ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Fatma SELÇUK

BRASSİCACEAE FAMİLYASINA AİT BAZI TİCARİ BİTKİ TOHUMLARINDA BAKTERİYEL HASTALIK ETMENLERİNİN TANILANMASI

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

ADANA, 2008

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BRASSİCACEAE FAMİLYASINA AİT BAZI TİCARİ BİTKİ TOHUMLARINDA BAKTERİYEL HASTALIK ETMENLERİNİN TANILANMASI

Fatma SELÇUK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

Bu Tez 23.09.2008 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oybirliği ile Kabul Edilmiştir.

İmza……..... İmza…….

Doç. Dr. Yeşim AYSAN Doç. Dr. Soner SOYLU

DANIŞMAN **ÜYE**

İmza…….....

Yrd. Doç. Dr. Muharrem Arap KAMBEROĞLU

ÜYE

Bu Tez Enstitümüz Bitki Koruma Anabilim Dalında hazırlanmıştır.
Kod No:

Prof. Dr. Aziz ERTUNÇ
Enstitü Müdürü

Bu Çalışma Ç.Ü. Araştırma Projeleri Birimi ve TUBİTAK Tarafından Desteklenmiştir.

Proje No: ZF2008YL12 (Ç.Ü. Araştırma Projeleri Birimi)

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BRASSİCACEAE FAMİLYASINA AİT BAZI TİCARİ BİTKİ TOHUMLARINDA BAKTERİYEL HASTALIK ETMENLERİNİN TANILANMASI

Fatma SELÇUK

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

Danışman: Doç. Dr. Yeşim AYSAN
Yıl: 2008, Sayfa: 50
Jüri: Doç. Dr. Yeşim AYSAN
Doç. Dr. Soner SOYLU
Yrd. Doç. Dr. Muharrem A. KAMBEROĞLU

Brassica türlerine dahil farklı bitkilere ait 16 tohum (13 adet lahana, 1 adet karnabahar ve 2 adet kırmızı lahana) örnekleri *Xanthomonas, Pseudomonas* ve *Erwinia* cinslerine ait bakterileriyel etmenlerle bulaşıklık oranları ve tanılanması yönünden incelenmiştir. Tohumlar ve bu tohumlardan gelişen hastalıklı fidelerden izole edilen 355 farklı bakteri izolatı geleneksel yöntemler, konukçu testi ve serolojik (ELISA) yöntemler kullanılarak tanılanmıştır. İncelemesi yapılan tohum örneklerinden gelişen fidelerde %5.8 ile %51.6 arasında değişen oranlarda lekeli fideler tespit edilmiştir. İzole edilen bakteriyel etmenlerin tanılanması sonucunda, testlenen tohumların *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* ile bulaşık olmadığı belirlenmiştir. İki tohum örneğinin ise *Brassica* spp.'de hastalık yapma yeteneğinde olan *Erwinia* ve *Pseudomonas* spp. ile bulaşık olduğu saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Lahana, karnabahar, kara lahana, tohum, ELISA

ABSTRACT

MSc THESIS

IDENTIFICATION OF BACTERIAL DISEASE AGENTS ON COMMERCIAL SEEDS OF SAME PLANTS BELONGS TO BRASSICACEAE FAMILY

Fatma SELÇUK

UNIVERSITY OF ÇUKUROVA
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF PLANT PROTECTION

Supervisor : Associate Prof. Dr. Yeşim AYSAN
Year : 2008 Page: 50
Jury : Associate Prof. Dr. Yeşim AYSAN
Associate Prof. Dr. Soner SOYLU
Assistant Prof. Dr. Muharrem KAMBEROĞLU

Sixteen different seed lot samples from Brassicaceous plants (13 cabbage [*Brassica oleracea* L.var. *capitata*], one cauliflower [*Brassica oleracea* L.var. *botrytis*], and two red cabbage [*Brassica oleracea* L.var. rubra]) were assayed in terms of infestation rate and prevalence of plant pathogenic *Xanthomonas Pseudomonas* and *Erwinia* species and their identification. Totally 355 putative bacterial isolates were obtained from seeds and diseased sedlings developed from these seeds and identified by using traditional methods, host pathogenicity and serological (ELISA) methods. In examination of seedling tests, disease prevalence on seedlings developed from seeds under investigation varied between 5.8% and 51.6%. Results of identification of bacterial isolates revealed that seeds of Brassicaceous plants were not contaminated by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, causal agent of black rot. Two different plant pathogenic bacterial species belongs to *Erwinia* and *Pseudomonas* genus were detected in different seeds lots.

Key words: Cabbage, cauliflower, seed, ELISA

TEŞEKKÜR

Çalışmamın her aşamasında yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Sayın Doç. Dr. Yeşim AYSAN' a sonsuz teşekkürler.

Yüksek Lisans tez jüri üyelerinden Sayın Doç. Dr. Soner SOYLU ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Muharrem Arap KAMBEROĞLU'na yapıcı ve yönlendirici fikirleriyle katkıda bulundukları için teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam için tüm bölüm olanaklarından yararlanmamı sağlayan Ç. Ü. Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Başkanlığı'na, maddi destek veren Ç. Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne (Proje no: ZF2008YL12) en içten teşekkürlerimi sunarım.

ELISA çalışmalarımda yardımlarını esirgemeyen ve Viroloji laboratuar olanaklarından yararlanmamı sağlayan Prof. Dr. Saadettin BALOĞLU' na, Yrd. Doç. Dr. Muharrem A. KAMBEROĞLU' na, Dr. Behçet Kemal ÇAĞLAR' a, Arş. Gör. Gökmen KOÇ' a ve Zir. Yük. Müh. A. Filiz ÇALIŞKAN ve Zir. Yük. Müh. Bilge ALAT' a teşekkür ederim.

Tohum izolasyon çalışmalarımda Mikoloji Laboratuarı olanaklarından yararlanmamı sağlayan ve çalışma imkanı veren Prof. Dr. Ali ERKILIÇ' a teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında emeği geçen değerli arkadaşlarım Dr. Mustafa MİRİK' e, Dr. Mustafa KÜSEK' e, Dr. Raziye ÇETİNKAYA-YILDIZ' a, Zir. Yük. Müh. Hatice ÖRNEK' e, ve Zih. Yük. Müh. Sencan ÜNLÜ' ye teşekkür ederim.

Manevi destek ve sevgileriyle her zaman yanımda olduğunu hissettiğim merhum olan babam Ömer SELÇUK ve annem Samime SELÇUK' a sonsuz teşekkürler.

İÇİNDEKİLER **SAYFA**

ÖZ I
ABSTRACT II
TEŞEKKÜR III
İÇİNDEKİLER IV
ÇİZELGELER DİZİNİ VI
ŞEKİLLER DİZİNİ VII
SİMGELER VE KISALTMALAR IX
1. GİRİŞ 1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 4
2.1. Brassicaceae Familyasında Görülen Bakteriyel Hastalıklarıyla İlgili Çalışmalar 4
2.2. Ülkemizde Tohum Kaynaklı Bakteriyel Hastalıklarla İlgili Çalışmalar 6
2.3. Brassicaceae Familyasında Görülen Tohum Kaynaklı Bakteriyel Etmenlerle İlgili Çalışmalar 8
3. MATERYAL VE METOD 12
3.1. Materyal 12
3.2. Metod 13
3.2.1. Brassicaceae Familyasına Ait Bitki Tohumlardan Bakteriyel Patojenlerin İzolasyonu 13
3.2.2. Brassicaceae Familyasına Ait Bitki Tohum ve Fidelerinden İzole Edilen Bakteriyel Patojenlerin Tanısı 17
3.2.2.1. Farklı Besi Yerindeki Koloni Morfolojileri 18
3.2.2.2. Potasyum Hidroksit Testiyle (KOH) Gram Reaksiyon 19
3.2.2.3. Nişasta Hidrolizasyonu 19
3.2.2.4. Levan Oluşumu 20
3.2.2.5. Oksidaz Testi 20
3.2.2.6. Pektolitik Aktivite Testi 20
3.2.2.7. Arginin Dehidrolaz Aktivitesi 21
3.2.2.8. Tütünde Aşırı Duyarlılık Reaksiyonu 21
3.2.2.9. Oksidasyon/Fermentasyon (O/F) Testi 21

3.2.2.10. Katalaz Testi..... 22
3.2.2.11. Hareketlilik Testi..... 22
3.2.2.12. Patojenite Testi..... 22
3.2.2.13. Indirect-ELISA Testi..... 23
4. BULGULAR VE TARTIŞMA..... 25
4.1. Brassicaceae Familyasına Ait Ticari Bitki Tohumlardan Bakteriyel Patojenlerin İzolasyonu..... 25
4.2. Brassicaceae Familyasına Ait Ticari Bitki Tohum ve Fidelerinden İzole Edilen Bakteriyel Patojenlerin Tanısı ……..... 32
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 39
KAYNAKLAR..... 41
ÖZGEÇMİŞ 47
EKLER..... 48

ÇİZELGELER DİZİNİ **SAYFA**

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan referans izolatlar..... 12
Çizelge 4.1. Brassicaceae familyasına ait ticari bitki tohumlarından gelişen fidelerdeki hastalık oranı (%)..... 29
Çizelge 4.2. *Xanthomonas* spp. şüphesiyle elde edilen izolatlarla yapılan test sonuçları 34
Çizelge 4.3. *Pseudomonas* spp. veya *Erwinia* spp. şüphesi olan izolatlarla yapılan test sonuçları..... 35

ŞEKİLLER DİZİNİ **SAYFA**

Şekil 3.1. Brassicaceae familyasına ait bitki tohumlarından bakteriyel patojenlerin aranmasında takip edilen aşamalar 16

Şekil 4.1. mCS20ABN besi yerinde 4 gün içinde zon oluşturan sarı renkli koloniler 26

Şekil 4.2. mCS20ABN besi yerinde 10 gün sonra belirgin zon oluşturan koloniler 26

Şekil 4.3. BSCAA besi yerinde açık yeşil, mukoid, etrafında zonlar bulunan koloniler 27

Şekil 4.4. FS besi yerinde büyük, mat yeşil, mukoid, etrafında zonlar bulunan koloniler 27

Şekil 4.5. mCS20ABN besi yerinde Lah Ant 1 kodlu *Xcc* referans izolatın koloni gelişimi 28

Şekil 4.6. YDC besi yerinde Lah Ant 1 kodlu *Xcc* referans izolatın koloni gelişimi 28

Şekil 4.7. Fidelerde belirti izleme testinde, lahana fidelerinde gözlenen kotiledon lekeleri 30

Şekil 4.8. Fidelerde belirti izleme testinde, karnabahar fidesinde gözlenen kotiledon lekeleri 30

Şekil 4.9. Fidelerde belirti izleme testinde, kara lahana fidesinde gözlenen kotiledon lekesi 31

Şekil 4.10. Fidelerde belirti izleme testinin görünümü 31

Şekil 4.11. Nişasta hidrolizasyonu pozitif olan sarı renkli bakterinin görünümü 33

Şekil 4.12. YDC besi yerinde sarı renkli gelişen bakteri 33

Şekil 4.13. Patojenite testinde, Lah Ant 1 kodlu *Xcc*'in referans izolatının oluşturduğu damar çürüklüğü belirtisi 34

Şekil 4.14. Tütünde aşırı duyarlılık reaksiyonu pozitif olan izolatın oluşturduğu nekrotik görünüm 36

Şekil 4.15. Pektolitik enzim üreten bakterilerin patates dilimlerinde meydana getirdiği çürüme 36

Şekil 4.16. Patojenite testinde, lahana yaprağında oluşan kurumaların ve lekenin görünümü 37

SİMGELER VE KISALTMALAR

ABD : Amerika Birleşik Devletleri

BSCAA: Basal starch cycloheximide antibiotic agar

°C : Santigrat derece

ELISA : Enzim bağlı immunolojik deney

FS : Fieldhouse Sasser agar

g : Gram

HCl : Hidro klorik asit

ISTA : Uluslar Arası Tohum Testleme Birliği

IFAS :

IF : Immunofluorescense

KI : Potasyum İyodür

King B : King's medium B

KOH : Potasyum Hidroksit

l : Litre

ml : Mililitre

mg : Miligram

mm : Milimetre

NSCAA: Nutrient starch cycloheximide antibiotic agar

NSCA : Nutrient starch cycloheximide agar

NaCl : Sodyum Klorür

NaOCl : Sodyum Hipoklorit

nm : Namometre

O/F : Oksidatif/Fermantatif

PBS : Phoshate buffered saline

PNP : Para nitrophenil phosphate

PCR : Polimeraz Zincir Reaksiyonu

pv : Pathovar

spp : Türler

subsp : Alt Tür

YDC :Yeast Dekstroz Kalsiyum Karbonat Agar

µl : Mikro litre

1. GİRİŞ

Tohum, tarımsal üretimin ilk ve zorunlu girdisidir. Elde edilecek ürünün kalite ve kantitesi, uygulanan bakım işlemlerinin yanı sıra kullanılan tohumun özelliklerine fazlasıyla bağlıdır. Günümüzde hibrit tohum üretimindeki gelişmeler, gen mühendisliğindeki atılımlar ve bunların tohum üretimine yansıması sonucu tohumculuk sektörü, ekonomik anlamda büyük bir sektör durumuna gelmiştir (Demir, 2008).

Tohumculuk sektörünün Türkiye'deki durumuna bakacak olursak, bitkisel üretimin artırılmasında genetik potansiyeli yüksek ve kaliteli tohumlukların yurtiçi üretimle karşılanması ve çiftçilere yaygın olarak kullanımının sağlanması temel devlet politikaları arasında yer almaktadır (Anonim, 1997).

Türkiye'de 2002 yılı itibariyle 60 bitki türünden toplam 1134 farklı tohum (çeşit) tescil edilmiştir. Tescil edilen çeşitlerin % 65'i kamu sektörü ve % 35 özel sektör kaynaklıdır. Özel sektör kaynaklı olan tescillerin % 55'i endüstri bitkileri, % 26'sı sıcak iklim tahılları, % 7'si çayır mera bitkileri, % 7'si sebze-meyve ve % 5'i serin iklim tahıllarıdır. Kamu sektörü kaynaklı olarak tescil edilen çeşitlerin ise, % 32'si serin iklim tahılları, % 24'ü endüstri bitkileri, % 23'ü meyve ve sebze, % 9'u sıcak iklim tahılları, % 7'si baklagiller ve % 5'i de yem bitkileridir.

Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı'nın izniyle, yurt içinde yeterince üretilmeyen tohumlar ithal edilebilmektedir. Tohum ithalini bu konuda ihtisaslaşmış kurumlar yapabilmektedir. İthal edilen tohumlukların Türkiye'de denemelerin yapılmış olması, üretim izninin alınmış veya tescil edilmiş olması gereklidir. Türkiye buğday, hibrit mısır, çeltik, pamuk, hibrit ayçiçeği, patates, hibrit sebze ve iri taneli sebze tohumluğu, gereksinimini karşılamak üzere 2000 yılında 71 milyon dolar ithalat harcaması gerçekleştirmiştir (Anonim, 2001).

Ülkemizde tohum seçimi ve fide temini konusunda son yıllarda hızlı gelişmeler kaydedilmiştir. Genellikle örtüaltı sebzeciliğinde % 98 oranla hibrit tohum kullanılmakla birlikte bu oran, açık alanda yapılan üretimde de yüksek seviyeye ulaşmıştır. Hibrit F1 tohumlar yurtdışından temin edilmekte ve bu nedenle yurt dışına büyük miktarda döviz ödemek zorunda kalınmaktadır. Bu sebeple ıslah

çalışmaları ve hibrit tohumlarının üretimi ülkemiz açısından da önem kazanmıştır (Kargın, 2003).

Son yıllarda tohumluğun ithalat ve ihracatındaki bu önemli gelişmeler bir takım avantajlar sağlamasının yanında tohum kaynaklı çeşitli hastalıkların da ülkemize giriş yapmasına veya yeni epidemiler oluşmasına yol açmaktadır. Bu patojenlerden dolayı her yıl % 2-100 arasında değişen oranlarda üretim kaybı meydana gelmektedir. Yaklaşık 383 bitki cinsinde 2400 tohumla taşınan patojenin; 750'si fungus, 180'virüs ve 100'ü bakteridir (Erkan, 1998).

Brassicaceae familyasına dahil sebze (lahana, kara lahana, çin lahanası, şalgam, turp, karnabahar, brokoli, brüksel lahanası) yetiştiriciliğinde de diğer ürünlerdeki gibi kalite, en önemli kriterlerden biridir ve birim alanda alınacak verimi arttırmada kaliteli tohumluk kullanımı tüm etkili faktörler içinde ilk sırada yer almaktadır. Ülkeler veya bölgeler arası tohum alış verişiyle çeşitli hastalık etmenleri yayılma gösterebilmektedir. Akdeniz bölgesinde (Adana, Mersin ve Antalya) 2005'den beri lahana, brokoli ve karnabahar üretim alanlarında yetişen bitkilerde yaprak lekeleri, kurumalar ve damar çürüklüğü belirtileri saptanmıştır (Mirik ve ark., 2008). Ayrıca iki yıldan beri de sebze fideliklerinde yaprak lekeleri ve fide kurumaları şeklinde şikayetler gelmektedir. Benzer belirtiler Samsun ili Bafra ilçesinde de tespit edilmiştir (Aksoy, 2007). Brassicaceae familyasına dahil bitkilerde çeşitli fungal, viral ve bakteriyel etmenler ürün kaybına neden olmaktadır. Brassicaceae familyasına dahil bitkilerde bakteriyel hastalıklar olarak, siyah damar çürüklüğü (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*), *Xanthomonas* yaprak lekesi (*Xanthomonas campestris* pv. *armoraciae*), bakteriyel yaprak lekesi (*Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*), bakteriyel yumuşak çürüklük (*Erwinia carotovora* ve *Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis*) ve kök boğazı uru (*Agrobacterium tumefaciens*) olarak bilinen hastalıklar görülmektedir (Koike ve ark., 2007).

Hastalığın ilk inokulum kaynaklarından birinin tohumlar olduğu düşünüldüğünde, temiz tohumluk kullanımının önemi bir kez daha ortaya çıkmış olup bölgede kullanılan farklı Brassica spp. türlerine dahil bitki tohumlarının bakteriyel hastalık etmenleri yönünden incelenmesi bu tezin konusunu oluşturmuştur. Çalışmada, (International Seed Testing Assosiation-Uluslar Arası Tohum Testleme

Birliği) ISTA'ya bağlı kuruluşlarca tercih edilen tanılama yöntemleri kullanılmıştır (Roberts ve Koenraadt, 2003).

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2. 1. Brassicaceae Familyasında Görülen Bakteriyel Hastalıklarıyla İlgili Çalışmalar

Brassicaceae familyasına dahil bitkilerde, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (*Xcc*) (Pammel) Dowson 1939'in neden olduğu siyah damar çürüklüğü hastalığı ekonomik olarak en çok zarar veren bakteriyel bir hastalıktır. Etmenin sinomimleri; *X. axonopodis* pv. *campestris, X. campestris* pv. *aberrans, X. campestris* pv. *armoraciae* ve *X. campestris* pv. *raphani*'dir. Hastalık lahana yetiştirilen pek çok ülkede sorundur. Patojenin konukçuları arasında Brassica spp. türlerinden (lahana, brokoli, karnabahar, kara lahana, çin lahanası, brüksel lahanası, şalgam ve turp), *Brassica* cinsine ait süs bitkileri (*Cheiranthus cheiri* ve *Matthiola* türleri) ve Brassicaceae familyasından yabancı otlar yer alır (Sherf ve Macnab, 1986). *Xcc* ekonomik olarak en fazla zararını lahana, brokoli ve karnabaharda yapar. Hastalığın en tipik belirtisi yapraklarda ortaya çıkan "V" şeklindeki sarama ve kurumalardır. Sarımtırak lekeler şeklinde meydana gelen lezyonlar, genişleyerek damarlara ilerler ve bu lekelere rastlayan damarlar daha sonra siyahlaşır. İletim demetleri kahverengileştiğinden damarlar siyah görülür (Sherf ve Macnab, 1986; Çınar, 1988; Schaad ve Alvarez, 1993; Koike ve ark., 2007). Hastalık, ilk kez ABD'nin Iowa eyaletinde 1895 yılında şalgamlarda tespit edilmiştir. 1904 yılında hastalığın tohum kaynaklı olduğu, 1921 yılında ise patojenin tohumla taşındığı saptanmıştır. Hastalık etmeni için optimum gelişme sıcaklığı 25-30°C arasında olup, gelişebildiği en düşük sıcaklık 5°C, en yüksek sıcaklık ise 35°C'dir. 25-30°C sıcaklık ve % 80-100 nem hastalık gelişimi için uygun koşullardır. Hastalık tropik ve subtropik alanlarda yağışlı dönemde ortaya çıkar. Bulaşık tohumlar dışında, tamamen çürüyüp toprağa karışmamış bitki artıkları, hastalıklı yabancı otlar, tarlada zamansız kendi gelişen Brassicaceae familyasına dahil bitkiler hastalığın ilk inokulum kaynaklarıdır. Etmen tohum kökenli olmasından dolayı hastalık, pek çok ülkeye tohumla bulaşmıştır (Koike ve ark., 2007). Hastalığın ABD'nin pek çok eyaletinde, Asya ülkelerinde, Hindistan ve Afrika'da varlığı bilinmektedir (Schaad ve Alvarez,

1993). Ülkemizde varlığı uzun zamandır bilinmesine rağmen, 2004-2006 yılları arasında Akdeniz Bölgesinde önemli bir hastalık patlamasının olduğu Mirik ve ark. (2008) tarafından rapor edilmiştir.

Brassicaceae familyasına dahil bitkilerde bakteriyel yumuşak çürüklüğe neden olan *Erwinia* (özellikle *E. carotovora*) ve *Pseudomonas* (*P. fluorescens, P. marginalis* ve *P. viridiflava*) türlerinin gelişimi genellikle nemli hava koşullarına bağlıdır. En önemli zararını karnabahar ve brokolide baş çürümesi şeklinde yapar. İlk belirtiler brokolinin baş kısmında görülen koyu su emmiş çürümelerdir. Lekeler önce küçük gruplar halinde başlar, ilerleyen dönemlerde brokoli başlarının tümü çürür. Sap ve gövde kısmında yumuşama ve pörsümeler gözlenir. Söz konusu etmenler diğer hastalıklardan sonra sekonder olarak da bitkiye saldırır. Aşırı azot uygulanmış tarlalarda, yağışı çok alan bölgelerde, taban suyu yüksek olan yerlerde ve bitki uzun süre nemli kaldığında bu hastalık şiddetli olarak görülür. Hastalık, ülkemizde yoğun yağmurlardan sonra pek çok yerde görülebilmektedir. Bu bakteriyel türler bir çok sebzede tohum kaynaklı olmasına rağmen karnabahar ve brokolide bu konuda yapılmış detaylı bir araştırma bulunmamaktadır (Koike ve ark., 2007).

Pseudomonas syringae pv. *alisalensis*'in neden olduğu bakteriyel yanıklık hastalığı özellikle brokoli yapraklarında güneş yanığı şeklinde lekeler oluşturur. Lekeler ilk başta su emmiş lekeler şeklindedir daha sonra kahverengiye döner ve etrafında açık sarı bir hale oluşur. İlerleyen dönemlerde lekeler genişleyerek damar aralarını kaplar, rengi açılır ve güneş yanığı şeklinde lekeler meydana gelir. Hastalık ilk defa 1998 yılında ABD'nin Kaliforniya eyaletinde ortaya çıkmış ve etmenin patovar düzeyinde tanısı 2002 yılında yapılmıştır (Koike ve ark., 2007). Çok yeni tanılanan bir etmen olduğu için hastalığın hayat döngüsü konusunda pek fazla bilgi bulunmamaktadır.

Pseudomonas syringae pv. *maculicola*'nın neden olduğu bakteriyel yaprak lekesi hastalığı nemli yaz aylarında Avrupa ülkelerinde yaygın görülür. Hastalık dünyada çok yaygın görülen bir hastalık değildir. Etmen bütün Brassicaceae familyasına dahil bitkilerde hastalandırma yeteneğinde olsa da en önemli konukçusu lahanadır. Hastalık fide döneminde ortaya çıkarak önemli fide kayıplarına neden olur. İlk belirtiler kotiledon yapraklarda ortaya çıkar. Küçük su emmiş lekeler daha

sonra gerçek yapraklara geçer. Küçük lekeler en fazla 3-4 mm'yi bulur. Lekeli yapraklar sararır ve ilerleyen dönemlerde fide ölümleri gözlenir (Koike ve ark., 2007).

2. 2. Ülkemizde Tohum Kaynaklı Bakteriyel Hastalıklarla İlgili Çalışmalar

Ülkemizde bakteriyel etmenlerin tohumla taşınmaları üzerine yapılan çalışmalar sınırlı sayıdadır. İlk çalışmalardan biri Çınar (1974) tarafından yapılan hıyar köşeli yaprak lekesi hastalığı etmeni ***P. syringae*** pv. ***lachrymans*** ile bulaşık hıyar tohumlarında etmenin yaşam süresi, bu tohumlardan gelişen fidelerdeki bulaşıklık oranı ve tohum ilaçlaması olarak etkili preparatların belirlenmesi üzerine detaylı çalışmalardır. Yapılan çalışmada etmenin hıyar tohumlarında 16 ay yaşamını devam ettirebildiği ve bunlardan gelişen fidelerde tipik hastalık belirtilerin gözlendiği bildirilmiştir.

Diğer detaylı bir çalışma ise Karaca ve Demir (1988) tarafından yapılan bazı kültür bitkilerinde tohumla taşınan bakteriyel etmenler üzerinde araştırmalardır. Bu çalışmada 484 tohumluk incelemeye alınmıştır. Domates tohumlarında ***P. syringae*** pv. ***tomato, Corynebacterium michiganense*** pv. ***michiganense, X. campestris*** pv. ***vesicatoria***; fasulye tohumlarından ***Pseudomonas syringae*** pv. ***phaseolicola*** ve ***X. campestris*** pv. ***phaseoli***; hıyar tohumlarında ***P. syringae*** pv. ***lachrymans***; biber tohumlarında ***X. campestris*** pv ***vesicatoria***; karnabahar tohumlarında ***P. syringae*** pv. ***maculicola***; bezelye tohumlarında ***P. syringae*** pv. ***pisi***'yi saptamışlardır.

Demir ve Üstün, (2001) ülkemize giriş yapan çeşitli sebze tohumlarında karantinaya dahil etmenleri aramışlar ve ***Clavibacter michiganensis, P. phaseolicola, P. viridiflava, X. carotoe*** ve ***Acidovorax. citrulli***'yi çeşitli sebze bitki tohumlarından izole etmişlerdir.

Aysan ve Çınar (2002) topladıkları 47 farklı domates tohum örneğinden birinin ***Pseudomonas syringae*** pv. ***tomato*** ile bulaşık olduğunu saptamışlardır. Tohumdan bakterinin saptanmasında immunofloresan (IF), besi yerinde gelişme ve fidede belirti izleme yöntemlerini kullanmışlardır.

Aysan ve ark., (2005a) *Erwinia carotovora* subsp *carotovora* ve *Erwinia chrysanthemi'*nin domates tohumları ile taşınmasını araştırmışlar ve etmenleri bulaşık domates tohumlarından gelişen fidelerde saptamışlardır. Tohumda bulunan inokulumun eliminasyonunda farklı derecelerdeki sıcak su, NaOCl, HCI, bakır asetat, 8-hydroxyquinoline, bronopol ve streptomycin uygulamalarının antibakteriyel etkinliği ve tohum çimlenmesine olan etkisini belirlemişlerdir. Uygulamaların etkinliği ve çimlenme %'deleri dikkate alındığında *Erwinia carotovora* subsp *carotovora*'ya karşı % 1'lik NaOCl'ye 3 dakika daldırma, *Erwinia chrysanthemi*'ye karşı ise 0.6M HCl'ye 30 dakika, % 1'lik NaOCl'ye ise 3 dakika daldırma önermişlerdir.

Mirik ve ark., (2005) Adana ili Karaisalı ilçesinde kullanılan biber tohumlarında *Xanthomonas axonopodis* pv *vesicatoria'*nın bulaşıklığını saptamışlar ve ilk inokulum kaynaklarını azaltmak için çeşitli fiziksel ve kimyasal tohum uygulamalarının etkisini ortaya koymuşlardır. Tohumlarda bakterinin saptanmasında yarı seçici besi yeri, kotiledon ve immunofloresans (IFAS) testlerini kullanmışlardır. *Xanthomonas.axanpodis* pv.*vesicatoria* yarı seçici besi yeri olan Tween B ortamında açık sarı, çevresi beyaz bir hale ile çevrili tipik koloniler geliştirmiştir. Kolonilerin tanısı klasik testler yanında ELISA ve PCR ile desteklenmiştir. Bulaşık olarak bulunan tohumlara streptomisin, bakır asetat, bronopol, hydroxyquinoline, HCl, NaOCl, ve sıcak su uygulamalarının etkileri belirlenmiştir. Uygulamaların hiçbiri tohum çimlenmesini olumsuz yönde etkilememiştir.

Geylani ve Saygılı, (2005) domates tohumlarında bakteriyel etmenleri belirlerken farklı yöntemleri karşılaştırmışlardır. Bursa yöresinde sanayi domatesi üretiminde kullanılan tohumlarda *Clavibacter michiganensis*'in bulaşıklığını saptamışlardır. Etmenin domates tohumlarında aranmasında (International Seed Testing Association) ISTA'nın norm ve kuralları uygulamışlardır. Çalışmada *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in tohumla taşınan diğer bakterilerden ayırt edilmesinde biyoteknolojik yöntem olarak PCR'ı kullanılmıştır.

2. 3. Brassicaceae Familyasında Görülen Tohum Kaynaklı Bakteriyel Etmenlerle İlgili Çalışmalar

Franken ve ark., (1991), lahanagil tohumlarından *Xcc*'yi saptarken uygun petri ekim tekniklerini karşılaştırmışlardır. Geleneksel yöntem olarak, tohumlar 2.5 saat oda sıcaklığında çalkalandıktan sonra 1.5 saat buzdolabında tutulup santrifüjlemeyle elde edilen bakteri besi yerine yayılır. Bunun yerine tohumlar 5 dakika oda sıcaklığında çalkalandıktan sonra seçici besi yerlerine (NSCA, NSCAA ve FS) ekim yapıldığında diğer geleneksel yönteme göre bir fark elde edilmemiştir. Ayrıca NSCA, NSCAA ve FS seçici besi yerleri arasında, bakteri popülasyonu açısından herhangi bir farkın olmadığı bildirilmiştir. Karantina laboratuarında testlerin daha hızlı sonuçlandırılmasında bu yöntemden faydalanılabileceği vurgulanılmıştır.

Shiomi ve ark., (1991) *Xcc* ile doğal bulaşık ve yapay olarak patojenle bulaştırılmış tohumlarda patojeni yok etmek için farklı derecedeki sıcak hava ve sürelerinin etkinliğini araştırmışlardır. Ayrıca bu uygulamaların tohum çimlenmesine olan etkisini ortaya koymuşlardır. Yapay olarak patojenle bulaştırılmış tohumlara 7 gün 75°C'deki sıcak hava uygulaması yapıldığında patojenin tohumdan yok olduğu saptanmıştır. Doğal olarak patojenle bulaşık tohumlar, 6 gün 70°C'deki sıcak hava veya 2 gün 75°C'deki sıcak hava uygulamasıyla tohumdaki patojenin yok olduğu belirlenmiştir. 70°C'deki sıcak hava uygulaması tohum çimlenmesine herhangi bir olumsuz etki yaratmazken 75°C'deki sıcak hava çimlenmeye olumsuz etki yapmıştır. Tohumlara ön kurutma yapılması da başarıyı artırmıştır. Sonuç olarak, bulaşık tohumlardan patojenin temizlenmesinde 40°C'de 24 saat ön kurutma yapıldıktan sonra 5-7 gün 70°C'deki sıcak hava uygulaması önerilmiştir.

Chang ve ark., (1991) lahanagil tohumlarından *Xcc*'nin izolasyonunda seçici bir besi yeri geliştirmişlerdir. İlk adımda bu patojenin gelişimini engellemeyen fakat diğerlerinin gelişimini sınırlayan antibiyotikleri tespit etmişlerdir. CS20A yarı seçici besi yerine antibiyotik olarak bacitracin, neomycin ve cycloheximide ekleyerek besi yerine daha fazla seçicilik kazandırmışlardır. Yeni geliştirilen bu besi yerine CS20ABN adı verilmiştir. Bu besi yerinde *Xcc* kolonileri NSCA, NSCAA ve FS besi yerlerine göre daha büyük koloniler geliştirmiştir.

Franken (1992a), lahanagil tohumlarından *Xcc*'yi saptarken immunofloresan mikroskopi (IF) tekniğinde kullanmak üzere monoklonal ve poliklonal antiserumlar üretmişlerdir. Lahanagil tohumları iki farklı çalkalama (oda sıcaklığında 2.5 saat ve ek olarak 5 dakika) şekliyle hazırlanmış ve üretilen antiserumlar tek tek ve karışım halinde IF testinde kullanılmıştır. Şüpheli izolatların ayrıca patojeniteleri de testlenmiştir. Kullanılan antiserum monoklonal ve poliklonal oluşu ve patojenite testleri arasında bir uyum belirlenmemiştir. Monoklonal antiserumun birinde saprofit bir bakteriye karşı pozitif (cross-reaksiyon) reaksiyon elde edilmiştir. Bu antiserumlar *Xcc* dışında *X. campestris* pv. *amoraciae*'ye karşı da pozitif reaksiyon oluşturmuşlardır. Sonuç olarak bu iki lahana patojenini birbirinden ayırmak için patojenite ve diğer tanı testlerinin ek olarak yapılmasının zorunlu olduğu bildirilmiştir.

Franken (1992b), lahanagil tohumlarında *Xcc*'yi ararken IF tekniği ile farklı seçici besi yeri (NSCA ve NSCAA) kullanımı arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. IF testinde mikroskopta çok sayıda floresan bakterileri görmelerine rağmen, bu örneklerden besi yerine ekim yapıldığında *Xcc*'yi elde edememişlerdir. Bu durum farklı bakterilerle (saprofit olabilir veya *X. campestris*'in farklı bir patovarı) cross-reaksiyondan dolayı olabilir. Bunun yanında IF'de negatif bulunan tohum örneklerinden besi yerine ekim yapıldığında *Xcc* izole edilmiştir. Sonuç olarak tohum örnekleri testlenirken her iki yöntemin kombin olarak kullanımının yanı sıra tohumdan izole edilen bakterinin patojenitesinin de testlenmesini önermişlerdir.

Salcedo ve ark., (1992) *Brassica oleracea* tohumlarında bulunan *Xcc*'yi yok etmek için gamma ışını ve sodyum hipoklorit uygulamasının başarılı olduğunu belirtmişlerdir. Bu patojenin, xanthan üretimi sonucu tohumlarda yaşamını uzun süre devam ettirdiği vurgulanmıştır.

Poplawsky ve Chun (1995), ticari lahanagil tohumlarından *Xcc*'yi yakalamak için yaptıkları çalışmada, seçici besi yerinde gelişen, pek çok yönüyle *Xcc*'ye benzeyen, ancak sarı pigment oluşturmayan atipik pigmentli, patojen bir izolat elde etmişlerdir. Bu izolatın tüm hücre yağ asit içeriği, membran proteinleri, monoklonal antibadiye karşı reaksiyonu ve patojenite test sonuçlarının *Xcc*'ye son derece benzer olduğu belirlenmiştir. Sonraki 4 yıl içinde atipik pigment üreten *Xcc* izolatlarını

tohum örneklerinin % 1.8'inden tekrar izole edilmiştir. Sonuç olarak lahanagil tohumlarında bu patojeni elde etmek için yapılan testlemelerde, seçici besi yerinde gelişen sarı pigment üretmeyen *Xcc*'ye de dikkat etmek gerektiği vurgulanmıştır.

Babadoost ve ark., (1996) doğal olarak *Xcc* ile bulaşık 12 lahanagil (lahana, karnabahar ve kolirabi) tohum partisinden patojeni yok etmek için 50-53°C'deki % 0.525'lik sodyum hipoklorit uygulamasının etkinliğini araştırmışlardır. Bu uygulama 5 dakika yapıldığında 8 tohum partisindeki patojen yok olurken bakteri populasyonunun fazla olduğu tohum partilerinde uygulama süresi 10 veya 15 dakikaya çıkarıldığında başarı elde edilmiştir. Tohum bulaşıklığının çok şiddetli olduğu 3 tohum partisinde, 15 dakikalık uygulamada patojen tamamen yok olmamış ancak son derece azalmıştır. Tohum partisinin patojenle bulaşıklık düzeyine göre etki değişmekle birlikte en iyi etki 15 dakikalık uygulamada elde edilmiştir. Bu uygulamalar tohum çimlenmesini azaltmıştır, fakat yaygın olarak kullanılan sıcak su (50°C'de 20 dakika) uygulamasına göre daha az oranda tohum çimlenmesi engellenmiştir.

Roberts ve ark., (1999) lahanagillerde siyah damar çürüklüğü hastalığının ilk inokulum kaynağının bulaşık tohumlar olduğunu ve bunlardan gelişen fidelerde hastalığın çıkış durumu, üretim alanına sekonder olarak yayılmasında farklı sulama sistemlerinin etkisini araştırmışlardır. Bulaşık tohumlardan gelişen fidelerde her zaman hastalık görülmez. Hastalığın ortaya çıkışında nemin varlığı son derece önemlidir. Fideliklerde ve tarlada yağmurlama sulama kullanıldığında yaprak ıslaklığı süresi arttığından hastalık daha fazla yayılım göstermektedir.

Mguni ve ark., (1999) Afrika'da bir ülke olan Zimbabve'ye ithal gelen 102 ve 9 yerel lahanagil tohum partisinde *Xcc*'nin bulaşıklılığını araştırmışlardır. Yerli tohum partilerinden 6'sında ithal edilen tohum partilerinin 7'sinde olmak üzere toplam 13 tohum partisinde *Xcc*'yi saptamışlardır. Tohumdan izolasyonda FS ve NSCAA seçici besi yerlerini kullanmışlardır. Zimbabve'deki siyah damar çürüklüğü hastalığının çok yaygın görülme nedeninin bulaşık tohumlar olduğu belirlenmiştir.

Roberts ve ark., (2004) 107 lahanagil tohum partisinde *Xcc*'nin saptanmasında en uygun ekstraksiyon yönteminin belirlenmesi için bir araştırma yapmışlardır. Tohum partisinden 5.000 ve 10.000 alt tohum örnekleri alarak çalışmayı iki kez

tekrarlamışlardır. Tohumlar salin buffer (% 0.85 NaCl tuzlu su eriği) içinde çalkalandıktan sonra santrifüjlenmiş ve 5 dakika yeniden çalkalanmıştır. Daha sonra seyreltme serileri hazırlanarak FS ve NSCAA veya mCS20ABN besi yerine yayma yapılmıştır. Santrüfüjden sonra yeniden 5 dakika çalkalama yapılmasıyla patojeni yakalama şansı artmıştır. Tohumlar salin buffer içinde çalkalandıktan sonra direk petriye yayma yapıldığında bakteriyi yakalama şansı azalırken santrifüjleme ve ek olarak 5 dakika çalkalamayla bakteriyi yakalama şansı %25 oranında artış göstermiştir. Karantina işlemlerinde lahanagil tohumlarından patojenleri izole ederken bu iki adımın da eklenmesi bakterinin yakalanma şansını artırmaktadır.

Berg ve ark., (2005) ve lahanagil tohumlarından *Xcc*'yi duyarlı ve kısa sürede tanılamak için bir PCR primeri tasarlamışlar ve bu primerle yapılan PCR'da *Xcc* izolatları 619 bp'lik bir bant oluşturmuştur. Tohum yıkama protokolü optimize edilerek 1 adet bulaşık tohum 10.000 lahana tohumu içine karıştırıldığında bu yöntemle tohum partisindeki düşük bakteri populasyonu saptanabilmiştir.

Berg ve ark., (2006) *Brassica* tohumlarında *Xcc*'yi duyarlı bir şekilde saptayabilmek için bir multiplex real time PCR protokolu geliştirmişlerdir. Bu yöntemle 10.000 adet lahana tohumu içine 1 adet yapay olarak patojenle bulaştırılmış tohum karıştırıldığında tohum partisinin bulaşıklılığı bu yöntemle tespit edilmiştir. Bu çalışmada ayrıca, geliştirilen real time PCR ile geleneksel PCR'ın duyarlılığı karşılaştırıldığında geleneksel PCR'da negatif bulunan düşük bakteri yoğunluğu real time PCR ile pozitif olarak saptanabilmiştir. Bu duyarlı yöntemin tohum testlemelerinde kullanılabileceği belirtilmiştir.

Zaccardelli ve ark., (2007) bitkiden ve lahanagil tohumlarından *Xcc*'yi tanılamak için PCR'a dayalı bir hızlı tanı protokolü geliştirmişlerdir. Bu çerçevede dizayn ettikleri primerle yapılan PCR'da, farklı ülkelerden çeşitli *Brassica* türlerinden izole edilen 46 *Xcc* izolatı 519 bp'lik bant oluşturmuştur. Sadece turptan elde edilen 2 izolat reaksiyon vermemiştir. Diğer *X. campestris* patovarları, *Pseudomonas* ve *Pectobacterium* türlerini içeren 39 farklı tür bu primer ile yapılan PCR da herhangi bir bant oluşturmamıştır. Geliştirilen primerin *Xcc*'ye spesifik olduğu ve hızlı sonuç vermesi nedeniyle karantina kuruluşlarında kullanılabileceği belirtilmiştir.

3. MATERYAL VE METOD

3. 1. Materyal

Bölge izolatları, referans kültürler (Çizelge 3. 1), çeşitli firmalardan (Akdeniz, Arzuman, Batı Asya, Biotek, Bursa, Çukurova, Güney, Manier, May, Pinapeer, Potlar ve Toros) temin edilen 13 adet lahana, 1 adet karnabahar ve 2 adet kırmızı lahana olmak üzere toplam 16 adet lahanagil (*Brassica* spp.) tohumları ve fideleri, besi yerleri (FS, mCS20ABN, BSCAA NSCAA, YDC ve King B), çeşitli kimyasallar, plastik ve cam malzeme, ELISA malzemeleri çalışmada materyal olarak kullanılmıştır.

İlaçlı tohumlar kullanıldığında ISTA'nın önerdiği test performansında başarı düzeyi azaldığından tercihen ilaçsız tohumlar kullanılmıştır.

Çizelge 3. 1. Çalışmada Kullanılan Referans İzolatlar

Referans İzolat	**Patojen Bakteri**	**Alınan Kişi**	**Alınan Yer**
Lah Ant 1	*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*	Dr. Mustafa Mirik	Namık Kemal Üniversitesi, Tekirdağ
GSPB 382	*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*	Dr. Klaus Rudolph	Georg August Üniversitesi, Almanya
GSPB 1405	*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*	Dr. Klaus Rudolph	Georg August Üniversitesi, Almanya
GSPB 224	*Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*	Dr. Klaus Rudolph	Georg August Üniversitesi, Almanya
GSPB 2097	*Pseudomonas cichorii*	Dr. Klaus Rudolph	Georg August Üniversitesi, Almanya
GSPB 1224	*Pseudomonas corrugata*	Dr. Klaus Rudolph	Georg August Üniversitesi, Almanya
58/1	*Erwinia amylovora*	Dr. Yeşim Aysan	Çukurova Üniversitesi, Adana

3. 2. Metod

3. 2. 1. Brassicaceae Familyasına Ait Bitki Tohumlardan Bakteriyel Patojenlerin İzolasyonu

Geng ve ark., (1987), Roberts ve ark., (1993) ve Roberts ve ark., (1999)'in bildirdiğine göre çalışma örneği olarak Brassicaceae familyasına ait bitki tohumlarından minimum 10.000 adet tohum (yaklaşık 40-45 g) kullanılmıştır. Aynı tohum partisinden olan tohumlar ilk defa kullanılan naylon torbalar içinde birleştirilmiştir. 10 ml yıkama solüsyonu içine 1000 adet tohum hesabıyla solüsyon miktarı tohum miktarına göre ayarlanmıştır.

Xanthomonas izolasyonu için Ek-1'de verilen FS, NSCAA, mCS20ABN ve BSCAA (Randhawa ve Schaad, 1984) yarı seçici besi yerleri ile genel bir besi yeri olan YDC, *Pseudomonas* ve *Erwinia* izolasyonu için King B besi yerleri (Schaad, ve ark., 2001) kullanılmıştır (Ek 1). Tohum örneklerinin her bir seyreltmesi için tüm besi yerlerinden 3 tekrarlı olarak 9 cm'lik plastik petrilere dökülmüş besi yerleri kullanılmıştır. Çalışma esnasında dışarıdan olabilecek bulaşmaları önlemek için çalışılacak yerler, eller ve tüm yüzeyler bir el pompası içine konan % 70'lik alkolle silinerek yüzeyden dezenfekte edilmiştir.

Brassicaceae familyasına ait bitki tohumlarından *Xanthomonas, Pseudomonas* ve *Erwinia* cinsine ait patojen bakterin izolasyonu hedeflenmiştir. Brassicaceae familyasına ait bitki tohumlarından tohumlarından *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*'in izolasyonu için ISTA'nın 2005 yılında modifiye ettiği yöntem kullanılmıştır (Schaad ve Franken, 2006). Bu yöntem aşağıda ayrıntılı olarak verilmiştir.

1. Toplam 10.000 adet tohum örneği % 0.85 salin buffer'ın içine % 0.02 oranında Tween 20 eklenerek hazırlanan 100 ml yıkama solüsyonu içerisinde 2-4 ºC'de 1.5 saat ve daha sonra oda sıcaklığında (20-25 ºC) 2.5 saat 100-125 rpm'de dönen bir çalkalayıcıda çalkalanmıştır.

2. Tohumlar tülbentle süzülerek uzaklaştırılmış ve yıkama solüsyonu 5.000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenerek pellet elde edilmiştir. Pellet 2 ml yıkama

solüsyonuyla sulandırılmış ve tekrar 5 dakika çalkalanmıştır (Franken ve ark., 1991). Bu tohum ekstraktından 500 µl alınarak tüplerde bulunan 4.5 ml saline buffer'a konularak seyreltme serileri hazırlanmıştır.

3. Tohum ekstraktından ve son iki seyreltmelerden 100 µl alınarak yukarıda belirtilen besi yerlerine 3 tekrarlı olarak cam bagetle yayma yapılmıştır (Koenraadt ve ark., 2004).

4. Pozitif kontrol olarak Lah Ant 1 kodlu *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* ve GSPB 1405 kodlu *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* referans izolatlarından yaklaşık 10^8 hücre/ml yoğunluğunda süspansiyonlar hazırlanmıştır. Hazırlanan süspansiyonlardan 6 kez seyreltme yapılarak son 4, 5 ve 6'ıncı seyreltmeden 100 µl alınarak 3 tekrarlı olarak 9 cm'lik plastik petrilerde bulunan FS, NSCAA, mCS20ABN, BSCAA ve YDC besi yerlerine *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* için, King B besi yerine *Pseudomonas* ve *Erwinia* için yayma yapılmıştır. FS, NSCAA, mCS20ABN ve BSCAA besi yerlerinin seçiciliği nişasta hidrolizasyonuna dayanmaktadır. Nişasta hidrolizasyonu sonucu oluşan zonların daha belirgin olması için petriler kullanmadan önce 48 saat buzdolabında bekletilmiştir. Bu şekilde patojenlerimizin farklı besi yerlerinde oluşturduğu koloni morfolojisi daha kolay ayırt edilebilmiştir.

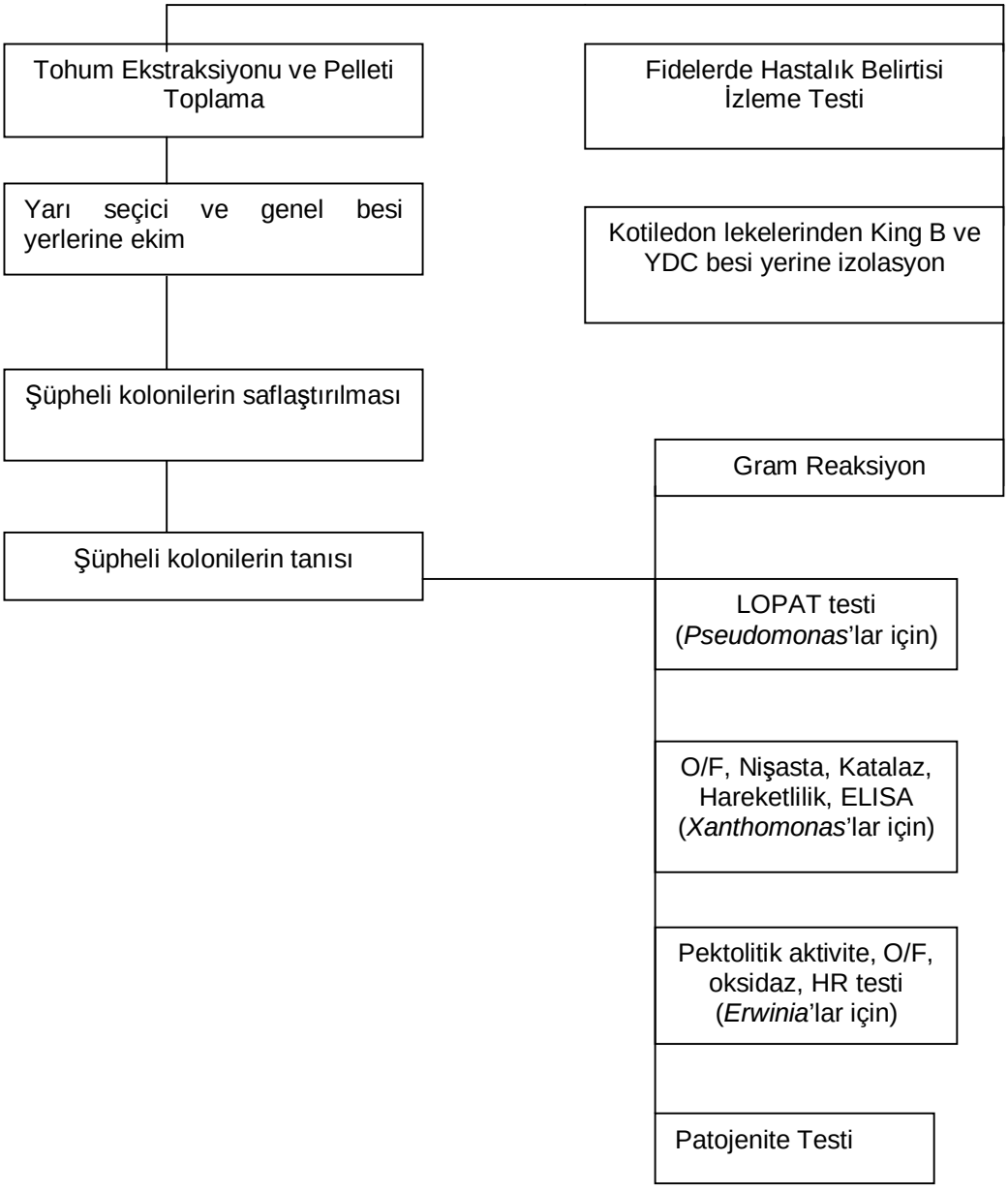
5. Negatif Kontrol olarak tohum eklenmemiş yıkama solüsyonundan 100 µl alınarak 3 tekrarlı olarak yukarıdaki besi yerlerine ekim yapılmıştır. Petriler 3-4 gün 28-30°C'de inkübe edilmiştir. Besi yerlerinde bakteri gelişimi olursa temiz çalışılmadığının göstergesidir.

6. Petriler 28-30°C'de 3-4 gün inkübe edildikten sonra referans izolatların koloni morfolojisi ile tohum ekstraktından gelişen bakterilerin koloni morfolojileri karşılaştırılarak saflaştırmalar yapılmıştır. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* için FS, NSCAA, mCS20ABN ve BSCAA besi yerlerinde zon oluşturan bakteriler seçilerek saflaştırılmıştır. Nişasta hidrolizasyonu sonucu oluşan zonların daha belirgin olması için bu besi yerlerini içeren petriler değerlendirilmeden önce bir kaç saat 4°C'de bekletilmiştir.

7. Ayrıca her bir tohum partisinden saflaştırılan şüpheli kolonilerin listesi hazırlanmıştır.

8. Şüpheli kolonilerin tanısı farklı besi yerlerinde morfolojik gelişim yanında, fizyolojik, biyokimyasal testler, patojenite testi ve ELISA ile yapılmıştır. *Xanthomonas*'lar için gram reaksiyon, Oksidatif/Fermantatif (O/F) testi, Nişasta hidrolizasyonu, Katalaz testi, Hareketlilik testi ve ELISA kullanılırken *Pseudomonas*'lar için gram reaksiyon, SNA'da levan tip koloni oluşumu, oksidaz reaksiyonu, patates dilimlerinde pektolitik aktivite, arginin dehidrolaz aktivitesi, tütünde aşırı duyarlılık reaksiyonu testleri uygulanmıştır. *Erwinia*'lar için gram reaksiyon, patates dilimlerinde pektolitik aktivite, O/F, oksidaz ve tütünde aşırı duyarlılık reaksiyonu testleriyle şüpheli izolatların tanısı gerçekleştirilmiştir.

9. Ayrıca 16 adet lahanagil tohum partisinden her birinden 600 adet tohum (100 adet x 6 küvet) 10 x 15 cm'lik plastik küvetlere ekilerek iklim odasında çimlendirilmiş ve fidelerde hastalık belirtisi izleme testi uygulanmıştır. Tohum çimlenmesi ile birlikte her gün fideler incelenmiş ve fideler bir haftalık olduğunda kotiledon yapraklarda leke var/yok şeklinde değerlendirme yapılmıştır. Her bir tohum partisi için çimlenen tohum sayısı, lekeli fide sayısı not edilmiştir. Kotiledon lekelerinden King B ve YDC besi yerlerine izolasyon yapılmış, izolasyon petrileri 72-96 saat 25ºC'de inkübe edildikten sonra şüpheli koloniler saflaştırılmıştır. Şüpheli kolonilerin tanısı daha önce anlatılan yöntemlerle Şekil 3. 1'de belirtildiği gibi yapılmıştır.



Şekil 3. 1. Brassicaceae familyasına ait bitki tohumlarından bakteriyel patojenlerin aranmasında takip edilen aşamalar

3. 2. 2. Brassicaceae Familyasına Ait Bitki Tohum ve Fidelerinden İzole Edilen Bakteriyel Patojenlerin Tanısı

Brassicaceae familyasına ait bitki tohumlarından izole edilen bakterilerin ve fidede belirti izleme testinde kotiledon yapraklarda görülen lekelerden yapılan izolasyonda elde edilen bakterilerin tanısı için morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal testlerden yararlanılmıştır. Tanı sonucunu desteklemek için ticari antiserumu bulunan *Xcc* için ELISA testi kullanılmıştır. Tanı testlerinde karşılaştırma olarak referans izolatlar kullanılmıştır.

İlk adım olarak şüpheli izolatların potasyum hidroksit testi ile gram reaksiyonu saptanmıştır. Daha sonra sarı renkli izolatların nişasta hidrolizasyonu, floresan izolatların tütünde aşırı duyarlılık reaksiyonları, krem renkli izolatların patates dilimlerindeki pektolitik aktivite yetenekleri ve tütünde aşırı duyarlılık reaksiyonları ortaya konmuştur. Gram negatif, sarı renkli, nişastayı hidrolize eden izolatlar, floresan, tütünde aşırı duyarlılık reaksiyonları pozitif olan izolatlar ve krem renkli pektolitik enzim üreten izolatlar seçilerek tanıları üzerine detaylı çalışmalar yapılmıştır.

Şüpheli izolatların YDC ve King B besi yerlerindeki koloni morfolojileri de belirlenmiştir. Ayrıca *Xanthomonas*'lar için yarı seçici besi yeri olan FS, NSCAA, mCS20ABN ve BSCAA besi yerlerinde koloni morfolojisi incelenmiştir.

King B besi yerinde floresan pigment oluşturan ve tütünde aşırı duyarlılık reaksiyonları pozitif olan izolatların bir *Pseudomonas* cinsine ait olduğu düşünülerek tanısında LOPAT (SNA'da levan tip koloni oluşumu, oksidaz reaksiyonu, patates dilimlerinde pektolitik aktivite, arginin dehidrolaz aktivitesi, tütünde aşırı duyarlılık reaksiyonu) testlerden faydalanılmıştır.

King B besi yerinde floresan pigment oluşturmayan, krem renkli ve patates dilimlerinde pektolitik enzim üreten izolatların bir *Erwinia* cinsine ait olduğu düşünülerek, Oksidatif/Fermantatif (O/F) ve oksidaz reaksiyonları saptanmıştır.

Genel besi yerleri olan YDC ve King B besi yerlerinde sarı koloni morfolojisine sahip, gram negatif ve nişastayı hidrolize eden izolatların *Xanthomonas* cinsine ait olduğu düşünülerek, katalaz, O/F reaksiyonu ve hareketlilik

özelliği belirlenmiştir. Bunun yanında serolojik tanı için *Xcc* için üretilen antiserumla indirek-ELISA testi uygulanmıştır.

Şüpheli izolatların tümü lahana fidelerine inokule edilerek patojeniteleri saptanmıştır. Çalışmada kullanılan besi yerleri ve kullanılan testlerin detayı aşağıda sunulmuştur.

3. 2. 2. 1. Farklı Besi Yerindeki Koloni Morfolojileri

King B besi yerinde koloni morfolojisi: Lahana izolatları taze hazırlanmış King B (Ek 1) besi yeri içeren petrilere üç çizgi yöntemiyle aşılanmıştır. Petriler 48-60 saat 25ºC'de inkübe edildikten sonra koloni gelişimine göre değerlendirilmiştir (King ve ark., 1954). Bu besi yerinde *Pseudomonas* türleri yeşil floresan, *Ewinia* türleri floresan olmayan krem renkli ve *Xanthomonas* türleri sarı renkli koloniler üretirler.

YDC besi yerinde koloni morfolojisi: Lahana izolatları taze hazırlanmış YDC (Ek 1) besi yeri içeren petrilere üç çizgi yöntemiyle aşılanmıştır. Petriler 72-96 saat 25ºC'de inkübe edildikten sonra koloni gelişimine göre değerlendirilmiştir (Lelliot ve Stead, 1987). Bu besi yerinde *Pseudomonas* ve *Ewinia* türleri krem renkli koloniler üretirken *Xanthomonas* türleri açık sarı ve mukoid koloniler üretirler.

FS besi yerinde koloni morfolojisi: *Xanthomonas* türlerine ait olduğundan şüphelenilen lahana izolatları taze hazırlanmış FS (Ek 1) besi yeri içeren petrilere üç çizgi yöntemiyle aşılanmıştır. Petriler 72-96 saat 25ºC'de inkübe edildikten sonra *Xanthomonas* türleri küçük, mat yeşil, mukoid, etrafında nişastayı hidrolize eden zonlar şeklinde gelişen koloniler üretmişlerdir (Schaad, 1989; Yuen ve ark., 1987).

mCS20ABN besi yerinde koloni morfolojisi: *Xanthomonas* türlerine ait olduğundan şüphelenilen lahana izolatları taze hazırlanmış mCS20ABN (Ek 1) besi yeri içeren petrilere üç çizgi yöntemiyle aşılanmıştır. Petriler 72-96 saat 25 ºC'de inkübe edildikten sonra *Xanthomonas* türleri 1-2 mm çapında, mat sarı, mukoid, etrafında nişastayı hidrolize eden zonlar şeklinde gelişen koloniler üretmişlerdir (Chang ve ark., 1991).

BSCAA besi yerinde koloni morfolojisi: *Xanthomonas* türlerine ait olduğundan şüphelenilen lahana izolatları taze hazırlanmış BSCAA (Ek 1) besi yeri içeren petrilere üç çizgi yöntemiyle aşılanmıştır. Petriler 72-96 saat 25ºC'de inkübe edildikten sonra *Xanthomonas* türleri açık yeşil, mukoid, etrafında nişastayı hidrolize eden zonlar şeklinde gelişen koloniler üretmişlerdir (Randhawa ve Schaad,1984).

NSCAA besi yerinde koloni morfolojisi: *Xanthomonas* türlerine ait olduğundan şüphelenilen lahana izolatları taze hazırlanmış NSCAA (Ek 1) besi yeri içeren petrilere üç çizgi yöntemiyle aşılanmıştır. Petriler 72-96 saat 25ºC'de inkübe edildikten sonra *Xanthomonas* türleri sarı mukoid kolonilerin etrafında nişastayı hidrolize eden zonlar şeklinde gelişen koloniler üretmişlerdir.

3. 2. 2. 2. Potasyum Hidroksit (KOH) Testiyle Gram Reaksiyon

Taze hazırlanan %3'lük potasyum hidroksit solüsyonundan lam üzerine bir damla damlatıldıktan sonra lahana izolatlarının 48 saatlik kültüründen platin özeyle alınan bakteri, solüsyona dairesel hareketlerle karıştırılmıştır. 15-20 saniye sonra öze yukarı kaldırıldığında viskoz, yapışkanımsı bir sünmenin oluşması gram negatif olarak değerlendirilmiştir (Sands, 1990). Kontrol olarak gram pozitif özelliğine sahip *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (GSPB 382) kültürü ve gram negatif özelliğe sahip *Pseudomanas cichorii* (GSPB 2097) kültürü kullanılmıştır.

3. 2. 2. 3. Nişasta Hidrolizasyonu

Nişastanın hidrolizi için litrede 23 gram nutrient agar içeren besi yeri içerisine % 2 oranında eriyebilir nişasta ilave edilmiştir. Bunun için 10 ml distile suda eritilen nişasta ısıtılarak çözüldükten sonra nutrient agara ilave edilmiş ve 121ºC'de 15 dakika otoklav edilip steril petrilere dökülmüştür. Besi yerine çizilen lahana izolatları ve Lah Ant 1 kodlu *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*'in referans kültürü 7-14 gün 25 ºC'de inkübasyondan sonra kültürler üzerine lugol eriği (1g iyot ve 2 g KI 300 ml distile suda eritilmiştir) dökülmüştür. Gelişen bakteri kolonisi çevresinde meydana gelen boyanmamış alanın varlığı pozitif olarak değerlendirilmiştir (Lelliot

ve Stead, 1987). Pozitif kontrol *Xanthomonas vesicatoria* (GSPB 224) ve negatif kontrol *Erwinia carotovora* subsp *carotovora* (GSPB 1405) kullanılmıştır.

3. 2. 2. 4. Levan Oluşumu

Nutrient Agar besi yerine % 5 oranında sakkaroz (sukroz) eklenerek hazırlanan Sukroz Nutrient Agar (SNA) besi yerine (EK 1) lahana izolatları çizildikten sonra 25°C'de 3-4 gün inkübe edilmiştir. Kalın, beyaz, konveks, mukoid koloniler pozitif olarak değerlendirilmiştir (Lelliott ve Stead, 1987). Pozitif kontrol olarak 58/1 kodlu *Erwinia amylovora* referans kültürü kullanılmıştır.

3. 2. 2. 5. Oksidaz Testi

Taze hazırlanan %1'lik N;N;N;N'-Tetramethyl-1.4 phenylene diammonium diclorid eriği steril filtre kağıdına damlatılmıştır. Lahana izolatlarının 48 saatlik kültürü platin öze ile ıslak kurutma kağıdına çizildiğinde 10 saniye içinde oluşan koyu mor renk pozitif olarak değerlendirilmiştir (Lelliott ve Stead, 1987). Pozitif kontrol olarak *Pseudomonas cichorii* (GSPB 2097) kültürü kullanılmıştır.

3. 2. 2. 6. Pektolitik Aktivite Testi

Patates yumruları yüzeysel sterilizasyon için önce deterjanlı suda fırçalanarak yıkamış ve daha sonra % 1'lik NaOCl'da 3 dakika bekletilmiştir. NaOCl'yi uzaklaştırmak için 3 kez steril saf su ile durulanmıştır. Bu işlemden sonra steril bir bisturi ile kabukları soyulmuştur. Steril ıslak filtre kağıdı içeren steril petri içine kabuğu soyulmuş bir cm kalınlığındaki patates dilimleri yerleştirilmiştir. Bir öze dolusu lahana izolatlarının kültüründen alınıp patates dilimi üzerine bulaştırılmıştır. 25°C'de iki günlük inkübasyondan sonra değerlendirme yapılmıştır. İnokule edilen bölgedeki yumuşama pozitif olarak kabul edilmiştir. Pozitif kontrol olarak *Erwinia caratovora* subsp. *caratovora* (GSPB 1405) kullanılmıştır (Lelliott ve Stead, 1987).

3. 2. 2. 7. Arginin Dehidrolaz Aktivitesi

Thorney 2A (1 litre distile su, 1 g peptone, 5 g NaCl, 0.3 g K_2HPO_4, 3 g Agar, 0.01 g Phenol red, 10 g/l L-arginine) besi yerinde tüplere 3'er ml konulmuş ve otoklavda 121^oC'de 15 dakika bekletilerek steril edilmiştir. Daha sonra tüplere bakteri kültürleri aşılanmış ve üzerleri 2 ml sıvı parafinle kapatılmıştır. 7-10 gün 27^oC'de inkübasyondan sonra ortamın pembe-kırmızıya dönmesi pozitif olarak değerlendirilmiştir. Arginin dehidrolaz aktivitesi pozitif olan GSPB 1224 kodlu *Pseudomonas corrugata* izolatı çalışmada kullanılmıştır.

3. 2. 2. 8. Tütünde Aşırı Duyarlılık Reaksiyonu

Tütün (*Nicotiana tabacum* cv Samsun N) bitkisi yaprağının alt yüzeyine damar aralarına lahana izolatlarının 10^8 hücre/ml yoğunluğundaki süspansiyonu bir enjektör yardımı ile infiltre edilmiştir. 24-48 saat sonra inokule edilen alanlarda oluşan nekrotik görünüm pozitif olarak kabul edilmiştir (Klement ve Goodman, 1967). Pozitif kontrol olarak *Pseudomonas cichorii* (GSPB 2097) kültürü kullanılmıştır.

3. 2. 2. 9. Oksidasyon/Fermentasyon (O/F) Testi

Litrede; 2 g pepton, 5 g NaCl, 0.3 g KH_2PO_4, 3 g agar, 3 ml % 1'lik bromothymolblue içeren besi yeri hazırlandıktan sonra (pH:7.2) tüplere 5'er ml konulmuştur. Otoklavdan sonra 50^oC'ye kadar soğutulan tüplerin her birine soğuk sterilizasyon yapılan % 10'luk glikoz solüsyonundan 0.5 ml ilave edilmiştir. Taze geliştirilmiş 48 saatlik lahana izolatları ve referans kültürler ile nokta aşılama yapılmıştır. Her izolat için 6 tüp kullanılmıştır. Bu tüplerin içine 1 ml steril ılık vaspar (bir ölçü vaselin ve üç ölçü parafin karışımı) konarak yüzeyi kapatılmış diğer üçüne hiçbir ekleme yapılmamıştır. 25^oC'de 5-6 günlük bir inkübasyondan sonra ortam renginin sarıya dönmesi pozitif olarak değerlendirilmiştir (Sands, 1990). Kontrol olarak fermentatif özellikteki *Erwinia caratovora* subsp. *caratovora* (GSPB

1405), oksidatif özellikteki 58/1 kodlu *Erwinia amylovora* referans kültürü ve negatif kontrol olarak aşılanmamış besi yerleri kullanılmıştır.

3. 2. 2. 10. Katalaz Testi

Litrede 23 g nutrient agar ile hazırlanan besi yeri 121°C'de 15 dakika otoklav edildikten sonra petrilere dökülmüştür. 36-48 saatlik lahana izolatları ile zigzag şeklinde aşılanan petriler 25°C'de 24 saat geliştirildikten sonra üzerine 1 ml % 3'lük hidrojen peroksit dökülmüştür (solüsyon taze olarak hazırlanmış ve koyu renkli cam şişelerde muhafaza edilmiştir). Pozitif reaksiyonda birkaç saniye içinde katalaz aktivitesi sonucu açığa çıkan oksijen kabarcıkları gözle görülmüştür. Pozitif kontrol olarak *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria* (GSPB 224) izolatı kullanılmıştır (Lelliott ve Stead, 1987).

3. 2. 2. 11. Hareketlilik Testi

Litrede 10 g tryptone, 5 g NaCl ve 5 g agar (pH:6.8-7.2) içeren besi yerinden tüplere 5'er ml konulmuştur ve 121°C'de 15 dakika otoklav edilmiştir. Besi yeri yarı katı formdadır. Öze ile çizgi şeklinde yapılan inokulasyondan sonra 25°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyondan 8, 24 ve 48 saat sonra değerlendirme yapılmıştır. İnokulasyon bölgesinden çevreye doğru yayılmış bir koloni gelişimi gözlenmesi pozitif olarak değerlendirilmiştir. Pozitif kontrol olarak *Erwinia caratovora* subsp. *caratovora* (GSPB 1405) izolatı kullanılmıştır (Schaad ve ark, 2001).

3. 2. 2. 12. Patojenite Testi

Patojenite testinde *Brassica oleracea* cv. Yalova 1 çeşidi beyaz lahana tohumlarından yetiştirilmiş fideler kullanılmıştır. Tohumlar 3:2 oranında torf ve toprak karışımı içeren küvetlere ekilmiş ve iki yapraklı dönemine gelince fideler plastik saksılara (4.5x4.5) şaşırtılmıştır. Şaşırtılan fideler 25ºC sıcaklık, % 70-80 nem ve 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık koşullardaki iklim odasında muhafaza edilmiştir.

Patojenite testi yapılacak şüpheli izolatlar YDC besi yerinde 48 saat geliştirildikten sonra spektrofotometre yardımı ile yaklaşık $8x10^7$ hücre/ml konsantrasyonlarda süspansiyonlar hazırlanmıştır. Süspansiyon 3-4 yapraklı lahana fidelerinin yapraklarının alt yüzeyine püskürtülmüştür. Ayrıca, her bir kültüre ait süspansiyon steril bir kürdan veya iğneyle iki lahana yaprağının orta damarlarına batırılarak inokule edilmiştir. Patojenite testlerinde pozitif kontrol Lah Ant 1 kodlu *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* negatif kontrol olarak steril su kullanılmıştır. İnokule edilen bitkiler iklim odasına yerleştirilmiş ve yüksek nem sağlama amacıyla 24 saat süreyle ıslak polietilen torba içerisinde tutulmuştur. İnokulasyondan bir gün sonra bitkiler nem çemberinden alınmış ve günlük olarak simptom gelişimi açısından incelenmiştir. İnokulasyondan 10-14 gün sonra şüpheli izolatların bulaştırıldığı bitkilerde, yapraklarda V şeklinde sararma, nekrotik alanların varlığı veya damar siyahlaşması pozitif olarak değerlendirilmiştir (Griffiths ve Roe., 2005).

3. 2. 2. 13. Indirect-ELISA Testi

Ticari olarak Agdia firması (CAB 97000) tarafından piyasaya sunulan, *Xcc* için spesifik olan antiserumla indirek-ELISA testi, lahanagil tohumlarından ve kotiledon lekelerinden izole edilen, *Xanthomonas* cinsine ait olduğundan şüphelenilen 81 adet izolata uygulanmıştır. Indirect-ELISA testi Coligan ve ark., (1991)'e göre üç tekrarlı olarak yapılmıştır. Bu amaçla yapılan ELISA yönteminde firmanın belirttiği şartlara da dikkat edilmiştir. Negatif kontrol olarak kültür hazırlanmasında kullanılan PBS (Phoshate Buffered Saline) ve sağlıklı lahana yaprağı, pozitif kontrol olarak Lah Ant 1 kodlu *Xcc* referans izolatı kullanılmıştır. Teste kullanılan çözeltilerin içerikleri ayrıca Ek 2'de detaylı olarak açıklanmıştır. Indirect-ELISA testinde izlenen prosedür aşağıda verilmiştir.

Testlenecek izolatlar 48 saat King B besi yerinde geliştirilmiş ve bu kültürlerden birer öze alınıp 1 ml PBS içine konarak spektrometrede yoğunluğu 600 nanometrede (nm) 0.1 absorbans değerine (A_{600}: 0.1) ayarlanmıştır. Süspansiyonlar ELISA plate çukurlarına 100'er µl ve 3 tekrarlı olarak yerleştirilmiştir. Plate 37ºC'de

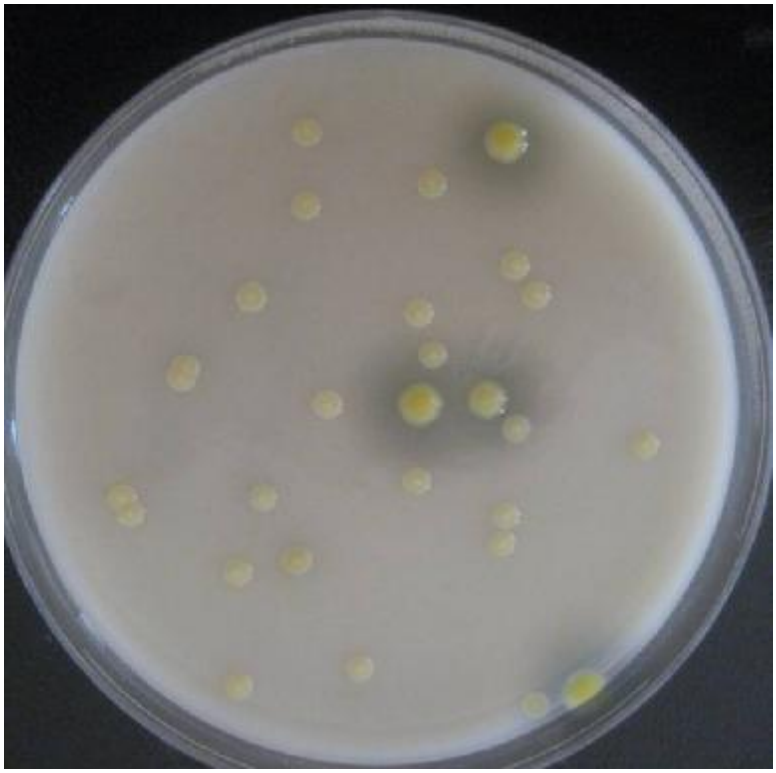
bir gece inkübe edilmiştir. PBS'e % 5 yağsız süt tozu (veya skim milk) eklenerek hazırlanan süspansiyondan her bir çukurcuğa 200 µl konulmuştur. Plate oda sıcaklığında bekletilmiştir. Plate dökülüp 5 kez yıkama tamponu (PBS+% 0.05 Tween 20) ile yıkanmıştır. Yıkama tamponu ile % 2.5'luk yağsız süt tozunun karışımıyla primer antibody hazırlanmıştır (10 ml yıkama tamponu, 0.25 g yağsız süt tozu ve 1/200 oranında sulandırılmış 50 µl antibody karıştırılmıştır). Karıştırılıp her bir çukura 3 tekrarlı olmak üzere 100 µl konulmuştur. Plate 1 saat oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edilmiştir. Plate dökülüp 5 kez yıkama tamponu (PBS+% 0.05) ile yıkanmıştır. Substrat tamponu (800 ml destile su, 0.1 g magnezyum klorid hexahidrat, 0.2 g sodyum azide, 97.0 ml diethonolamid pH:9.8) 1 mg/ml konsantrasyonda hazırlanmış (0.01 PNP (para nitrophenil phosphate) ve 10 ml substrat tamponu) her bir çukura 3 tekrarlı olmak üzere 100 µl konulmuştur. Plate oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edilmiştir. Medispec ESR-200 marka ELISA plate okuyucusunda 405 nm dalga boyunda plate çukurlarının absorbans değerleri reaksiyonun 45 dakika sonra okunarak kaydedilmiştir. Negatif kontrolde elde edilen absorbans değerinin 2 katı ve daha fazla değere sahip olan izolatlar pozitif olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

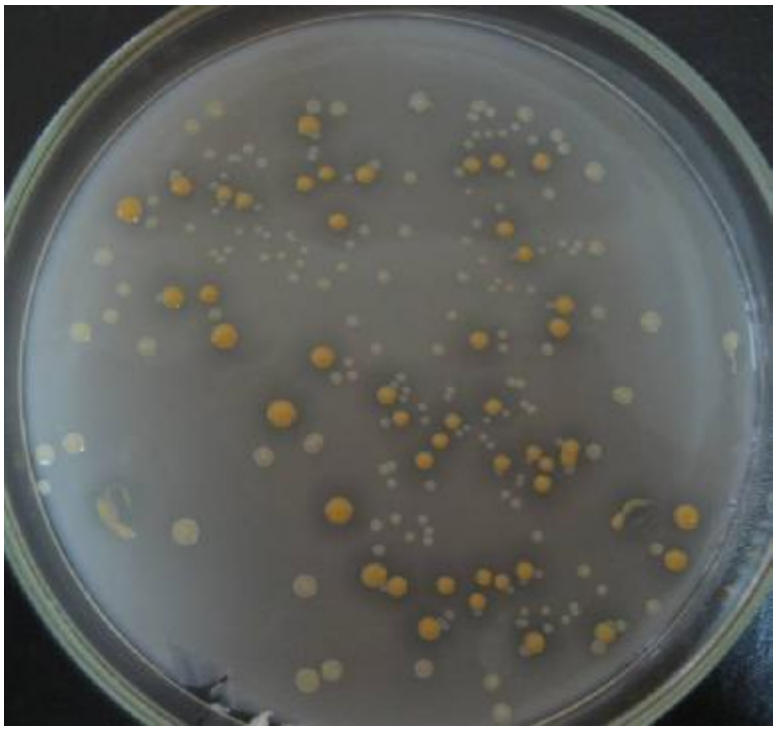
4. 1. Brassicaceae Familyasına Ait Ticari Bitki Tohumlardan Bakteriyel Patojenlerin İzolasyonu

Brassicaceae familyasına ait 16 ticari bitki tohum örneğinden *Xanthomonas* izolasyonu için farklı besi yeri yerlerine (YDC, NSCAA, mCS20ABN, BSCAA, FS) yapılan izolasyonda, *Xcc* olduğundan şüphelenilen 204 adet bakteri izolatı saflaştırılmıştır. *Xanthomonas* cinsine ait bakteriler genellikle besin olarak nişastayı kullanırlar. Bu temele dayalı olarak geliştirilen seçiçi ve yarı seçici besi yerlerinde şüpheli kolonilerin etrafında oluşan inhibisyon zonları seçimi kolaylaştırmaktadır. Karışık populasyonlar (tohum ve toprak gibi) içerisinde hedef bakteriyi yakalamak için bu tip besi yerlerinin kullanımı faydalıdır. Yar seçici besi yerlerinden bakteri seçimi öncesi petriler bir kaç saat 4°C'de bekletildiğinde oluşan zonlar daha belirgin olmuştur. Yarı seçici besi yerlerinden biri olan mCS20ABN besi yerinde 3-4 gün inkübasyondan sonra 1-2 mm çapında, mat sarı, mukoid, etrafında nişastayı hidrolize eden zonlar şeklinde gelişim gösteren bakteriler seçilerek saflaştırılmıştır (Şekil 4. 1). Petriler bir hafta daha bekletildiğinde, 10 günden sonra zonların çok daha belirginleştiği saptanmıştır (Şekil 4. 2). BSCAA besi yerinde açık yeşil, ortası daha koyu renkte, mukoid, etrafında nişastayı hidrolize eden zonlar bulunan koloniler seçilerek saflaştırılmıştır (Şekil 4. 3). FS besi yerinde 3-4 gün inkübasyondan sonra büyük, mat yeşil, mukoid, etrafında nişastayı hidrolize eden zonlar şeklinde gelişen bakteri kolonileri seçilerek saflaştırılmıştır (Şekil 4. 4). YDC besi yerinde, pozitif kontrol olarak kullanılan Lah Ant 1 kodlu *Xcc* referans izolatına benzer koloni gelişimi gösteren bir bakteriye rastlanılmamıştır.

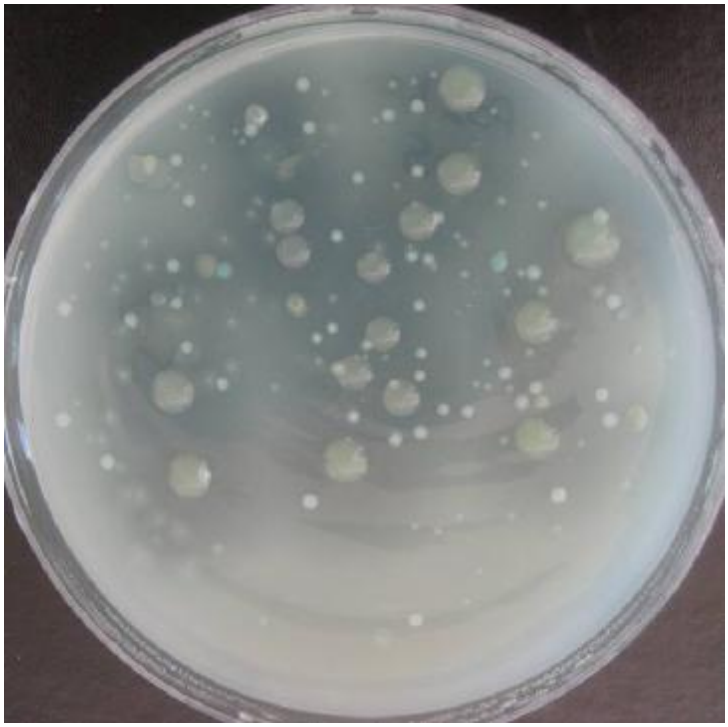
Pozitif kontrol olarak Lah Ant 1 kodlu referans izolatın yarı seçici besi yerlerine ekimiyle yukarıdaki özelliklere benzer koloniler ürettiği saptanmıştır (Şekil 4. 5 ve 4. 6). Negatif kontrol olarak tohum eklenmemiş yıkama solüsyonundan yukarıdaki besi yerlerine ekim yapıldığında herhangi bir bakteri gelişimi olmamıştır. Bu durum dışarıdan herhangi bir bulaşmanın olmadığı ve temiz bir çalışmanın yapıldığının göstergesidir.



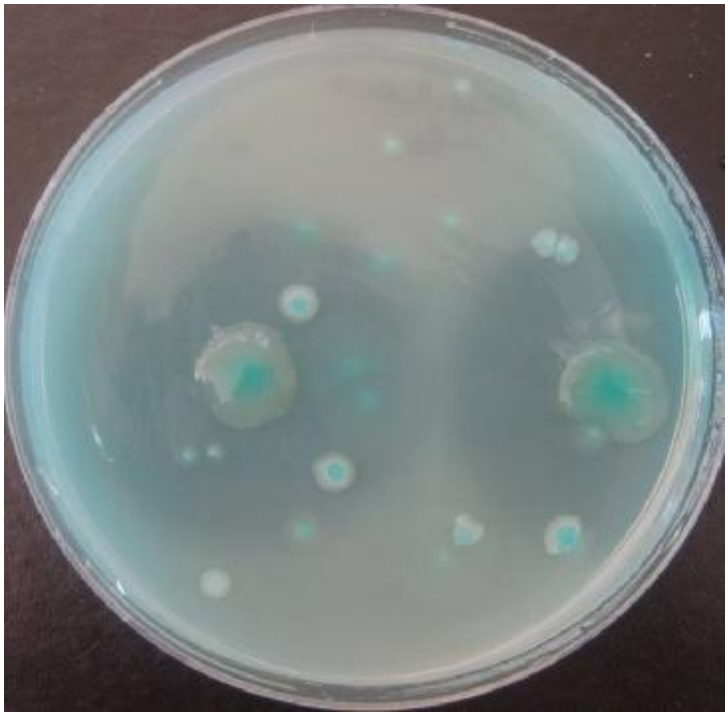
Şekil 4. 1. mCS20ABN besi yerinde 4 gün içinde zon oluşturan sarı renkli koloniler



Şekil 4. 2. mCS20ABN besi yerinde 10 gün sonra belirgin zon oluşturan koloniler



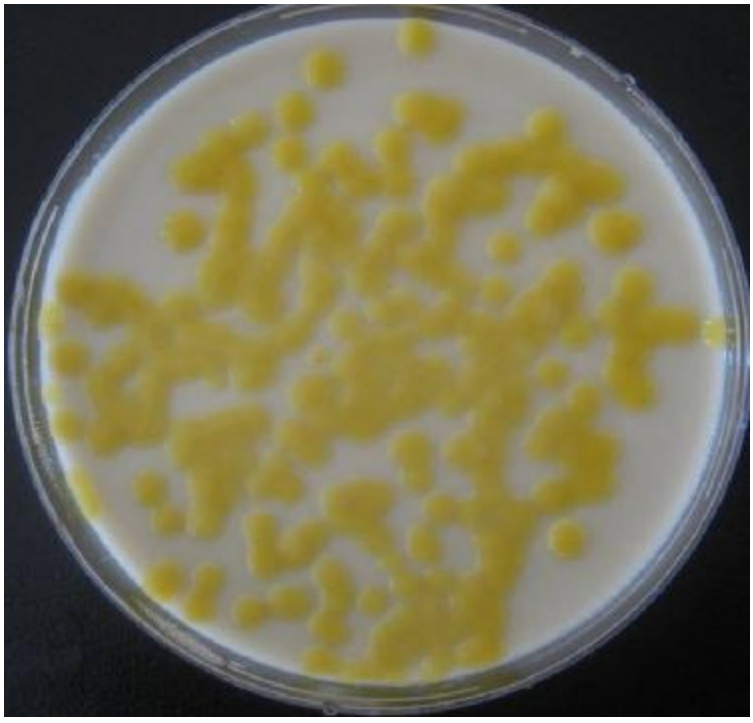
Şekil 4. 3. BSCAA besi yerinde açık yeşil, mukoid, etrafında zonlar bulunan koloniler



Şekil 4. 4. FS besi yerinde büyük, mat yeşil, mukoid, etrafında zonlar bulunan koloniler



Şekil 4. 5. mCS20ABN besi yerinde Lah Ant 1 kodlu *Xcc* referans izolatın koloni gelişimi



Şekil 4. 6. YDC besi yerinde Lah Ant 1 kodlu *Xcc* referans izolatın koloni gelişimi

Brassicaceae familyasına ait 16 ticari bitki tohum örneğinden *Pseudomonas* cinsine ait bakteri izolasyonu için King B besi yerine yapılan izolasyonda, 21 adet floresan bakteri ve *Erwinia* izolasyonu için 29 adet krem renkli bakteri saflaştırılmıştır. Toplam 245 adet bakteri tohum ekstraktından izole edilerek saflaştırılmış ve lahana patojeni olduğundan şüphelenilerek tanısı için detaylı çalışmalara alınmıştır. Çizelge 4. 1'de görüldüğü gibi, Brassicaceae familyasına ait 16 tohum örneğiyle yapılan fidelerde belirti izleme testinde, simptomolojik gözlemlere göre, tohum örneklerinde % 5.8 ile % 51.6 arasında değişen oranlarında lekeli fidelere rastlanmıştır (Şekil 4. 7 - 4. 10). Fidelerin kotiledon yapraklarındaki lekelerden yapılan izolasyonda sarı renkli 45 adet bakteri ve 56 adet krem renkli bakteri izole edilmiştir. Kotiledon lekelerinden 101 adet bakteri izole edilerek saflaştırılmış ve lahana patojeni olduğundan şüphelenilerek tanısı için detaylı çalışmalara alınmıştır.

Çizelge 4. 1. Brassicaceae familyasına ait ticari bitki tohumlarından gelişen fidelerdeki hastalık oranı (%)

Çeşit	**Bitki Türü**	**Çimlenme %'si**	**Lekeli Fide %'si**
Yalova-1	Lahana	85	18.8
Yalova-1	Lahana	78	15.4
Yalova-1	Lahana	87	09.2
Yalova-1	Lahana	61	26.2
Yalova-1	Lahana	64	51.6
Ekinci 79	Lahana	61	13.1
Ekinci 79	Lahana	71	08.5
Beyaz Lahana	Lahana	65	16.9
Beyaz Lahana	Lahana	100	13.5
Bayraklı 85	Lahana	40	27.5
Brunswick	Lahana	74	16.2
Brunswick	Lahana	29	20.7
Beyaz Sarmalık	Lahana	86	05.8
Karnabahar	Karnabahar	12	08.3
Zencibaş	Kırmızı Lahana	78	14.1
Kırmızı Lahana	Kırmızı Lahana	63	14.3

Sonuç olarak, tohum ekstraktından ve lahanagillerin kotiledon yapraklarındaki lekelerden yapılan izolasyonlarda *Xanthomonas* spp. şüphesiyle 249 adet sarı renkli bakteri kolonisi, *Pseudomonas* ve *Erwinia* şüphesiyle 106 adet (21'i floresan ve 85

krem renkli) olmak üzere toplam 355 adet bakteri kolonisi izole edilerek tanılanmaya çalışılmıştır.



Şekil 4. 7. Fidelerde belirti izleme testinde, lahana fidelerinde gözlenen kotiledon lekeleri



Şekil 4. 8. Fidelerde belirti izleme testinde, karnabahar fidesinde gözlenen kotiledon lekeleri



Şekil 4. 9. Fidelerde belirti izleme testinde, kara lahana fidesinde gözlenen kotiledon lekesi



Şekil 4. 10. Fidelerde belirti izleme testinin görünümü

4. 2. Brassicaceae Familyasına Ait Ticari Bitki Tohum ve Fidelerinden İzole Edilen Bakteriyel Patojenlerin Tanısı

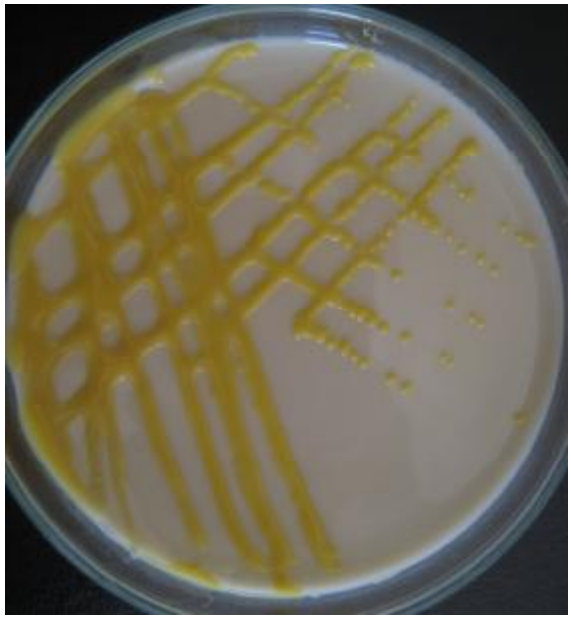
Brassica türlerine dahil farklı bitkilere ait tohumlarından ve fidede belirti izleme testinde kotiledon lekelerinden izole edilen toplam 355 adet bakteriden 318'inin gram negatif ve 37'sinin gram pozitif özellikte olduğu saptanmıştır. Gram pozitif özellikte olan bakteriler çalışma dışı bırakılmıştır.

Sarı renkli ve gram negatif özellikteki 231 adet bakterinin *Xanthomonas* cinsine ait olduğu düşünülerek, nişasta hidrolizasyonu testi ile ayrıma gidilmiş ve 81 adetinin nişasta hidrolizasyonu pozitif olarak saptanmıştır (Şekil 4. 11). Bu testte negatif sonuç veren 150 sarı renkli izolat çalışma dışı bırakılmıştır. Nişasta hidrolizasyonu pozitif olan 81 izolatın, 79 adeti tohum ekstraktından ve 2'si kotiledon lekelerinden YDC besi yeri üzerine izole edilmiştir (Şekil 4. 12). Katalaz testinde, 81 izolat besi yerinde 24 saat geliştirildikten sonra üzerine % 3'lük H_2O_2 döküldüğünde birkaç saniye içerisinde gaz kabarcıkları oluşturduğundan hepsi katalaz pozitif olarak saptanmıştır. Hareketlilik testinde ise aşılama yapılan bölgenin çevresinde koloni gelişimi gösterdiklerinden tümü pozitif olarak değerlendirilmiştir. İzolatlar sadece oksijenli besi yerinde gelişim göstererek oksidatif özellikte oldukları belirlenmiştir. Bu testlerde kontrol olarak kullanılan Lah Ant 1 kodlu *Xcc*'in referans izolatı da aynı sonuçları vermiştir (Çizelge 4. 2). Bu nedenle tümü ELISA testine alınmıştır. Agdia marka ticari tanı kiti ile yapılan indirect-ELISA testinde, 405 nm'de 81 izolatın absorbans değerleri 0.492-0.560 arasında kaydedilmiştir. Pozitif kontroldeki absorbans değeri 3.443 iken negatif kontrolde 0.520 ve 0.516 olarak belirlenmiştir. Testlenen izolatların absorbans değerlerinin negatif kontrolünün değerine yakın oluşu ve pozitif kontrolden oldukça farklı oluşuyla *Xcc* olmadığı ELISA testiyle belirlenmiştir. Patojenite testinde, 81 izolatın hiçbiri lahana damarlarında siyah çürüklüğe neden olmamıştır. Sadece pozitif kontrol olarak kullanılan Lah Ant 1 kodlu *Xcc*'in referans izolatında hastalık belirtisi gözlenmiştir (Şekil 4. 13). Tohum ekstraktından ve kotiledon lekelerinden izole edilen morfolojik olarak *Xanthomonas*'a benzeyen 81 izolatın *Xcc* olmadığı hem ELISA hem de patojenite testleriyle belirlenmiştir. Lahanagillerden 16 tohum örneği ile yapılan

çalışmada kullandığımız yönteme göre tohumların *Xcc* ile bulaşık olmadığı belirlenmiştir.



Şekil 4. 11. Nişasta hidrolizasyonu pozitif olan sarı renkli bakterinin görünümü



Şekil 4. 12. YDC besi yerinde sarı renkli gelişen bakteri



Şekil 4. 13. Patojenite testinde, Lah Ant 1 kodlu *Xcc*'in referans izolatının oluşturduğu damar çürüklüğü belirtisi

Çizelge 4. 2. *Xanthomonas* spp şüphesiyle elde edilen izolatlarla yapılan test sonuçları

Testler	**Pozitif Kontrol (Lah Ant 1)**	**Testlenen İzolatlar**
Koloni rengi	Sarı	Sarı
Gram reaksiyonu	-	-
Nişasta hidrolizasyonu	+	+
Oksidatif/Fermentatif	O	O
Katalaz	+	+
Hareketlilik	+	+
ELISA	+	-
Patojenite	+	-

Floresan renkte ve gram negatif özellikteki 21 adet bakterinin *Pseudomonas* cinsine ait olduğu düşünülerek, tütünde aşırı duyarlılık reaksiyonları ile ayrıma gidilmiş ve hiçbirinin bu testte pozitif olmadığı belirlenmiştir. Bu nedenle tohum ekstraktından izole edilen 21 izolatın tümü saprofit karakterde olduğu için izolat çalışma dışı bırakılmıştır.

Krem renkte ve gram negatif özellikteki 66 adet bakterinin floresan olmayan *Pseudomonas* veya *Erwinia* cinsine ait olduğu düşünülerek, tütünde aşırı duyarlılık reaksiyonları ile ayrıma gidilmiş ve 6 (16b, 21b, 22e, 25a, 26 ve 42a) tanesinin

tütünde aşırı duyarlılık reaksiyonu pozitif olarak saptanmıştır (Şekil 4. 14). Bu 6 izolatın 4 tanesi patates dilimlerinde çürümeye neden olarak pektolitik enzim ürettiği saptanmıştır (Şekil 4. 15). Testlerde negatif sonuç veren 60 izolat çalışma dışı bırakılmıştır. Tanı çalışmasında dahil edilen 6 izolat fidede belirti izleme testinde, lahanagillerin kotiledon lekelerinden izole edilmiştir. Bu izolatlarla yapılan LOPAT test sonuçları Çizelge 4. 3'de görüldüğü gibi, gram negatif ve krem rengindeki 4 izolat (16b, 22e, 25a ve 26) levan tip koloniler üretmiş, oksidaz reaksiyonu negatif, pektolitik aktivite pozitif, arginin dehidrolaz aktivitesi negatif ve tütünde aşırı duyarlılık reaksiyonları pozitiftir. 21b kodlu bir izolatın levan, pektolitik aktivite ve arginin dehidrolaz aktivitesi negatifken oksidaz reaksiyonu ve tütünde aşırı duyarlılık reaksiyonları pozitiftir. 42a kodlu bir izolat ise tütünde aşırı duyarlılık reaksiyonları pozitifken diğer tüm testlerde negatif sonuç vermiştir. 16b kodlu izolat Bayraklı 85 lahana çeşitlerinden izole edilirken, 21b, 22e, 25a, 26 ve 42a kodlu izolatlar Yalova-1 lahana çeşitlerinden izole edilmiştir. Kotiledon lekelerinden izole edilen bu 6 izolatla yapılan patojenite testinde, lahana yapraklarında yaş çürüklüğü ve lekelere neden olduğu saptanmıştır (4. 16). Dört izolatın yumuşak çürüklüğe neden olan *Erwinia* türlerinden biri, diğer iki izolatın ise *Pseudomonas* türlerinden biri olduğu düşünülmektedir. Tür düzeyinde tanısı ile ilgili detaylı çalışmalar devam etmektedir. Sonuç olarak, lahanagillerden 16 tohum örneği ile yapılan çalışmada, kullandığımız yönteme göre iki tohum örneğinin lahanada hastalık yapma yeteneğinde 2 farklı bakteri cinsi (*Erwinia* ve *Pseudomonas* spp.) ile bulaşık olduğu saptanmıştır.

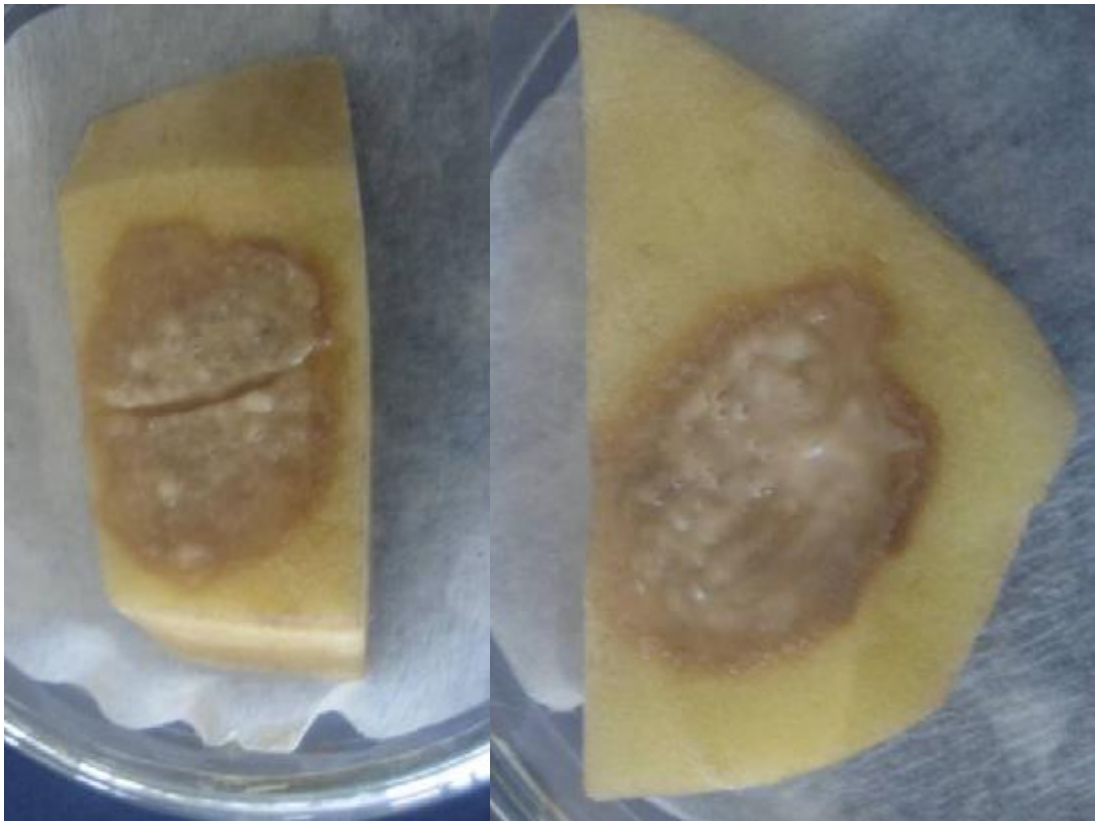
Çizelge 4. 3. *Pseudomonas* spp. veya *Erwinia* spp. şüphesi olan izolatlarla yapılan test sonuçları

İzolat adı	**Koloni rengi**	**Gram reaksiyon**	**F/NF**	**L**	**O**	**P**	**A**	**T**
16b	Krem	-	NF	+	-	+	-	+
21b	Krem	-	NF	-	+	-	-	+
22e	Krem	-	NF	+	-	+	-	+
25a	Krem	-	NF	+	-	+	-	+
26	Krem	-	NF	+	-	+	-	+
42a	Krem	-	NF	-	-	-	-	+

L: SNA'da levan tip koloni oluşumu; O: oksidaz reaksiyonu; P: patates dilimlerinde pektolitik aktivite; A: arginin dehidrolaz aktivitesi; T: tütünde aşırı duyarlılık reaksiyonu



Şekil 4. 14. Tütünde aşırı duyarlılık reaksiyonu pozitif olan izolatın oluşturduğu nekrotik görünüm



Şekil 4. 15. Pektolitik enzim üreten bakterilerin patates dilimlerinde meydana getirdiği çürüme



Şekil 4. 16. Patojenite testinde, lahana yaprağında oluşan kurumaların ve lekenin görünümü

Tohumdaki patojen bakterilerin saptanması amacıyla kullanılan yöntemlerin fazla teknik bilgiye ihtiyaç duyulmadan kolay, daha az laboratuar aletlerine ihtiyaç duyulan, ucuz, güvenilir, az miktardaki inokulum düzeyini tespit edecek duyarlılıkta ve kısa sürede sonuç veren yöntemler olması her zaman tercih edilir (Schaad, 1989; Aysan, 1999). Bu amaçla petri testleri, varsa seçici besi yeri, serolojik yöntemler (özellikle IF veya IFAS) ve patojenite testleri birlikte kullanılmalıdır (Aysan ve Çınar, 2002). Testlemelerde özellikle immunofloresan mikroskopi tekniklerinin tercih edilme nedeni, burada sadece canlı hücrelerin tespit ediliyor olmasıdır. IF için üretilmiş antiserumların ticari olarak piyasada bulunmamasından dolayı bu çalışmada immunofloresan mikroskopi teknikleri kullanılmamıştır. Ancak tohum partilerindeki bulaşıklıktan kesin olarak söz etmek için patojen bakterinin petri teknikleriyle izolasyonu ve bu bakterilerin patojenitesinin uygun konukçuda testlenmesi zorunludur (Aysan, 1999). Çalışmamızda *Xanthomonas* izolasyonu için NSCAA, mCS20ABN, BSCAA, FS gibi yarı seçici besi yeri yerlerinden, nişastayı hidrolize etme yeteneğinde 81 adet sarı bakteri izole etmemize rağmen bunların hiç birinin lahanada patojen olmadığı görülmüştür. Bu çalışmada da görüldüğü gibi patojenite testinin önemi bir kez daha ortaya çıkmıştır.

Çalışmamızda iki lahana tohum örneğinden yumuşak çürüklük *Erwinia*'ları izole edilmiştir. Bu patojen bakterinin son yıllarda ülkemizde domates (Aysan ve ark., 2005a), çeşitli sebzeler (Aysan ve ark., 2006) ve süs bitkileri (Çetinkaya-Yıldız ve ark., 2004) gibi pek çok konukçuda zarar yaptığı bilinmektedir. Yumuşak çürüklük *Erwinia* türlerinin, karantina patojeni olmaması nedeniyle, ülkemize giren veya ülkemizde üretilen çeşitlerin tohumlarında aranmasıyla ilgili, karantina kuruluşlarınca herhangi bir çalışma yapılmamaktadır. Bu etmenin Brassicaceae familyasına ait bitki tohumlarında varlığı ilk defa bu çalışmayla ortaya konmuştur. Bu patojen uygun zamanda karantina listesine dahil edilmediğinden, ülkemizde pek çok konukçu bitkide ekonomik olarak zarar vermeye devam etmektedir (Çetinkaya-Yıldız ve ark., 2004; Aysan ve ark., 2005b; Aysan ve ark., 2006).

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Bakteriyel hastalıkların ilk inokulum kaynaklarından birinin tohumlar olduğu düşünüldüğünde, bölgede kullanılan lahanagil tohumlarının bakteriyel hastalık etmenleri yönünden incelenmesi bu tezin konusunu oluşturmuştur. Adana'da çeşitli firmalardan temin edilen 13 adet lahana, 1 adet karnabahar ve 2 adet kırmızı lahana olmak üzere toplam 16 adet lahanagil (*Brassica* spp.) tohumlarında *Xanthomanas, Erwinia* ve *Pseudomonas* türlerinin varlığı ISTA'ya bağlı kuruluşlarca tercih edilen tanılama yöntemlerine göre testlenmiştir. Elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

1. Farklı Brasica spp. türlerine dahil 16 tohum örneğinden *Xanthomonas* izolasyonu için farklı besi yeri yerlerine (YDC, NSCAA, mCS20ABN, BSCAA, FS) yapılan izolasyonda, *Xcc* olduğundan şüphelenilen 204 adet sarı renkli bakteri kolonisi elde edilmiştir. *Pseudomonas* cinsine ait bakteri izolasyonu için King B besi yerine yapılan izolasyonda, 21 adet floresan bakteri ve *Erwinia* izolasyonu için 29 adet krem renkli bakteri kolonisi saflaştırılmıştır.

Farklı *Brasica* türlerine dahil 16 tohum örneğiyle yapılan fidelerde belirti izleme testinde, simptomolojik gözlemlere göre, tohum örneklerinde % 5.81 ile % 51.56 arasında değişen oranlarında lekeli fidelere rastlanmıştır (Resim 4. 7, 4. 8, 4. 9 ve 4. 10). Fidelerin kotiledon yapraklarındaki lekelerden yapılan izolasyonlarda 45 adet sarı renkli ve 56 adet krem renkli bakteri kolonisi izole edilmiştir. Kotiledon lekelerinden toplam 101 adet bakteri izole edilerek saflaştırılmış ve lahana patojeni olduğundan şüphelenilerek tanı çalışmalarına alınmıştır.

Sonuç olarak, Brassicaceae familyasına dahil ticari bu tohumlar ve bunlardan gelişen bitkilerin kotiledon yapraklarındaki lekelerden yapılan izolasyonlarda *Xanthomonas* şüphesiyle 249 adet sarı renkli bakteri, *Pseudomonas* ve *Erwinia* şüphesiyle 106 adet (21'i floresan ve 85 krem renkli) olmak üzere toplam 355 adet bakteri izole edilerek tanılanmaya çalışılmıştır.

2. Sarı renkli ve gram negatif özellikteki 231 adet bakterinin *Xanthomonas* cinsine ait olduğu düşünülerek, nişasta hidrolizasyonu testi ile ayrıma gidilmiş ve 81 adetinin nişasta hidrolizasyonu pozitif olarak saptanmıştır. 81 izolatın hepsi katalaz pozitif, hareketli ve oksidatif özellikte oldukları belirlenmiştir. Agdia marka ticari

tanı kiti ile yapılan indirect-ELISA ve patojenite testlerine göre, izolatların hiç birinin *Xcc* olmadığı saptanmıştır. Farklı Brasica spp. türlerine dahil 16 tohum örneği ile yapılan çalışmada kullandığımız yönteme göre tohumların *Xcc* ile bulaşık olmadığı belirlenmiştir.

3. Lahanagillerin kotiledon lekelerinden izole edilen krem renkte ve gram negatif özellikteki 66 adet bakterinin floresan olmayan *Pseudomonas* veya *Erwinia* cinsine ait olduğu düşünülerek, tütünde aşırı duyarlılık reaksiyonları ile ayrıma gidilmiş ve 6 (16b, 21b, 22e, 25a, 26 ve 42a) tanesinin tütünde aşırı duyarlılık reaksiyonu pozitif olarak saptanmıştır. Dört izolatın yumuşak çürüklüğe neden olan *Erwinia* türlerinden biri, diğer iki izolatın ise *Pseudomonas* türlerinden biri olduğu düşünülmektedir. Tür düzeyinde tanısı ile ilgili detaylı çalışmalar yapılamamıştır. Lahanagillerden 16 tohum örneği ile yapılan çalışmada, kullandığımız yönteme göre iki tohum örneğinin lahanada hastalık yapma yeteneğinde 2 farklı bakteri cinsi (*Erwinia* ve *Pseudomonas*) ile bulaşık olduğu saptanmıştır. Tür düzeyinde tanılanamayan bakterilerin kesin tanısı ileriki çalışmalarda yapılmalıdır.

4. Yeterli karantina önlemlerinin alınmadığı ülkemizde bu türlerin tohumla yayılması kaçınılmaz olmuştur. Tohumdaki bakteri inokulumunu saptayabilecek kolay ve ucuz yöntemler araştırılmalı ve karantina kuruluşlarımızca kullanılması gerekmektedir. Tohum firmaları üretim yaparken yer seçimine, uygun mücadele şekline dikkat etmeli ve hastalık yönünden sık sık tarla kontrolleri yapmalıdırlar. Hastalığın bulunduğu tarlalardan kesinlikle tohum alınmamalıdır.

KAYNAKLAR

AKSOY, H. M., 2007. Occurence of black rot caused by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* [(Pammel 1895) Dowson 1939] in white head cabbage (*Brassica oleraceae* var. *capitata*) growing areas in Bafra districts of Samsun province. Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Dergisi 22: 297-300.

ANONİM, 1997. 1 Tarım Şurası Sonuç Raporu, TKB, Ankara.

ANONİM, 2001. Türkiye Tarımda Kendine yeterli hale getireceğiz. TKB. Tarım ve Köy Gazetesi,

AYSAN, Y., 1999. Domates bakteriyel kara leke hastalığının (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) tanımı, ırklarının tespiti, domates tohumlarında saptanması ve kimyasal savaşıma alternatif yöntemlerin araştırılması üzerine çalışmalar. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilim Dalı, Doktora Tezi, 106 sayfa.

AYSAN, Y., ve ÇINAR, Ö., 2002. Doğu Akdeniz Bölgesi domates seralarında bakteriyel gövde nekrozu hastalığının yaygınlığı ve bu seralarda yapılan gözlemler. Türkiye IX. Fitopatoloji Kongresi.3-8 Eylül 2001.Tekirdağ.

AYSAN, Y., ÇETİNKAYA-YILDIZ, R., ÇINAR, Ö., ve SAYGILI, H., 2005a. Domateste *Erwinia carotovora* subsp.*carotovora* ve *Erwinia chrysanthemi*'ye karşı çeşitli fiziksel ve kimyasal tohum uygulamalarının etkisi. Türkiye II. Tohumculuk Kongresi, 9-11 Kasım 2005.

AYSAN, Y., SAHIN, F., ÇETİNKAYA-YILDIZ, R., MIRIK, M., and YUCEL, Y., 2005b. Occurence and primer inoculum sources of bacterial stem rot caused by *Erwinia* species on tomato in the eastern Mediterraanean region of Turkey. Journal of Plant Diseases and Protection. 112 (1) 42-51.

AYSAN, Y., M. MIRIK, N. ÜSTÜN, F. SAHIN, H. SAYGILI, 2006. Differences in symptomatic, phenotypic and genotypic characteristics of *Erwinia* and *Pseudomonas* species causing stem and pith necrosis of tomato in Turkey. 12th Congress of Mediterranean Phytopathological Union, June 11-15, 2006, Rhodes Island, Greece. 432-437.

BABADOOST, M., DERIE, M. L., and GABRIELSON, R. L., 1996. Efficacy of sodium hypochloride treatments for control of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in Brassica seeds. Seed Science and Technology 24 (1) 7-15.

BERG, T., TESORIERO, L., and HAILSTONES, D. L., 2005. PCR-based detection of *Xanthomonas campestris* pathovars in *Brassica* seed. Plant Pathology 54: 416-427.

BERG, T., TESORIERO, L., and HAILSTONES, D. L., 2006. A multiplex real-time PCR assay for detection of *Xanthomonas campestris* pathovars from brassicas. Letters in Applied Microbiology 42: 624-630.

CHANG, C. J., DONALDSON, R., CROWLEY, M., and PINNOW, D., 1991. A new semiselective medium for the isolation of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* from crucifer seeds. Phytopathology 81 (4) 449-453.

COLIGAN, J. E., KRUISBEEK, A. M., MARGULIES, D. H. SHEVACH, E. M. STROBER, W., 1991. Current Protocols in Immunology. (John Wiley & Sons) New York, chapter 2.1, 2.9.

ÇETİNKAYA YILDIZ, R., MİRİK. M., AYSAN, Y., KÜSEK, M., ŞAHİN, F., 2004. An outbreak of bacterial stem rot of *Dieffenbachia amoena* caused by *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* in the Eastern Mediterranean Region of Turkey. Plant Disease 88: 310.

ÇINAR, Ö., 1974. Hıyar köşeli yaprak leke etmeni (*Pseudomanas lachrymanas* (Smithet Bryyan) Carsner) ile bulaşık hıyar tohumlarına karşı tohum ilaçlarının saptanması, Ç.Ü. Adana, Ç.Ü Zir.Fak Yıllığı, 5 (1-2): 127-132.

ÇINAR, Ö., 1988. Bakteriyoloji. Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Ders Kitabı No 69.

DEMİR, G. ve Üstün, N., 2001. İthal ve ihraç edilen üretim materyali örneklerinde saptanan bakteriyel patojenler. IX. Türkiye Fitopatoloji Kongresi. 86-93. 3-8 Eylül, Tekirdağ.

DEMİR, İ., 2008. Kongre açılış konuşması. Sayfa 7. Türkiye III. Tohumculuk Kongresi, 25-28 Haziran 2008, Kapodokya.

ERKAN, S., 1998. Tohum Patolojisi. Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gözlem Ofis, İzmir.

FRANKEN, A. A. J. M., VAN ZEIJL, C., VAN BILSEN, J. G. P. M., NEUVEL, A., DEVOGEL, R., VAN WINGERDEN, Y., BIRNBAUM, Y. E., VAN HATEREN, J., and VAN DER ZOUWEN, P. S., 1991. Evoluation of a plating assay for *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Seed Science and Technology 19 (2) 215-226.

FRANKEN A. A. J. M., 1992a. Application of polyclonal and monoclonal antibodies fort he detection of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in crucifer seeds using immunofluorescence microscopy. Netherlands Journal of Plant Pathology 98 (2) 95-106.

FRANKEN A. A. J. M., 1992b. Comparison of immunofluorescence microscopy and dilution plating fort he detection of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in crucifer seeds.

GENG, S., CAMPBELL, R. N., CARTER, M. and HILLS, M., 1987. Quality control programs for seedborne pathogens. Plant Disease 67.236-242.

GEYLANİ, E., ve SAYGILI, H., 2005. Domates tohumlarında *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in saptanmasında Biyoteknolojik metodların kullanılması Türkiye II. Tohumculuk kongresi 9-11 Kasım 2005.

GRIFFITHS, P. D., and ve ROE, C., 2005. Response of *Brassica oleracea* var. *capitata* to wound and spray inoculations with *Xanthomonas camplestris* pv. *campestris*. Hortscience. 40 (1) 47-49.

KARACA, İ and Demir, G., 1988. Investigations on seed-borne bacterial pathogens in some plants. Doğa, Türk Tarım ve Ormancılık Dergisi, 12: 120-131.

KARGIN, 2003. http://egirdir-bahce.org/

KING, E. O., WARD, M. K., RANEY, D. E., 1954. Two simple media for the demonsration of pyocianin and flouresin. Journal of Laboratory and Clinical Medicine,44,301-307.

KLEMENT, Z., and GOODMAN, R. N., 1967. The hypersensitive reaction to infection by bacterial plant pathogens. Annual Review of Phytopathology 5:17-44.

KOIKE, S. T., GLADDERS, P., PAULUS, A. O., 2007. Vegetable Diseases A Color Handbook. Academic Press. Boston & San Diego.

KOENRAADT, H., VAN BILSEN, J. G. P. M., ROBERTS, S. J., 2004. Comparative test of four semi-selective agar media for the detection of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in brassica seeds. Seed Science and Technology 33 (1) 115-125.

LELLIOT, R. A., and STEAD, D. E., 1987. Diagnostic procedures for bacterial plant diseases. In Methods for the Diagnosis of Bacterial Diseases of Plants. Blackwell Scientific Publications, 216 pp.

MGUNI, C. M., MORTENSEN, C. N., KESWANI, C. L., and HOCKENHULL, J., 1999. Detection of the black rot pathogen (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) and other xanthomonads in Zimbabwean and imported brassica seed. Seed. Science & Technology 27(2): 447-454.

MİRİK, M., AYSAN, Y., KARATAŞ, A., ve ÇINAR, Ö., 2005. Fiziksel ve kimyasal uygulama görmüş biber tohumlarında *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*'nın aranması. Türkiye II. Tohumculuk Kongresi. 9-11 Kasım 2005.

MIRIK. M., SELCUK, F., AYSAN, Y., SAHIN, F., 2008. First outbreak of bacterial black rot on cabbage, broccoli, and brussels sprouts caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *campestris* in the Mediterranean Region of Turkey. Plant Disease 92 (1): 176.

POPLAWSKY, A. R., and CHUN. W., 1995. Strains of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* with atypical pigmentation isolated from commercial crucifer seeds. Plant Disease 79 (10) 1021-1024.

RANDHAWA, P. and SCHAAD, N.W., 1984. Selective isolation of *Xanthomonas campestris* from crucifer seeds. Phytopathology 74:268-272.

ROBERTS, S. J., PHELPS, K., TAYLOR, J. D.,and RIDOUT, M. S., 1993. Design and interpretation of seed health assays. In: Sheppard, J.W.,(Ed). Proceedings of the first ISTA Plant Disease Committe Symposium on Seed Healt Testing pp. 115-125.

ROBERTS, S. J., HILTUNEN, L. H., HUNTER, P. J., and BROUGH, J., 1999. Transmission from seed to seedling and secondary spread of *Xanthomonas*

campestris pv. *campestris* in Brassica transplants: effects of dose and watering regime. European Journal of Plant Pathology 105: 879-889.

ROBERTS, S. J. and KOENRAADT, H., 2003. ISTA-PDC technical report: revised method for detection of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in brassica seeds. ISTA Method Validation Report 1: 1-9.

ROBERTS, S. J., Brough J, Everett B, Redstone, S., 2004. Extraction methods for *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* from brassica seed. Seed Science And Technology 32 (2) 439-453.

SALCEDO, G., RAMIREZ, M. E., FLORES, C., and GALINDO, E., 1992. Preservation of *Xanthomonas campestris* in *Brassica oleracea* seeds. Applied Microbiology and Biotechnology 37: 723-727.

SANDS, D. C., 1990. Physiological criteria-determinate tests. In: Mrthods in Phytobacteriology. (Edts. Klement, Z., Rhudolf, K., Sands, D.C.) Acedemia Kiado, Budapest, Hungary.

SCHAAD, N. W., 1989. Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in *Crucifers.* Pages 68-75. In : Detection of Bacteria in Seed and Other Planting Material. (Edts. A. W. Seatler, N. W. Schaad, D. A. Roth). APS Pres St. Paul, MN, USA.

SCHAAD, N. W. and ALVAREZ, A., 1993. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*: cause of balck rot of crucifers. In Xanthomonas (Edts. J. G. Swings and E. L. Civerolo). Chapman & Hall Press. London.

SCHAAD, N. W., JONES, J.B., AND LACY, G. H., 2001. Gram negative bacteria, Xanthomonas. In: Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria (Third Edition) (Eds:Schaad, N. W., Jones, J.B., and Chun, W.. APS Press. St. Paul, Minnesota.) p: 175-200.

SCHAAD, N. W., and FRANKEN, A. A. J. M., 2006. Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* on Brassica spp. ISTA International Rules for Seed Testing, Eddition 2006.

SHERF, A. F., and MACNAB, A. A., 1986. Vegetable Diseases and Their Control, Second Edition. A Wiley-Interscience Publication. John Wiley & Sons. New York.

SHIOMI, T., TAKEUCHI, S., and TEZUKA, N., 1991. Disinfection of cabbage seeds infested with the pathogen of black rot, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, by hot air treatment. Bulletin of the National Research Institute of Vegetables, Ornamental Plants, and Tea 4: 9-14. (Abstract in English).

YUEN, G. Y., ALVAREZ, A. M., BENEDICT, A. A., TROTTER, K., 1987. Use of monoclonal antibadies to monitor the dissemination of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Plant Disease 71 (1) 27-30.

ZACCARDELLI, M., CAMPANILE, F., SPASIANO, A., and MERIGHI, M., 2007. Detection and identification of the crucifer pathogen, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, by PCR amplification of the conserved Hrp/type III secretion system gene *hrcC*. European Journal of Plant Pathology 118: 299-306.

ÖZGEÇMİŞ

25/04/1968 yılında Adana'da doğdu. İlk orta ve lise öğrenimimi Adana'da tamamladı. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü'nden 1996 yılında mezun oldu. Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Fitopatoloji Anabilimdalı Bakteriyoloji Laboratuarında 2005 yılında yüksek lisans eğitimine başlamıştır.

EKLER

EK 1

Yeast Dekstroz Kalsiyum Karbonat (YDC) Agar (Lelliott ve Stead,1987)

Yeast Extract	10.0 g
Dextrose	20.0 g
Calcium Carbonate	20.0 g
Agar	15.0 g
Distile Su	1000 ml

121 ºC'de 15 dakika otoklav edilmiştir.

King B Besi Yeri (King ve ark., 1954)

Proteose Peptone	20.0 g
Gliserin	10.0 ml
K_2HPO_4	1.5 g
$MgSO_47H_2O$	1.5 g
Agar	15 g
Distile Su	1000 ml

121 ºC'de 15 dakika otoklav edilmiştir.

mCS20ABN Besi Yeri (Chang ve ark., 1991)

Soya Peptone	2.0 g
Bacto Tryptone	2.0 g
KH_2PO_4	1.59 g
$(NH_4)_2HPO_4$	0.33 g
$MgSO_4.7H_2O$	0.4 g
L-Glutamine	6.0 g
L-Histidine	1.0 g
D-Glucose	1.0
Eriyebilir Nişasta	25 g
Bacto Agar	15 g
Distile Su	1000 ml

121 ºC'de 15 dakika otoklav edilmiştir.Ortam 50ºC'ye kadar soğutularak içerisine aşağıdaki kimyasallar ilave edilmiştir.

Cycloheximide (200 mg/ml 70% EtOH)	200 mg (1 ml)
Neomycin (40 mg/ml 20 % EtOH)	40 mg (1 ml)
Bacitracin (100 mg/ml 50% EtOH)	100 mg (1 ml)

Fieldhouse Sasser Agar (FS) Besi Yeri

Eriyebilir nişasta,	10 g
Yeast extract	0.1 g
K_2HPO_4	0.8 g
KH_2PO_4	0.8 g
$MgSO_4.7H_2O$	0.1 g
methylgreen (%1 sulu)	1.5 ml*

Agar	15 g
Distile su	1000 ml

121 ºC'de 15 dakika otoklav edilmiştir.
* Solüsyon %1'lik sulandırılacak

Basal Starch Cycloheximide Antibiotic Agar (BSCAA) Besi Yeri

Eriyebilir nişasta	10 g
Glycine	0.2 g
KH_2PO_4	1.0 g
KH_2PO_4	1.0 g
$MgSO_4.7H_2O$	0.2 g
Methylgreen	0.2 ml*
Agar	15. g
Distile Su	

121 ºC'de 15 dakika otoklav edilmiştir. Ortam 50 ºC'ye kadar soğutularak içerisine aşağıdaki kimyasallar ilave edilmiştir.
Cycloheximide (200 mg/ml 70% EtOH) 200 mg (1 ml)
* Solüsyon %1'lik sulandırılacak

NSCA Besi Yeri

Eriyebilir Patates Nişastası	23 g
Agar	15 g
Distile Su	1000 ml

EK 2

ELISA Testinde Kullanılan Tampon Çözeltiler

Phosphate Buffered Saline (PBS). pH:7.4 (Fosfat Tampon Çözeltisi)

NaCl 8.0g
KH_2PO_4 0.2g
$Na_2HPO_42H_20$ 1.44g
KCl 0.2g
NaN_3 0.2g

Yukarıda miktarları verilen kimyasallar 1 litre saf suda eritilip ph'sı 0.1N NaOH veya 0.1N NaOH veya 0.1N HCl ile ayarlanmış ve +4ºC'de saklanmıştır.

Coating buffer ph 9.6 (Kaplama Tampon Çözeltisi)

Na_2CO_3 1.59g
$NaHCO_3$ 2.94g
NaN_3 0.2g

Yukarıda verilen kimyasallar 1 litre saf suda eritilip pH'sı ayarlanmış ve +4ºC'de saklanmıştır.

Wasshing Buffer (Yıkama Tamponu)

Bir litre PBS tamponu 0.5ml Tween 20 ilave edilerek hazırlanmıştır.

PNP Buffer

97 ml Diethanolamine 800ml saf su içine ilave edildikten sonra 0.2 g NaN_3 ve Magnezyum chloride hexahydrate 0.1 g konmuş ve HCl ile pH 9.8 ayarlanarak 1 litreye tamamlanmıştır**.**