvedon Wonder, Early Onward, Belinda ve Vinco bezelye çeşidi bitkilerinde tipik suda haşlanma belirtileri oluşturmuş fakat Hurt's Greenshaft, Partridge, Sleaford Triump ve Fortune çeşitlerinde belirti oluşturmamıştır. Bevan vd. (1995)'deki veriler doğrultusunda ırk 4 olarak belirlenmiştir. Şekil 4.27'de Bz3 izolatının sırasıyla Kelvedon Wonder, Belinda, Early Onward çeşidi ve Bz17 izolatının Vinco çeşidi bezelye bitkilerinin yapraklarında oluşturduğu belirtiler görülmektedir.



Şekil 4.27 Irk 4 olduğu belirlenen Bz3 izolatının (a) Kelvedon Wonder, (b) Belinda, (c) Early Onward ve Bz17'nin Vinco bezelye çeşidi bitkilerinin yapraklarındaki belirtileri

Sadece 2 izolat (Bz22, Bz32/1) Kelvedon Wonder ve Belinda çeşidi bezelye bitkilerinde suda haşlanma belirtileri oluşturmasına rağmen diğer 6 çeşit bezelye bitkisinde belirti oluşturmamıştır. Çizelge 4.5'de özetlenen veriler doğrultusunda bu izolatlar ırk 5 olarak belirlenmiştir.

Testlenen 46 *Psp* izolatından 11 tanesinin (Bz1, Bz2, Bz15, Bz16/1, Bz16/2, Bz24/1, Bz25, Bz26/2, Bz27/1, Bz30/2, Bz31/2) çeşitlerde oluşturduğu belirtiler ve Çizelge 4.5'deki verilere göre ırk ayrımı yapılamamıştır. Bu izolatlardan 10 tanesi Kelvedon Wonder ve Hurt's Greenshaft çeşidi bezelye bitkilerinde suda haşlanma belirtisi oluştururken diğer çeşitlerde hiçbir belirti oluşumu görülmemiştir. Bz16/1 nolu izolat ise Kelvedon Wonder, Hurt's Greenshaft ve Vinco çeşidi bezelye bitkilerinde suda haşlanma belirtisi oluşturmuş fakat diğer çeşitlerde belirti oluşumu görülmemiştir. Şekil 4.28'de Bz25 ve Bz1 izolatlarının sırasıyla Kelvedon Wonder ve Hurt's Greenshaft çeşidi bezelye bitkilerinde oluşturduğu belirtiler görülmektedir. Şekil 4.29'da ise Bz1 izolatının Early Onward bezelye çeşidi bitkisinin inokulasyon noktasında oluşturduğu nekrotik alan görülmektedir.



Şekil 4.28. Bz25 ve Bz1'in sırasıyla (a) Kelvedon Wonder ve (b) Hurt's Greenshaft bezelye çeşidi bitkilerinde oluşturduğu belirtiler



Şekil 4.29. Bz1 izolatının Early Onward çeşidi bezelye bitkisinin inokulasyon noktasında oluşturduğu nekrotik alan

Çizelge 4.5. İzolatların çeşitlerle olan reaksiyonları

İzolatlar	İrk	Kelvedon Wonder	Early Onward	Belinda	Hurt' s Greenshaft	Partridge	Sleaford Triumph	Vinco	Fortune
Bz5/1, Bz5/2, Bz5/4, Bz6/2, Bz10/2, Bz11, Bz12/1, Bz13, Bz14/1, Bz14/2, Bz14/3, Bz18, Bz23, Bz24/2, Bz26/1, Bz27/2, Bz28, Bz29, Bz30/1, Bz31/1	2	+	-	+	+	+	-	-	-
Bz3, Bz4, Bz6/1, Bz7, Bz8/1, Bz8/2, Bz10/1, Bz12/2, Bz17, Bz19, Bz20, Bz21, Bz32/2	4	+	+	+	-	-	-	+	-
Bz22, Bz32/1	5	+	-	+	-	-	-	-	-
Bz1, Bz2, Bz15, Bz16/2, Bz24/1, Bz25, Bz26/2, Bz27/1, Bz30/2, Bz31/2	?	+	-	-	+	-	-	-	-
Bz16/1	?	+	-	-	+	-	-	+	-
<i>P.s. pv. pisi</i> (NCPBP-2585)	2	+	-	+	+	+	-	-	-

(+) duyarlı, (-)aşırı duyarlılık reaksiyonu, (?) tanımlanmamış

İzmir ilinden elde ettiğimiz 26 *Psp* izolatından % 46,2'si ırk 2, % 34,6'sı ırk 4 olduğu saptanmış ancak % 19,2'sinin ırkları belirlenememiştir. Ayrıca 3 tarlada hem ırk 2'nin hemde ırk 4'ün varlığı belirlenmiştir. Aydın ilinden elde ettiğimiz 20 izolattan % 40'ı ırk 2, % 20'si ırk 4 ve % 10'unun ırk 5 olduğu saptanmış ancak % 30'unun ırkı belirlenememiştir. 5 tarladan alınan farklı bitkilerden izole etmiş olduğumuz izolatların bir kısmının (5) ırk 2 olduğu tanımlanırken diğerlerinin ırkları belirlenememiş ancak 1 tarlada hem ırk 4'un hem de ırk 5'in varlığı saptanmıştır.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bezelye Bakteriyel Yanıklık hastalığına neden olan *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* Dünya’da bezelye üretilen pek çok ülkede mevcut olan Akdeniz Bitki Koruma Teşkilatı (EPPO) karantina listesinde, ülkemizde 2010 yılı itibariyle karantina A1 listesinde bulunan tohum kaynaklı önemli bir hastalık etmenidir (EPPO, 2011). Etmenin ülkemizdeki varlığı ilk defa 2009 yılında belirlenmiş ve hastalığın İzmir ili Torbalı ve Ödemiş ilçesinde görüldüğü bildirilmiştir (Benlioğlu vd., 2010). Ön çalışmalarımız sonrasında varlığı saptanan hastalık ile ilgili yapılan survey çalışmaları, patojenin İzmir ilinde 40 örnekleme noktasından 17’sinde, Aydın ilinde 15 örnekleme noktasından 6’sında mevcut olduğunu göstermiştir. Özellikle erken ekilen bezelyelerde (Çizelge 4.1), soğuk zararı ve üst üste bezelye ekilen tarlalarda (Şekil 4.6) hastalığın daha tahripkar olduğu gözlenmiştir. Çevre koşullarının Bakteriyel Yanıklık hastalığının epidemiyolojisindeki rolü iyi bilinmektedir (Elvira-Recuenco vd., 2003). Etmenin bitkiye girişinde don ve dolu zararının önemli rol oynadığı (Roberts vd., 1995) ve bu nedenle soğuk zararının bezelye bitkilerinin *Psp*’e karşı duyarlılığını artırdığı (Boelema, 1972; Roberts, 1992; Mansfield vd., 1997) ve don sonrası hastalığın çok şiddetli tahribat yaptığı (Lawyer ve Chun, 2001; Hollaway, 2007) rapor edilmiştir. Kışlık ve yazlık bezelye çeşitleri ile yapılan tarla denemelerinde özellikle kışın ekilen bezelyelerde hem kışlık hem de yazlık çeşitlerde hastalığın çok daha şiddetli görüldüğü (Mansfield vd., 1997), soğuğa tolerant bezelye çeşitlerinde hastalık şiddetinin etmene karşı dayanıklılık genleri taşımayanlarda bile daha az oranda olduğu bildirilmiştir (Martin-Sanz vd., 2011). Hastalığın oluşumunda diğer bir faktör de yüksek toprak nemi olup patojenin tohumdan fideye taşınmasında önemli rol oynadığı saptanmıştır (Roberts, 1992; Roberts vd., 1996).

Çalışmamızda LOPAT testleri sonrası 61 izolattan 47 tanesi KB besiyerinde UV ışık altında mavimsi floresan pigment oluşturmuştur. Patojenisite testi sonrası bezelyelerde (Geneva, Bolero ve Kelvedon Wonder) tipik suda haşlanma şeklinde Bakteriyel Yanıklık hastalığı belirtileri gösteren 46 izolat *Psp* olarak tanılanmış ve King B besiyerinde floresan pigment oluşturduğu görülmüştür. Grondeau vd. (1992) *Psp* izolatlarının % 93’ünün King B besi ortamında UV ışık altında floresans oluşturduğunu, Suzuki vd. (2003) gruplara ayırdıkları *Psp* izolatlarından *Ppi* (A) grubu içerisinde yer alan izolatlar floresans oluşturmazken *Ppi* (B)

grubunun floresans oluşturduğunu, Martin-Sanz (2011) *Psp* izolatlarının floresans oluşturma açısından farklı bulduklarını belirtmişlerdir.

46 izolatın levan oluşumu pozitif, oksidaz, patatestte yumuşak çürüklük testi, arginin hidrolizi negatif ve tütünde aşırı duyarlılık reaksiyonu pozitif olarak bulunmuştur. LOPAT testi (Lelliott vd., 1966) bitki patojeni *Pseudomonas*ların ön tanılanmasında yaygın olarak kullanılan önemli testlerden biridir. Bezelye bakteriyel patojenlerinden *Psp*, *Pss* ve *P. viridiflava*'nın ön tanılanmasında özellikle diğer *Pseudomonas*lardan ayırımında pek çok araştırmacı tarafından ilk uygulanan testlerden biri olmuştur (Grondeau vd. 1992, Suzuki vd., 2003; Martin-Sanz vd., 2011). Çalışmamızda 46 izolat LOPAT Ia grubu (+, -, -, -, +) içerisinde yer aldığı belirlenmiştir. LOPAT testi ile izolatların *P. viridiflava*'dan farklı (-, -, +, -, +) olduğu belirlenirken *Psp* ve *Pss*'nin ayırımı patojenisite testleri ve biyokimyasal reaksiyonlar ile yapılabilmektedir.

Richardson ve Hollaway (2007) bezelyelerde tarla koşullarında *Psp* ve *Pss*'nin belirtilerine bakılarak ayırt edilmesinin güç olduğunu ifade etmişlerdir. Grünwald vd. (2004) Bezelye Kahverengi Leke etmeni (*Pss*) ve Bakteriyel Yanıklık etmeninin (*Psp*) oluşturduğu belirtilerin benzer olduğunu ancak en önemli farkın genel olarak *Psp* tipik suda haşlanma belirtisi oluştururken *Pss* kahverengileşme, nekrotik ve çökük lezyonlar oluşturduğunu belirtmiştir. Çalışmamızda bilinen *Psp* (NCPPB-2585) ve *Pss* (NCPPB-281) izolatını değerlendirdiğimizde; *Psp* izolatının tipik suda haşlanma belirtileri oluşturduğu görülmüştür. Ancak *Pss* Grünwald vd. (2004)'nin belirttiği gibi suda haşlanma belirtisi göstermediği inokulasyon noktasında çökük kahverengileşme ve yapraklarda önce (inokulasyondan 10 gün sonra) kloroz ve daha sonra (inokulasyondan 14 gün sonra) yapraklarda kurumalar oluşturduğu görülmüştür. Son yıllarda yapılan bir çalışmada da *Pss* izolatlarının bezelye bitkilerinin (Gracia çeşidi) gövde ve yapraklarda kahverengi nekrotik lezyon oluşturduğu, *Psp* izolatlarının ise suda haşlanma belirtilere neden olduğu bildirilmiştir (Martin-Sanz vd., 2011). İki farklı bezelye çeşidi (Geneva ve Bolero) ve tüm *Psp* ırklarına duyarlı olduğu bilinen Kelvedon Wonder bezelye bitkilerinde yapmış olduğumuz 46 *Psp* izolatının patojenisite sonuçları yukarıda belirtilen bulguları doğrulamaktadır.

Çalışmamızda bezelye bitkilerinde patojenisite testlerinde gövde inokulasyon yöntemi kullanılmıştır. Elvira-Recuenco vd. (2003) gövde dayanıklılık genlerinin

Psp ırk genleri ile doğrudan ilişkili olduğunu ancak yaprak ve kapsül inokulasyon testlerinde reaksiyonların farklılık gösterebildiğini belirtmiştir. Bashan ve Kenneth (1983) patojenisite testleri, belirtilerin görünüşü ve bakterinin fiziksel karakterizasyonlarını dikkate alarak ilk kez İsrail’de *Psp*’nin bulunduğunu bildirmişlerdir. Patojenisite testlerinde bakteri süspansiyonları 10^5 hücre/ml olacak şekilde 2 gerçek yapraklı dönemde Scout bezelye çeşidinin yapraklarına sprey yoluyla inokule etmiş ve tarlada gördükleri belirtilere benzer belirtiler görmüşlerdir. Suzuki vd. (2003) çalışmamıza benzer şekilde elde ettikleri izolatların bezelye bitkilerinde suda haşlanma belirtileri oluşturduklarını bildirmişlerdir. Araştırmacılar *Psp*’nin Japonya’da bezelyelerde en uç yapraklarda renk ağarması (beyazlaşma) şeklinde belirtilere neden olduğunu bildirmiş ve hastalığı White Top (WT) olarak adlandırmışlardır. Çalışmalarında *Psp* izolatlarını A, B ve WT olarak gruplandırmışlar ve WT grubu içerisinde yer alan izolatların başlangıçta suda haşlanma şeklinde tipik *Psp* belirtileri oluşturduğu ancak inokulasyondan 14 gün sonra uç sürgünlerde beyazlaşmalara neden olduğunu gözlemlemişlerdir. Gerek survey gerekse patojenisite çalışmalarımızda bitkilerin uç yapraklarında beyazlaşma şeklinde bir belirti görülmemiştir.

Olgunlaşmamış limon meyvelerinde yapılan patojenisite çalışmasında tüm izolatlar ve *Psp* (NCPPB-2585)’den negatif sonuç elde edilmiştir. Sadece bilinen *Pss* (NCPPB-281) limon meyvesine inokulasyon noktasında sarı hale ile çevrili çökük nekrotik lezyon oluşturmuştur (Şekil 4.11). Benzer şekilde Mazarei ve Kerr (1990) ve Martin-Sanz vd., (2011) limon meyvelerinde *Pss* izolatlarının nekrotik lezyon oluştururken *Psp* izolatlarının oluşturmadığını belirtmişlerdir. Olgunlaşmamış limon meyvelerinde yapılan bu test *Pss* ve *Psp* izolatlarının ayrımı için kullanılabilecek pratik yöntemlerden biri olduğu bilinmektedir (Mazarei ve Kerr, 1990).

Psp’nin tüm ırklarına duyarlı (Bevan vd., 1995) Kelvedon Wonder çeşidi bezelye bitkilerinde yürütülen virülens denemelerinde 46 *Psp* izolatlarından % 8,7’si (4 adet) sadece inokulasyon noktasından başlayarak ilerleyen suda haşlanma belirtisi, % 50’si (23 adet) gövde ve yaprakların % 25’inde suda haşlanma belirtileri oluşturmuştur. Kalanların % 30,4’ü (14 adet) gövde ve yaprakların % 50’sinde, % 10,9’u da (5 adet) yaprakların yaklaşık tamamında suda haşlanma belirtisi ve kurumalara neden olduğu görülmüştür (Çizelge 4.1). *Psp* izolatlarının farklı ırklarının bezelye çeşitleri üzerinde farklı virülens değerlerine sahip olduğu ve bu

dayanıklılığın gövde, yaprak ve kapsül inokulasyonlarında farklılık gösterdiği belirtilmiştir (Elvira-Recuenco vd., 2003). Mevcut kaynaklar incelendiğinde duyarlı bezelye çeşidi üzerinde izolatların virülens farklılıklarıyla ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Duyarlı Kelvedon Wonder bitkisinde yapmış olduğumuz virülens denemelerinde *Pss* (NCPFB-281) izolatının herhangi bir belirti oluşturmadığı görülmüştür. Benzer şekilde Martin-Sanz vd. (2011) *Pss*'nin Kelvedon Wonder'da sadece inokulasyon noktasında kahvrenge nekrozla sınırlı bir enfeksiyon oluşturduğunu ve bu çeşidin *Pss*'e dayanıklı olabileceğini ifade etmişlerdir. Lawyer ve Chun (2001) Elf ve Champion from England bezelye çeşitlerinin bu etmene karşı dayanıklı olduğunu belirtmişlerdir.

Bakterilerin biyokimyasal testleri içeren fenotipik özelliklerine bakılarak sınıflandırılması Bergey's Manual'ın 1923 yılındaki yayınından günümüze değin kullanılan yöntemlerden biri olmuştur. Halen *Psp*'nin tanılanması ile ilgili yayınlarda bu testlere yer verilmektedir. Bakterilerin tanılanmasında günümüzde bu testlere özgü API (Biomerieux-Fransa), BIOLOG (ABD) kitler geliştirilmiştir. Çalışmalarımızda API kitlerinden 32 testi içeren şeritler kullanılmış ve test sonuçları şerit okuyucu bir alet ile değerlendirilmiştir. API test kitleri kütüphanesinde bitki patojeni bakterilerin bulunmaması nedeniyle elde edilen sonuçlar sadece pozitif ve negatif şeklinde teze yansıtılmıştır. Ayrıca laboratuarda yapmış olduğumuz *Psp* ile ilgili yayınlarda ve Bergey's Manual'de yer alan ayırıcı test sonuçları Çizelge 5.1'de özetlenmiştir. Bu testler dikkate alınarak yapılan küme analizlerinde *Pss*'nin ve *Pv*'nin ayrı bir grup oluşturduğu, *Psp* izolatlarının ise kendi içinde 7 grup oluşturduğu görülmüştür. Bu gruplar ile gerek virülenslik gerekse *Psp* ırkları açısından herhangi bir ilişki saptanmamıştır. Çizelge 5.1'de açık olarak görüleceği gibi testlerin büyük çoğunluğu bu konuda tanımlamada kullanılmış olan sonuçlar ile aynı paraleldedir (Grondeau vd., 1992; Suzuki vd., 2003; Bashan ve Kenneth, 1983; Palleroni, 2005). Ancak jelatin sıvılaşması (% 57.8+), eskulin hidrolizi (% 54.3-), D-sorbitol (% 63), laktik asit (% 58.7-) ve homoserin (% 67.3+) kullanımı açısından farklılıklar gözlenmiştir. Son yıllarda yapılan bir çalışmada Suzuki vd. (2003) *Psp* izolalarını (WT) dışında jelatin sıvılaşması, eskulin hidrolizi, eritritol ve laktik asit kullanımı açısından iki gruba ayırmış, homoserin kullanmayan üçüncü grubu (C) ise *Pseudomonas syringae* olarak belirtmiştir.

Çizelge 5.1. Elde edilen *Psp* izolatlarının test sonuçları ile diğer araştırmacıların sonuçlarının karşılaştırılması

Biyokimyasal Testler	İzolatlarımız*	Grondeau vd. (1992)	Suzuki vd. (2003)			Bashan ve Kenneth (1983)	Braun-Kiewnick ve Sands (2001)	Palleroni (2005)
			A	B	C			
Glikoz O/F	O	% 100 O	O	O	O			
Floresan pigment	+	% 93 +	-	+	+			
Jelatin sivilaşması	% 58,7 +		+	-	+	+		
Eskulin hidrolizi	% 54,3 -	% 86 -	+	-	+			
Sak. ind. mad. ol.	% 100 +	% 100 +	+	+	+	+		
Nitrat indirgenmesi	% 100 -		-	-	-	-		
Buz çek aktivitesi.	% 76 +	% 97 +					+	
L-arabinoz	% 100 +					-		
D-ksiloz	% 95,6 +		+	+				
D-maltoz	% 78,2 -		-	-				
Trehaloz	% 78,2 -		-	-	-	-		
D-mannitol	% 95,6 +	% 100 +	+	+		+	+	+
D-sorbitol	% 63 +	% 100 +	+	+	+	+	+	+
Eritritol	% 97,6 -	% 70 +	+	-	+		d	d
İnositol	% 100 +	% 100 +	+	+	+	+	+	+
Laktik asit	% 58,7 -	% 85 -	+	-	+	-		d
L-tartarik	% 97,8 -	% 91 -	-	-	-	-		-
α-metil-glukozit	% 100 -	% 100 -						
Betain	% 100 +		+	-	+		+	+
L-alanin	% 100 +		-	-	-			
Homoserin	% 67,3 +	% 75 +	+	+	-	+	+	+

(+) pozitif, (-) negatif (d) değişken [(A) *Psp*, (B) *Psp* (C) *Ps* (Suzuki vd., 2003)]

*Sonuçlar en az 3 kez yinelenildikten sonra elde edilen sonuçlardır.

Serolojik testlerden ELISA ve IFAS'ta ısı uygulanarak ürettiğimiz antiserumlar ile *Psp* izolatlarından % 74-98 oranında pozitif sonuç elde edilmiştir. Taylor (1972) serolojik testlerde ısı uygulanmayan antijen ile üretilen antiserumdan % 26 çapraz reaksiyon alırken, ısı uygulananlar da % 12 çapraz reaksiyon verdiğini bildirmiştir. Araştırmacı ısı uygulamasının *Pss* ile çapraz reaksiyonu ortadan kaldırdığını ifade etmiştir. Çalışmamızda her iki antiserum *Pseudomonas syringae* patovarlarından *syringae*, *glycinea*, *phaseolicola*, *mori*, *morsprunorum*, *maculicola* ve

Pseudomonas corrugata ile çapraz reaksiyon göstermiştir. Samson ve Saunier (1987) 12 *Pseudomonas syringae* patovaryna karşı ürettiği 14 antiserum ile ilgili bakterileri karşılıklı testlemiş ve sonuç olarak bu bakterilerin 6 serogruba toplandığını (TAB, LAC, PHA, MOP, APT-PIS, PER-TOM-SAV) bildirmiştir. Bu çalışmaya göre; *P.s. pv. pisi*, *P.s. pv. aptata*, *P.s. pv. glycinea* bakterileri APT-PIS grubu içinde yer almaktadır. Grondeau vd. (1995) yapmış olduğu çalışmada 2673 *Psp* izolatının çift yönlü difüzyon testi ile serogrublarını belirlemiştir. Çalışmada kullanılan izolatların % 88.5'inin APT-PIS, % 11.4'ünün HEL2 (*P.s. pv. helianthi*) ve % 0.1'inin RIB (*P.s. pv. ribicola* ve *P.s. pv. pisi*) serogrubu altında toplandığını saptamışlardır.

Pseudomonas syringae pv. *pisi*'e özgü poliklonal antiserum içeren ticari kit (ADGEN) ile ELISA testi uygulandığında elde ettiğimiz *Psp* izolatlarından % 100, IFAS ile % 85 pozitif sonuç elde edilmiştir. Ancak ticari antiserum *Pss* ve *P.s. pv. lachrymans* ile çapraz reaksiyon göstermiştir. Ticari kit ile hastalıklı bitkilerden yapılan ELISA testinde ise % 85 oranında pozitif sonuç elde ancak *Pss* ile inokule edilen bitkilerden negatif sonuç alınmıştır. Bu *Pss*'nin Kelvedon Wonder çeşidi bezelye bitkisinde patojen olmadığı saptandığı için bakterinin ELISA testi tespit sınırına (5×10^6 hücre/ml, Benlioğlu ve Özakman, 1993) ulaşacak düzeyde kolonize olmamasından kaynaklanabilir. Grondeau vd. (1995) *Psp*'e özgü ticari monoklonal antiserum (Proseed kit) kullanarak 65 *Psp* izolatı ile ELISA testi yapmışlardır. 65 izolattan 62'sinden pozitif sonuç elde etmişler ve bu izolatların çift yönlü difüzyon testi ile APT-PIS ve HEL2 serogrubu içerisinde yer aldığını ifade etmişlerdir. Diğer izolatlar RIB grubu içerisinde yer aldığını ve 2'sinin negatif, 1 tanesinin ise değişken sonuç verdiğini belirtmişlerdir.

Çalışmamızda KB besiyerinde UV ışık altın floresans veren bir izolat (Bz9) Lelliott vd., (1966), ve Braun-Kiewnick ve Sands (2001)'da belirtildiği gibi LOPAT testlerinde (-, -, +, -, +) sonuç vermiş ve *Pseudomonas viridiflava* olarak tanılanmıştır. İzmir ilinin Torbalı ilçesinde Carina çeşidi bezelye ekilmiş 20 da'lık tarladan izole edilmiş olup yapılan sürveylerde bu tarlada bitkilerde genel olarak seyrelme ve yer yer çürümeler olduğu not alınmıştır. Bolero ve Geneva çeşidi bezelye bitkilerinde yapmış olduğumuz patojenisite çalışmalarında diğer 46 izolattan farklı olarak inokulasyon noktasında çökük kahvrengeleşme şeklinde belirtiler görülmüş ve inokulasyondan 10 gün sonra sadece 2. ve 3. boğumdaki yapraklarda kurumalara neden olduğu dikkati çekmiştir. Son yıllarda İspanya'da

bezelye ekim alanlarında Messire çeşidi bezelyelerde Yaprak ve Gövde yanıklığı adı verilen bakteriyel hastalığın varlığı rapor edilmiş ve etmenin *Pseudomonas viridiflava* olduğu belirtilmiştir (Martin-Sanz vd., 2010). Araştırmacılar Messire çeşidi bezelye bitkileri ile yaptığı patojenisite testlerinde, tarlalarda gözlemledikleri çürüme ve çökme şeklindeki belirtilerin inokulasyondan 10 gün sonra oluştuğunu ve kontrol amacıyla kullandıkları *Psp* ve *Pss* izolatlarından farklı belirtiler meydana geldiğini belirtmişlerdir.

Çalışmalarımızda tek bir tarladan izole edilen Bz9 izolatı biyokimyasal özellikler açısından Martin-Sanz vd. (2010) ve Bergey's Manual (Palleroni, 2005)'de yer alan fenotipik özellikler açısından büyük oranda *P. viridiflava* ile eşdeğer sonuçlar vermiştir (Çizelge 5.2). Ancak jelatin sınıvlaşması, eritritol kullanımı ve domatesten izole edilmiş *Pv3* referans izolatı ile homoserin kullanımı açısından farklı bulunmuştur. Bu konuda tek bir izolata ait sonuçlar verildiği için fenotipik özellikler açısından daha çok izolat ile testlerin yapılarak karşılaştırılması daha uygun olacaktır.

Bz9 nolu izolat ürettiğimiz olduğumuz iki antiserum ve ticari *Psp*'e özgü poliklonal antiserum kullanılarak yapılan ELISA testlerinde sonuçlar pozitif bulunmuş fakat IFAS testinde üretmiş olduğumuz antiserum kullanıldığında sonuç pozitif, ticari antiserum kullanıldığında sonuç negatif olarak kaydedilmiştir. Buna karşın domatesten izole edilen ve referans izolat olarak kullandığımız *P. viridiflava* (*Pv3*) izolatı tüm serolojik çalışmalarda negatif olarak bulunmuştur. Grondeau vd. (1995) bezelyeden izole edilen 7 *P. viridiflava* izolatını *Psp* özgü ticari ELISA kiti kullanarak testlemiştir. ELISA testlerinde 7 izolattan 2'sinden pozitif, 5'inin ise negatif sonuç elde etmişlerdir.

Çizelge 5.2. *Pseudomonas viridiflava* izolatının referans ve diğer araştırmacıların biyokimyasal test sonuçlarının karşılaştırılması

Biyokimyasal Testler	Bz9*	Pv3*	Martin-Sanz vd. (2010)	Palleroni (2005)
LOPAT	--++	--++	--++	--++
Glikoz O/F	O	O	O	O
Jelatin Sıvılaşması	-	+	+	+
Eskulin Hid.	+	-	+	
Buz çek. akt.	-	+		
L-arabinoz	+	+	+	+d
D-galaktoz	+	+	+	+
D-ksiloz	+	+	+	+d
D-mannitol	+	+	+	+
D-riboz	+		+	+d
D-sorbitol	+	+	+	+
Eritritol	-	+	+	+
Gliserol	+	+	+	+
m-inositol	+	+	+	+
Betain	+	+		+
Homoserin	+	-		
L-alanin	+			+d
L-histidin	+			+
L-proline	+			+
L-serin	+			+
3-hidroksi bütirik asit	+			+
Laktik asit	+	+		+
Malonik asit	+	+		+d
Süksinik asit	+	+		+
Trisodyum citrate	+			+
Potasyum. 2-ketoglukonat	+			+

(+) pozitif, (-) negatif, (nt) testlenmedi (d) değişken sonuç

*Sonuçlar en az 3 kez yinelenindikten sonra elde edilen sonuçlardır.

Moleküler biyolojideki gelişmelere paralel olarak prokaryotik organizmalarda ribozomal RNA'ya ait 16S olarak adlandırılan küçük ünite ile ilgili genin baz dizileri sınıflandırma ve tanılamada özgün ve güvenilir bir araç olarak kullanılmaktadır (Lane vd., 1985). Bu amaçla elde etmiş olduğumuz izolatlar 16S rDNA özgü evrensel primer çifti kullanılarak PCR ile çoğaltılmış ve Gen bankasında *Psp'* ait 16S rDNA baz dizileri (erişim AB109218, Suzuki vd., 2003) ile karşılaştırılarak % 99-100 oranında benzerlik indeksi ile 46 izolatın *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* olduğu doğrulanmıştır. Aynı şekilde Bz9 izolatı

gen bankasındaki veri tabanındaki *P. viridiflava* 16S rDNA baz dizileri (erişim AY604846, AY604847 ve AY604848) ile % 100, bezelyelerden izole edilen *P. viridiflava* (erişim GQ398128, GQ398129 ve GQ398130, Martin-Sanz vd., 2010) 16S rDNA baz dizileri (1399 bç) ile % 99 benzerlik göstererek *P. viridiflava* olduğu doğrulanmıştır.

Çalışmamızda *Psp* olduğu belirlenen 46 izolatın Bevan vd. (1995) tarafından belirtilen 8 bezelye çeşidindeki reaksiyonlarına bakılarak ırkları belirlenmiştir. Elde edilen izolatlardan 20'sinin ırk 2, 13'ünün ırk 4, 2'sinin ırk 5 olduğu belirlenmiştir. Fakat 11 izolatın ırkları bu çeşitlerle belirlenememiştir. Daha önceki çalışmalara baktığımızda Taylor vd. (1989) çeşitli ülkelerden toplanan 146 izolatın % 74.6'sının ırk 2, % 10.9'unun ırk 4 ve % 7.5'inin ırk 6 ayrıca olduğunu sadece bir izolatta ırk 3 ve 5'e rastladıklarını belirtmişlerdir. Schmit (1991) Fransa'da yapmış olduğu çalışmada 50 *Psp* izolatının % 52'sinin ırk 2, % 36'sının ırk 6 ve % 12'sinin ırk 4 olduğunu saptamıştır. Ayrıca araştırmacı ilkbahar çeşitlerinde yaygın olarak ırk 2, kışlık çeşitlerde ise ırk 6'nın olduğunu belirlemiştir. Reeves vd. (1996) İngiltere'de 1987-1994 yılları arasında toplanan *Psp* ile enfekteli bezelye tohumlarında ırk belirlemesi yapmışlardır. Çalışmada en fazla ırk 2'inin olduğunu ırk 1, 3, 4 ve 5'in ise daha az oranlarda saptandığını belirtmişlerdir. Hollaway ve Bretag (1995) Avusturalya'da yapmış oldukları çalışmada 65 izolatın % 64'ünün ırk 3, % 31'inin ırk 6 ve % 5'inin ırk 2 olduğunu belirlemişlerdir. Elvira-Recuenco ve Taylor (2001) İspanya'da yapmış oldukları çalışmada 16 izolatın 8'inin ırk 4, 8'inin ise ırk 6 olduğunu saptamışlardır. Martin-Sanz vd. (2011) İspanya'da bezelye üretim alanlarından izole ettikleri 110 *Psp* izolatın % 59.1'inin ırk 4, % 20'sinin ırk 2, % 11.8'ini ırk 6, % 3.6'sının ırk 5 ve % 0.9'unun ırk 3 olarak bulunmuştur. Araştırmacılar 5 izolatın bizim çalışmamızda olduğu gibi belirtilen çeşitlerle ırklarının saptanamadığını bildirmiş ve ırk 8'inde varlığına değinmişlerdir. Hollaway vd. (2007) *Psp* ırklarının dağılımının belirli bir bölge ya da ülkede en çok yetiştirilen bezelye çeşitlerinde bulunan direnç genlerinin varlığı ile ilişkili olduğunu ifade etmiştir. Çalışmamızda bakterileri izole ettiğimiz çeşitler göz önünde bulundurulduğunda Geneva çeşidi bezelye bitkilerinden ırk 2, Early Sweet çeşitlerinden ise ırk 4 olan *Psp* izolatları elde edilmiştir fakat diğer çeşitler için bu ayırım yapılamamaktadır. Ayrıca ırkları belirlenen izolatlar göz önünde bulundurulduğunda aynı tarlalarda farklı ırklar bir arada olduğu dikkati çekmiştir. Torbalı'da üç tarlada hem ırk 2 hemde ırk 4, Buharkent'te ise bir tarlada hem ırk 4 hemde ırk 5 olduğu belirlenmiştir.

Bu çalışma sonunda;

- Aydın ve İzmir ili bezelye ekim alanlarında *Pseudomonas syringae* pv *pisi*'nin neden olduğu Bakteriyel Yanıklık hastalığının % 41,8 oranında yaygın olarak görüldüğü,
- *Psp* fizyolojik ırklarından ırk 2 daha yaygın olarak bulunmakla birlikte yaygınlık sırasına göre ırk 4 ve ırk 5'in varlığının ülkemizde ilk defa belirlendiği, ancak mevcut yöntemler ile saptanamayan ırkların da bulunduğu
- Ülkemizde bezelyelerde *Pseudomonas viridiflava*'nın bakteriyel hastalığa neden olduğu ilk kez ortaya konmakla birlikte tek bir izolat elde edilmesi nedeniyle ayrıntılı sürvey çalışmalarının yapılması gerektiği kanısına varılmıştır.

Yapmış olduğumuz çalışmalar ve mevcut literatür bilgileri ışığında *Psp*'nin tespit ve tanılanmasına yönelik hızlı, güvenilir bir yöntemin bulunmadığı görülmüştür. Bu konuda *Psp* ve *Pv*'nin hastalıklı bitkilerden izolasyonu sonrası LOPAT testlerinin yapılmasından sonra duyarlı Kelvedon Wonder çeşidinde patojenisite testlerinin yapılması şeklinde izlenen yolun zaman kaybı dezavantajı olmakla birlikte en uygun yöntem olduğu kanısına varılmıştır. Bu amaçla çalışmalarımızda tüm izolatlar ile pozitif sonuç vermiş olan ticari antiserum (ADGEN) ile ELISA ve IFAS tamamlayıcı testler olarak uygulanabilir. Sürvey çalışmalarımız sırasında hastalığın saptandığı tohumların Macaristan'dan ithal edildiği bilgisine ulaşılmıştır. Tohum orijinli ve karantinaya tabi olan *Psp*'nin özellikle tohumdan tespitine yönelik hızlı ve güvenilir moleküler yöntemlerin belirlenmesi gerekmektedir. Bu konuda ırkların saptanması ve avirülens genlerine yönelik bazı moleküler çalışmalar olmakla birlikte (Courneyor vd., 1995; Arnold vd., 1996; Cirvilleri vd., 2007) etmenin kesin tespit ve tanılanmasında, ırklarının belirlenmesinde uygun moleküler bir yöntem bulunmamaktadır. Bezelye Bakteriyel Yanıklık hastalığının sınırlı olarak saptandığı ülkemizde özellikle ırklar saptandıktan sonra mevcut çeşitlerin reaksiyonlarının belirlenmesi ve hastalığın mücadelesine yönelik çalışmaların araştırılması gerekli diğer öncelikli konulardır.

KAYNAKLAR

- Akova, Y. 2009. İGEME Bakliyat Raporu. T.C. Başbakanlık Dış Ticaret Müsteşarlığı İhracatı Geliştirme Etüd Merkezi, Ankara.
- Anonim, 2011a. Food and Agriculture Organization of The United Nations [<http://faostat.fao.org>], Erişim Tarihi: 22.10.2011.
- Anonim, 2011b. Türkiye İstatistik Kurumu [<http://tuik.gov.tr>], Erişim Tarihi: 22.10.2011.
- Arnold, D.L., Athey-Pollard, A., Gibbon, M.J., Taylor, J.D., Vivian, A. 1996. Specific oligonucleotide primers for the identification of *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* yield one of two possible DNA fragments by PCR amplification: evidence for phylogenetic divergence. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 49: 233-245.
- Aysan, Y., Mirik, M., Ala, A., Şahin, F., Çınar, O. 2003. First report of *Pseudomonas viridiflava* on melon in Turkey. **Plant Pathology**, 52: 800.
- Aysan, Y., Yildiz, N., Yucel, F. 2004. Identification of *Pseudomonas viridiflava* on tomato by traditional methods and enzyme-linked immunosorbent assay. **Phytoparasitica**, 32: 146-153.
- Ball, E.M., Hampton, R.O., De Boer, S.H., Schaad, N.W., 1990. Polyclonal antibodies. In: Serological Methods for Detection and Identification of Viral and Bacterial Plant Pathogens: A Laboratory Manual (Hampton, R., Ball, E. and De Boer, S., Eds.), American Phytopathological Society Press, pp.56-72, Minnesota.
- Bashan, Y., Kenneth, R. 1983. The occurrence of bacterial blight of peas in Israel. **Phytoparasitica**, 11: 113-115.
- Benlioglu, K., Özakman, M. 1993. Evaluation of two serological methods for the identification of halo blight pathogen (*Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*) of beans. **Journal of Turkish Phytopathology**, 22: 75-84.
- Benlioglu, K., De Boer, S.H., Ward, L.J., 1998. Sensitive detection of the Blackleg pathogen *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* by PCR. **Journal of Turkish Phytopathology**, 27: 9-16.

- Benlioglu, K., Özyilmaz, Ü., Ertan, D. 2010. First report of bacterial blight caused by *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* on pea in Turkey. **Plant Disease**, 94: 923.
- Bevan, J.R., Taylor, J.D., Crute, I.R., Hunter, P.J., Vivian, A. 1995. Genetics of specific resistance in pea (*Pisum sativum*) cultivars to seven races of *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*. **Plant Pathology**, 44: 98-108.
- Boelema, B.H. 1972. Bacterial blight (*Pseudomonas pisi* Sackett) of peas in South Africa with special reference to frost as a predisposing factor. **Mededelingen Landbouwhogeschool Wageningen**, 72: 1-87.
- Bradbury, J.F. 1970. Isolation and preliminary study of bacteria from plants. **Plant Pathology**, 49: 213-218
- Braun-Kiewnick, A., Sands, D.C. 2001. *Pseudomonas*. In: Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria (Schaad, N.W., Jones, J.B. and Chun, W., Eds.), American Phytopathological Society Press, pp.84-120, Minnesota.
- Cintas, N.A., Koike, S.T., Bull, C.T. 2002. A new pathovar, *Pseudomonas syringae* pv. *alisalensis* pv. nov., proposed for the causal agent of bacterial blight of broccoli and broccoli raab. **Plant Disease**, 86: 992-998.
- Cirvilleri, G., Scuderi, G., Catara, V., Scortichini, M. 2007. Typing of *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* strains by fluorescent AFLP fingerprinting. **Journal of Plant Pathology**, 89: 421-425.
- Courneyor, B., Sharp, J.D., Astuto, A., Gibbon, M.J., Taylor, J.D., Vivian, A. 1995. Molecular characterization of the *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* plasmid-borne avirulence gene *avrPpiB* which matches the R3 resistance locus in pea. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, 2: 700-708.
- De Boer, S.H., Kelman, A. 2001. *Erwinia* soft rot groups. In: Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria (Schaad, N.W., Jones, J.B. and Chun, W., Eds.), American Phytopathological Society Press, pp.56-72, Minnesota.
- Dye, D.W. 1968. A taxonomic study of the genus *Erwinia*. 1. the 'amylovora' group. **New Zealand Journal of Science**, 11: 590-607.
- Ekinci, A. S. 1972. Özel Sebzeçilik. Ahmet Sait Matbaası, İstanbul.

- Elkan, G.H., Bunn, C.R. 1992. The rhizobia. In: *The Prokaryotes: A Handbook on the Biology–Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications* (Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W. and Schleifer, K.H., Eds.), Springer, pp.2197-2210, New York.
- Elvira-Recuenco, M., van Vuurde, J.W.L. 2000.** Natural incidence of endophytic bacteria in pea cultivars under field conditions. **Canadian Journal of Microbiology**, 46: 1036–1041.
- Elvira-Recuenco, M., Taylor, J.D. 2001. Resistance to bacterial blight (*Pseudomonas syringae* pv. *pusi*) in Spanish pea (*Pisum sativum*) landraces. *Euphytica*, 118: 305-311.**
- Elvira-Recuenco, M., Bevan, J.R., Taylor, J.D. 2003. Differential responses to pea bacterial blight in stems, leaves and pods under glasshouse and field conditions. *European Journal of Plant Pathology*, 109: 555-564.**
- EPPO. 2011. PQR-EPPO database on quarantine pests [<http://www.eppo.org>].
- Fahy, P.C., Hayward, A.C. 1983. Media and methods for isolation and diagnostic tests. In: *Plant Bacterial Diseases A Diagnostic Guide* (Fahy, F.C. and Persley, G.J., Eds.), Academic Press, pp.337-378, Sydney.
- Gritton, E.T. 1980. Field pea. In: *Hybridization of Crop Plants* (Fehr, W.R. and Hadley, H.H., Eds.), American Society of Agronomy, Inc; and Crop Science Society of America, Inc; pp.347-356, Wisconsin, USA.
- Grondeau, C., Saunier, M., Poutier, F., Samson, R. 1992. Evaluation of physiological and serological profiles of *Pseudomonas syringae* pv. *pusi* for pea blight identification. **Plant Pathology**, 41: 495-505.
- Grondeau, C., Samson, R. 1997. Effect of host genotype and non-host plants on epiphytic life of *Pseudomonas syringae* pv. *pusi*. In: *Pseudomonas syringae* Pathovars and Related Pathogens (Rudolph, K., Burr, T.J., Mansfield, J.W., Stead, D., Vivian, A. and von Kietzell, J., Eds.), Kluwer Academic Publishers, pp.22-25, Netherlands.
- Grünwald, N.J., Chen, W., Larsen, R.C. 2004. Pea diseases and their management. In: *Diseases of Fruits and Vegetables* (Naqvi, S.A.M.H., Ed.), Kluwer Academic Publishers, pp.301-331, USA.

- Hildebrand, D.C. 1972. Tolerance of homoserine by *Pseudomonas pisi* and implications of homoserine in plant resistance. **Phytopathology**, 63: 301-302.
- Hoitink, H.A.J., Hagedorn, D.J., McCoy, E. 1968. Survival, transmission, and taxonomy of *Pseudomonas syringae* van Hall, the causal organism of bacterial brown spot of bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Canadian Journal of Microbiology**, 14: 437-441.
- Hollaway, G.J., Bretag, T.W. 1995. Occurrence and distribution of races of *Pseudomonas syringae* pv. *pisii* in Australia and their specificity towards various field pea (*Pisum sativum*) cultivars. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, 35: 629-632.
- Hollaway, G.J., Gillings, M.R., Fahy, P.C. 1997. Use of fatty acid profiles and repetitive element polymerase chain reaction (PCR) to assess the genetic diversity of *Pseudomonas syringae* pv. *pisii* and *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* isolated from field peas in Australia. **Australian Plant Pathology**, 26: 98-108.
- Hollaway, G.J., Bretag, T.W., Price, T.V. 2007. The epidemiology and management of bacterial blight (*Pseudomonas syringae* pv. *pisii*) of field pea (*Pisum sativum*) in Australia: a review. **Australian Journal of Agricultural Research**, 58: 1086-1099.
- Jindal, K.K., Pathania, N. 1997. Effect of soil moisture on the transmission of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* from seed to seedling in pea. In: *Pseudomonas syringae* Pathovars and Related Pathogens (Rudolph, K., Burr, T.J., Mansfield, J.W., Stead, D., Vivian, A. and von Kietzell, J., Eds.), Kluwer Academic Publishers, pp.11-15, Netherlands.
- Jones, J.B., Jones, J.P., McCarter, S.M., Stall, R.E. 1984. *Pseudomonas viridiflava*: Casual agent of bacterial blight of tomato. **Plant Disease**, 68: 341-342.
- Kaya, M., Şanlı, A. 2005. Bezelye (*Pisum sativum* L.)’de ilk gelişme devresinde kök ve toprak üstü organlarının durumu. **Türkiye VI. Tarla Bitkileri Kongresi Bildirileri**, Cilt I. (5-9 Eylül 2005), pp.51-55, Antalya.

- King E.O., Ward, M.K., Raney, D.E. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, 44: 301-307.
- Klement, Z. 1963. Rapid detection of the pathogenicity of phytopathogenic pseudomonads. **Nature**, 199: 299-300.
- Kovacs, N. 1956. Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. **Nature**, 178: 703.
- Lane, D.J., Pace, B., Olsen, G.J., Stahl, D.A., Sogin, M.L., Pace, N.R., 1985. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 82: 6955-6959.
- Lawyer, A.S. 1984. Diseases caused by bacteria. In: Compendium of Pea Diseases (Hagedorn, D.J., Ed.), American Phytopathological Society Press, pp.8-11, USA.
- Lawyer, A.S., Chun, W. 2001. Foliar diseases caused by bacteria. In: Compendium of Pea Diseases (Kraft, J.M and Pflieger, F.L., Eds.), American Phytopathological Society Press, pp.22-26, USA.
- Lelliott, R.A., Billing, E., Hayward, A.C. 1966. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic pseudomonads. **Journal of Applied Microbiology**, 29: 470-489.
- Lelliott, R.A., Stead, D. 1987. Methods for The Diagnosis of Bacterial Diseases of Plants. British Society of Plant Pathology, Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Lucas, L.T., Grogan, R.G. 1969. Serological variation and identification of *Pseudomonas lachrymans* and other phytopathogenic *pseudomonas* nomenclatures. **Phytopathology**, 59: 1908-1912.
- Mansfield, P.J., Wilson, D.W., Heath, M.C., Saunders, P.J. 1997. Development of pea bacterial blight caused by *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* in winter and spring cultivars of combining peas (*Pisum sativum*) with different sowing dates. **Annals of Applied Biology**, 131: 245-258.
- Martin-Sanz, A., Garcia Vaquero, C.A., Caminero Saldana, C. 2005. Pea bacterial blight: a problem in Castilla y León. **Grain Legumes**, 41: 8-9.

- Martin-Sanz, A., Palomo, J.L., Pérez de la Vega, M., Caminero C. 2010. First report of bacterial blight caused by *Pseudomonas viridiflava* on pea in Spain. **Plant Disease**, 94: 128.
- Martin-Sanz, A., Palomo, J.L., Pérez de la Vega, M., Caminero, C. 2011. Identification of pathovars and races of *Pseudomonas syringae*, the main casual agent of bacterial disease in pea in North-Central Spain, and the search for disease resistance. **European Journal of Plant Pathology**, 129: 57-69.
- Mazarei, M., Kerr, A. 1990. Distinguishing pathovars of *Pseudomonas syringae* on peas: nutritional, pathogenicity and serological tests. **Plant Pathology**, 39: 278-285.
- Özdemir, S. 2002. Yemeklik Baklagiller. Hasad Yayıncılık, İstanbul.
- Palleroni, N.J. 2005. Genus I. *Pseudomonas*. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Brenner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.R. and Garrity, G.M., Eds.), Second Edition, Springer, pp.323-379, New York, USA.
- Parry, D.W. 1990. Plant Pathology in Agriculture. Cambridge University Press, Cambridge.
- Reeves, J.C., Hutchins, J.D., Simpkins, S.A. 1996. The incidence of races of *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* in UK pea (*Pisum sativum*) seed stocks, 1987-1994. **Plant Varieties and Seeds**, 9: 1-8.
- Richardson, H., Holloway, G. 2007. Bacterial blight of pea, [<http://www.dpi.vic.gov.au/agriculture/pestsdiseasesandweeds/plantdiseases/grains-cereals/ag0148-bacterial-blight-of-field-peas>], Erişim Tarihi: 09.04.2009.
- Roberts, S.J. 1992. Effect of soil moisture on the transmission of pea bacterial blight (*Pseudomonas syringae* pv. *pisi*) from seed to seedling. **Plant Pathology**, 41: 136-140.
- Roberts, S.J. 1993. Effect of bacterial blight (*Pseudomonas syringae* pv. *pisi*) on the growth and yield of single pea (*Pisum sativum*) plants under glasshouse conditions. **Plant Pathology**, 42: 568-576.
- Roberts S.J., Phelps K., McKeown, B.M., Heath, M.C., Cockerell, V. 1995. Effect of pea bacterial blight (*Pseudomonas syringae* pv. *pisi*) on the yield of

- spring sown combining peas (*Pisum sativum*). **Annals of Applied Biology**, 126: 61-73.
- Roberts, S.J., Ridout, M.S., Peach, L., Brough, J. 1996. Transmission of pea bacterial blight (*Pseudomonas syringae* pv. *pisii*) from seed to seedling: effects of inoculum dose, inoculation method, temperature and soil moisture. **Journal of Applied Microbiology**, 81: 65-72.
- Roberts, S.J. 1997. Effect of weather conditions on local spread and infection by pea bacterial blight (*Pseudomonas syringae* pv. *pisii*). **European Journal of Plant Pathology**, 103: 711-719.
- Rowhani, A., Feliciano, A.J., Lips, T., Gubler, W.D. 1994. Rapid identification of *Xanthomonas fragariae* in infected strawberry leaves by enzyme-linked immunosorbent assay. **Plant Disease**, 78: 248-250.
- Samson, R., Saunier, M. 1987. Désignation de références sérologiques pour six sérogroupes de pathovars de *Pseudomonas syringae* sur la base de leur lipopolyside. **Bulletin OEPP EPPPO Bulletin**, 17: 165-171.
- Schmit, J. 1991. Races of *Pseudomonas syringae* pv. *pisii*. Occurrence in France and host specificity towards winter and spring cultivars of protein peas. In: **Proceedings of the Fourth International Working Group on Pseudomonas syringae Pathovars**, pp.256-262, Florence, Italy.
- Steven, T.K., Gladders, P., Paylus, A.O. 2007. *Vegetable Diseases a Colour Handbook*. Academic Press, USA.
- Suzuki, A., Togawa, M., Otha, K., Takikawa, Y. 2003. Occurrence of white top of pea caused by a new strain of *Pseudomonas syringae* pv. *pisii*. **Plant Disease**, 87: 1404-1410.
- Şalk, A., Arın, L., Deveci, M., Polat, S. 2008. Özel Sebzeçilik. Namık Kemal Üniversitesi Bahçe Bitkileri Bölümü, Tekirdağ.
- Taylor J.D. 1972. Specificity of bacteriophages and antiserum for *Pseudomonas syringae* pv. *pisii*. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, 15: 421-431.
- Taylor, J.D., Bevan, J.R., Crute, I.R. 1989. Genetic relationship between races of *Pseudomonas syringae* pv. *pisii* and cultivars of *Pisum sativum*. **Plant Pathology**, 38: 364-375.

- Thornley, M.J. 1960. The differentiation of *Pseudomonas* from other Gram-negative bacteria on the basis of arginine metabolism. **Journal of Applied Microbiology**, 23: 37-52.
- Tongu, M., Şanlı, A., Kaya, M. 2009. Bezelye (*Pisum sativum* L.)'de külleme hastalığı, kontrolü ve dayanıklılık kaynakları. **Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi**, 18: 55-59.
- Üstün, N. 2000. Ege Bölgesi Domates Seralarında z Nekrozu Hastalığına Neden Olan Bakteriyel Etmenler zerinde Araştırmalar. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora tezi, İzmir.
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., Lane, D.J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, 173: 697-703.
- Wilkie, J.P., Dye, D.W., Watson, D.R.W. 1973. Further hosts of *Pseudomonas viridiflava*. **New Zealand Journal of Agriculture Research**, 16: 315-323.
- Zheng, D., Alm, E.W., Stahl, D.A., Raskin, L. 1996. Characterization of universal small-subunit rRNA hybridization probes for quantitative molecular microbial ecology studies. **Applied and Environmental Microbiology**, 62: 4504-4513.

Ek 3.1. Etik kurul belgesi



T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
(ADÜ-HADYEK)



Aydın, 9 Nisan 2010

Oturum Sayı : Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 2010 Yılı III. Oturumu
: B.30.2.ADÜ.0.00.00.00/050.04/2010/47

Proje Başlığı : Aydın ve İzmir İlleri Bezelye Üretim Alanlarında Görülen Bakteriyel Hastalıkların Saptanması

Proje Yürütücüsü : Kemal BENLİOĞLU

Proje Ekibi : Duygu ERTAN

Bu çalışmanın hiçbir bölümünde:

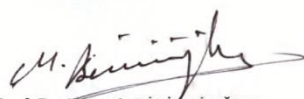
İnsan embriyosu ve fötüsü kullanılması
İnsan embriyosu ve fötüsü dokularının kullanılması
Diğer insan doku ve hücrelerinin kullanılması
Hayvan Çalışması İnsanlarda araştırma
İnsan olmayan primatların kullanılması
Transgenik hayvanların kullanılması
Hayvanlarda genetik modifikasyon öngörülmemiştir.


Bu çalışmanın yapılmasında etik açıdan bir sakınca bulunmamaktadır.


Doç. Dr. Muharrem BALKAYA
(Başkan)

İzinli

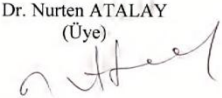
Doç. Dr. İbrahim CEMAL
(Üye)



Prof. Dr. Mustafa BİRİNCİOĞLU
(Üye)



Prof. Dr. Fevzi BARDAKÇI
(Üye)

İzinli

Vet. Hek. Ufuk SAYIN
(Üye)


Dr. Nurten ATALAY
(Üye)


Yrd. Doç. Dr. Cengiz ÜNSAL
(Üye)


Şevket AKYOL
(Raportör)

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı :Duygu ERTAN
Doğum Yeri ve Tarihi :İzmir / 21.03.1985

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi :Adnan Menderes Üniversitesi, Ziraat Fakültesi
Yüksek Lisans Öğrenim :Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü
Bildiği Yabancı Diller :İngilizce

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

a) Makaleler

-SCI

Benlioglu, K., Özyilmaz, Ü., Ertan, D. 2010. First report of bacterial blight caused by *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* on pea in Turkey. **Plant Disease**, 94: 923.

-Diğer

b) Bildiriler

-Uluslararası

-Ulusal

Ertan, D., Benlioğlu, K. 2011. Bezelye bakteriyel hastalığı etmeni *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*'nin Türkiye'de varlığı. **Türkiye IV. Bitki Koruma Kongresi Bildirileri**, (28-30 Haziran), p.57, Kahramanmaraş.

c) Katıldığı Projeler

Aydın ve İzmir İleri Bezelye Üretim Alanlarında Görülen Bakteriyel Hastalıkların Saptanması, Bilimsel Araştırmalar Projeleri Kurulu, ZRF-11037, 29/03/2011-29/03/2012.

İŞ DENEYİMİ

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl :Adnan Menderes Üniversitesi, Ziraat Fakültesi □ 09

İLETİŞİM

E-posta Adresi :duyguertan8@gmail.com

duygu.ertan@adu.edu.tr

Tarih :2012