

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Hatice ÖRNEK

**BEGONYADA (*Begoniae* sp.) BAKTERİYEL LEKE VE YANIKLIĞA
NEDEN OLAN *Xanthomonas axonopodis* (syn: *campestris*) pv.
begoniae'NİN KARAKTERİZASYONU VE FARKLI BEGONYA
ÇEŞİTLERİNİN HASTALIĞA DAYANIKLIĞI**

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

ADANA, 2006

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BEGONYADA (*Begoniae* sp.) BAKTERİYEL LEKE VE YANIKLIĞA
NEDEN OLAN *Xanthomonas axonopodis* (syn: *campestris*) pv. *begoniae*'NİN
KARAKTERİZASYONU VE FARKLI BEGONYA ÇEŞİTLERİNİN
HASTALIĞA DAYANIKLIĞI**

**Hatice ÖRNEK
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

**Bu tez 16/08/2006 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından
Oybirliği/Oyçokluğu İle Kabul Edilmiştir.**

İmza.....

Doç.Dr. Yeşim AYSAN
DANIŞMAN

İmza.....

Prof.Dr. Özden ÇINAR
ÜYE

İmza.....

Prof.Dr. Sevil ALTAN
ÜYE

**Bu tez Enstitümüz Bitki Koruma Anabilim Dalında hazırlanmıştır.
Kod No:**

Prof. Dr. Aziz ERTUNÇ

Enstitü Müdürü
İmza ve Mühür

**Bu çalışma Ç.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.
Proje No: ZF2005YL48**

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

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BEGONYADA (*Begoniae* sp.) BAKTERİYEL LEKE VE YANIKLIĞA NEDEN OLAN *Xanthomonas axonopodis* (syn:*campestris*) pv. *begoniae*'NİN KARAKTERİZASYONU VE FARKLI BEGONYA ÇEŞİTLERİNİN HASTALIĞA DAYANIKLILIĞI

Hatice ÖRNEK
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

Danışman: Doç. Dr. Yeşim AYSAN

Yıl:2006, Sayfa:66

Juri : Prof. Dr. Özden ÇINAR

Juri : Prof. Dr. Sevil ALTAN

Adana, Manisa ve İstanbul illerinde üretilen *Begonia x tuberhybrida*'nın (yumrulu begonya) yapraklarında düzensiz lekeler, kağıt gibi incelmeler ve genel bir yanıklık; gövde kısmında ise hafif bir yumuşama, renk değişimi ve bakteriyel akıntı saptanmıştır. Hasta begonya bitkilerinin yaprak ve gövdelerinden YDC ve King B besi yerlerinde izolasyonlarda sarı renkte ve mukoid gelişen 17 adet bakteri izolatu elde edilmiştir. Patojenite çalışmalarında, tüm izolatlar yumrulu begonya yapraklarına püskürtme inokulasyonla bulaştırıldığında 7-10 gün içinde yapraklarda hastalık belirtileri gözlenmiştir. Klasik bakteriyolojik teknikler, indirect-ELISA testi ve tüm hücre yağ asit metil ester analizlerine (FAME) dayanan Mikrobiyal Tanı Sistemine göre patojen bakteri *Xanthomonas axonopodis* pv. *begoniae* olarak tanılanmıştır.

Etmenin yumrulu, rizomlu ve lifli köklü begonyalara ait 14 farklı çeşidinin ve çilek begonyasının bu hastalığa reaksiyonları da araştırılmıştır. Bu etmenin yaprak enfeksiyonlarına karşı *Begonia carollina* ve *Begonia masoniana* dayanıklı olarak bulunmuştur.

Anahtar kelimeler: begonya, bakteri, ELISA, hastalık dayanıklılığı

ABSTRACT

MSc THESIS

CHARACTERIZATION OF *Xanthomonas axonopodis* (syn: *campestris*) pv. *begoniae*, CAUSAL AGENT OF BACTERIAL SPOT AND BLIGHT DISEASE ON BEGONIA (*Begonia* sp.) AND RESISTANCE OF DIFFERENT BEGONIA CULTIVARS TO THE DISEASE

Hatice ÖRNEK

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

Supervisor: Doç. Dr. Yesim AYSAN

Year:2006, Page:66

Jury : Prof. Dr. Ozden CINAR

Prof. Dr. Sevil ALTAN

In Adana, Manisa and Istanbul, irregular necrotic lesion on leaves, necrosis and general leaf blight, rotting discoloration of stem and bacterial exudates were observed on *Begonia x tuberhybrida* (tubercular begonia). Seventeen bacterial strains were isolated from infected leaves and stems by several isolations on YDC and King's medium B. In pathogenicity tests, all strains were found as pathogenic on tubercular begonia leaves by spray inoculations within 7-10 days . All strains were identified as *Xanthomonas axonopodis* pv.*begoniae* by classical bacteriological System based on fatty acid methyl ester analysis (FAME).

Disease resistance of different begonia cultivars including tuberous, wax and rex begonias were also investigated. *Begonia masoniana* were found as less susceptible to leaf infections of the disease. *Begonia carollina* and *Begonia masoniana* were found as resistance to stem infection of the disease.

Key words: begonia, bacteria, ELISA, disease resistance

ÖNSÖZ

Begonyada bakteriyel leke ve yanıklık hastalığı etmeni *Xanthomonas axonopodis* (syn: *campestris*) pv. *begoniae* (Xab)'nın varlığı 1920'li yılların sonlarından beri bilinmektedir. Begonyalarda bu hastalığın bakteriyel kökenli olduğu ilk kez 1928 yılında Danimarka'da Dawson tarafından rapor edilmiştir. Daha sonra hastalık 1938 yılında ABD'de ortaya çıkmıştır. O tarihten bu zamana kadar begonya yetiştirilen pek çok yerde bu hastalık görülmüştür. 2004 yılında Adana, Mersin, Manisa ve İstanbul illerindeki süs bitkileri üretimi yapan büyük ve küçük ölçekli üretim yerlerinde yaptığımız araştırmalarda begonyada yaprak yanıklığı belirtileri gösteren bitkiler tespit edilmiştir (Daughtrey ve ark., 1995).

Hastalığın tek konukçusu olarak Begonya bitkisi bilinmektedir. Hastalık bitkinin yapraklarında tipik kahverengi lekeler ve yanıklık oluşturma yanı sıra epifitik olarak yaprakta ve sistemik olarak da iletim demetlerinde bulunabilir. Yapılan bu yüksek lisans tez çalışmasında Begonya yapraklarında leke belirtilerinden etmen izole edilmiş ve tanısı morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal, Indirect-ELISA ve yağ asit metil ester analizi ile yapılmıştır. Bu çalışmayla Çilek Begonyasının (*Saxifraga stolonifera*) da konukçusu olduğu belirlenmiştir. Ayrıca farklı begonya çeşitlerinin bu hastalık etmenine dayanıklılık düzeyleri de araştırılmıştır. Bu tezde elde edilen bulguların begonya üretimi yapan işletmelere ve bu konuda çalışacak araştırmacılara faydalı olmasını dilerim.

Zir.Müh. Hatice ÖRNEK

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tezimin hazırlanmasında yardımlarını esirgemeyen ve bu güzel süs bitkisinde zevkle çalışma olanağı sağlayan danışmanım Sayın Doç. Dr. Yeşim AYSAN'a teşekkür ediyorum.

Yüksek Lisans Tez Jüri üyelerinden Sayın Prof. Dr. Özden ÇINAR ve Sayın Prof. Dr. Sevil ALTAN'a yapıcı ve yönlendirici fikirleriyle katkıda bulundukları için sonsuz teşekkürler.

Atatürk Üniversitesi Biyoteknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi olanaklarından yararlanmamı sağlayan Sayın Prof. Dr. Fikrettin ŞAHİN'e şükranlarımı sunarım.

ELISA çalışmalarımı yapmamda yardımcı olan ve Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Viroloji laboratuvar olanaklarından yararlanmamı sağlayan Prof. Dr. Saadettin BALOĞLU, Doç. Dr. Muharrem KAMBEROĞLU, Arş. Gör. Gökmen KOÇ ve Uzm. Dr. Behçet Kemal ÇAĞLAR'a teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında emeği geçen Bakteriyoloji Laboratuvarı çalışma arkadaşlarım olan Dr. Mustafa MİRİK, Arş. Gör. Mustafa KÜSEK, Arş. Gör. Raziye ÇETİNKAYA-YILDIZ, ve Zir. Müh. Sencen ÜNLÜ'ye çok teşekkür ederim.

Manevi destek ve sevgileriyle her zaman yanımda olduklarını hissettiğim ailem ve arkadaşlarıma da sonsuz teşekkürler...

İÇİNDEKİLER	<u>Sayfa No</u>
ÖZ	I
ABSTRACT	III
ÖNSÖZ.....	IV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER.....	VI
ÇİZELGELER DİZİNİ	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	X
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	XII
1.GİRİŞ	1
2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	4
3.MATERYAL VE METOD.....	10
3.1.Materyal	10
3.2.Metod	10
3.2.1. Hasta Begonya Bitkilerinin Toplanması	10
3.2.2. Begonyada Bakteriyel Leke ve Yanıklık Etmeninin İzolasyonu	11
3.2.3. Patojenite Testi.....	11
3.2.4. <i>Xab</i> 'nın Tanılama Testleri	12
3.2.4.1. Koloni Gelişimi	12
3.2.4.1.(1).YDC Agar Besi Yerinde Gelişim	12
3.2.4.1.(2).Nutrient Agar Besi Yerinde Gelişim	13
3.2.4.1.(3).Tween B Besi Yerinde Gelişim	13
3.2.4.1.(4).CKTM Besi Yerinde Gelişim.....	13
3.2.4.1.(5). SM Besi Yerinde Gelişim	13
3.2.4.1.(6) SX Besi Yerinde Gelişim	14
3.2.4.1.(7) MD-5 Besi Yerinde Gelişim	14
3.2.4.2.Potasyum Hidroksit Testi (KOH).....	14
3.2.4.3.Oksidaz Testi.....	14
3.2.4.4.Oksidasyon/ Fermantasyon Testi (O/F)	15
3.2.4.5.Nişasta Hidrolizasyonu	15
3.2.4.6.Katalaz Testi.....	16

3.2.4.7.Hareketlik Testi	16
3.2.4.8.Levan Oluşumu	16
3.2.4.9.Pektolitik Aktivite Testi.....	17
3.2.4.10.Tütünde Aşırı Duyarlılık Reaksiyonu (Hypersensitive Reaction-HR).....	17
3.2.5. <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv <i>begoniae</i> İzolatlarının İndirect-ELISA Testi İle Tanısı	17
3.2.6.. <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>begoniae</i> İzolatlarının Yağ Asit Profillerinin Belirlenmesi	19
3.2.7.Begonya Çeşitlerinin <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>begoniae</i> 'ya Karşı Dayanıklılığının Saptanması.....	20
4.BULGULAR VE TARTIŞMA	23
4.1. Hasta Begonya Bitkilerinin Toplanması	23
4.2. Begonyada Bakteriyel Leke ve Yanıklık Etmeninin İzolasyonu.....	27
4.3. Patojenite Testi	28
4.4.Bakteri izolatlarının Tanılama Test Sonuçları.....	29
4.4.1. Koloni Gelişimi.....	29
4.4.1.1.YDC Agar Besi Yerinde Gelişim	29
4.4.1.2.Nutrient Agar (NA) Besi Yerinde Gelişim	29
4.4.1.3.Tween B Besi Yerinde Gelişim	29
4.4.1.4.CKTM Besi Yerinde Gelişim.....	30
4.4.1.5. SM Besi Yerinde Gelişim	30
4.4.1.6. SX Besi Yerinde Gelişim	31
4.4.1.7. MD-5 Besi Yerinde Gelişim.....	31
4.4.2.Potasyum Hidroksit Testi	31
4.4.3.Oksidaz Testi	32
4.4.4.Oksidasyon / Fermantasyon Testi (O/F).....	32
4.4.5.Nişasta Hidrolizasyonu.....	33
4.4.6.Katalaz Testi	34
4.4.7.Hareketlilik Testi.....	34
4.4.8.Levan Oluşumu	35

4.4.9.Pektolitik Aktivite	36
4.4.10.Tütünde Aşırı Duyarlılık (Hypersensitive Reaction, HR) Testi	36
4.5.Begonya İzolatlarının İndirect-ELISA Testi İle Tanısı.....	37
4.6.Begonya İzolatlarının Yağ Asit Profillerinin Belirlenmesi	38
4.7. <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>begoniae</i> 'ya Karşı Farklı Begonya Çeşitlerinin Dayanıklılığının Saptanması	41
5.SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	53
KAYNAKLAR.....	55
ÖZGEÇMİŞ	61
EKLER.....	62

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 3.1	Begonya Çeşitlerinin <i>Xanthomonas axonopodis</i> . <i>pv.begoniae</i> 'ya Karşı Dayanıklılığının Belirlenmesinde Kullanılan Yaprak Skala.....	21
Çizelge 3.2	Begonya Çeşitlerinin <i>Xanthomonas axonopodis</i> . <i>pv.begoniae</i> 'ya Karşı Dayanıklılığının Belirlenmesinde Kullanılan Gövde Skala.....	21
Çizelge 4.1	Kullanılan izolatların kod numaraları, izole edildikleri yer ve tarih.....	27
Çizelge 4.2	Tanılama test sonuçları.....	37
Çizelge 4.3	ELISA plate okuyucusunda begonya izolatlarının okunan absorbans değerleri (ölçümler 405 nm'de yapılmıştır)	38
Çizelge 4.4	Begonya kültürlerinden izole edilen yağ asitleri ve bulunma oranları (%).	39
Çizelge 4.5	Bir begonya izolatının MIDI sonucu.....	40
Çizelge 4.6	Begonya çeşitlerinin <i>Xanthomonas axonopodis</i> <i>pv.begoniae</i> 'ya karşı gösterdikleri yaprak reaksiyonları yüzdesi ve skala değerleri.....	51
Çizelge 4.7	Begonya çeşitlerinin <i>Xanthomonas axonopodis</i> <i>pv.begoniae</i> 'ya karşı gösterdikleri gövde reaksiyonları yüzdesi ve skala değerleri.....	51

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

No

Şekil 3.1	Kullanılan inokulasyon yönteminin görünümü.....	22
Şekil 3.2	İnokule edilen bitkilerin iklim odasındaki görünümü.....	22
Şekil 3.3	İnokule edilen bitkilerin nem çemberine alınması.....	22
Şekil 4.1	Mersin’de yumrulu begonya üretimi yapılan bir seranın görünümü.....	23
Şekil 4.2	Yaprakta su emmiş leke ve sararma belirtileri.....	24
Şekil 4.3	Yapraklarda “V” şeklinde lekeler ve kağıt gibi incelmış görünüm.....	24
Şekil 4.4	Sistemik enfeksiyonlar sonucu oluşan bakteriyel akıntı.....	25
Şekil 4.5	Sistemik enfeksiyonlar sonucu oluşan gövde ve yaprak yanıklığı.....	26
Şekil 4.6	Şiddetli enfeksiyonlar sonucu oluşan bitki ölümü.....	26
Şekil 4.7	King B besi yerinde gelişen açık sarı renkte koloniler.....	27
Şekil 4.8	Patojenite testinde çilek begonyasında (solda) ve lifli köklü begonyada (sağda) oluşan yaprak lekeleri ve yanıklıkları.....	28
Şekil 4.9	Xab 2/r kodlu izolatının YDC besi yerindeki koloni gelişimi...	29
Şekil 4.10	Xab2/r kodlu izolatının SM (üstte), Tween B (alt solda) ve CKTM (altta sağda) besi yerinde oluşturduğu koloni morfolojisi.....	30
Şekil 4.11	KOH testinde Gram negatif kültürlerinin oluşturduğu sümüksü yapı.....	31
Şekil 4.12	Oksidaz pozitif (solda) ve negatif (sağda) reaksiyon.....	32
Şekil 4.13	Oksijensiz ortamda gelişme gösteren (sağda) ve göstermeyen (soldan ilk iki) bakteri kültürleri.....	33

Şekil 4.14	Xab2/r kodlu izolatının nişastayı hidrolize etmesi.....	34
Şekil 4.15	Xab/r kodlu izolatın (solda) ve referans kültürün (sağda) hareketlilik özelliği, negatif kontrol olarak aşılammamış besi yeri (ortada)	35
Şekil 4.16	Xab2/r kodlu izolatın (sağda) ve <i>E. amylovora</i> 'nın (solda) oluşturduğu levan tipi koloniler.....	35
Şekil 4.17	Patateste çürümeye neden olmayan Xab2/r kodlu izolat (solda) ve yumuşak çürüklük oluşturan <i>Erwinia caratovora</i> subsp. <i>caratovora</i> (PD-1302) (sağda)	36
Şekil 4.18	Begonya izolatlarıyla yapılan indirect-ELISA testinde plakalarının görünüşü.....	37
Şekil 4.19	Yağ asit profillerine dayanan küme analizi sonucu izolatların farklılık oranları.....	41
Şekil 4.20	<i>Begonia corallina</i> hibrit "Lucerna" çeşidinde <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>begoniae</i> 'nin oluşturduğu yaprak lekeleri ve bir dökülmüş yaprak.....	42
Şekil 4.21	<i>Begonia corallina</i> 'da <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>begoniae</i> 'nin hastalık belirtileri.....	43
Şekil 4. 22	<i>Begonia metallica</i> 'da <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>begoniae</i> tarafından hastalandırılmış ve kurumuş yaprak.....	44
Şekil 4.23	<i>Begonia masoniana</i> 'da <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>begoniae</i> 'nin hastalık belirtileri.....	45
Şekil 4.24	<i>Begonia semperflorens-cultorum</i> hibridlerinden beyaz çiçekli ve yeşil yapraklı begonyada hastalık belirtisi.....	47
Şekil 4.25	<i>Begonia semperflorens-cultorum</i> hibridlerinden pembe katmerli çiçekli ve kırmızı yapraklı begonyada hastalık belirtisi.....	47
Şekil 4.26	<i>Begonia semperflorens-cultorum</i> hibridlerinden kırmızı çiçekli ve yeşil yapraklı begonyada hastalık belirtisi.....	48
Şekil 4.27	<i>Begonia semperflorens-cultorum</i> hibridlerinden pembe çiçekli ve yeşil yapraklı begonyada hastalık belirtisi.....	48

Şekil 4.28	<i>Begonia tuberhybrida</i> 'nın hibrit illumination serisinden "Pale Pink" çeşidinde <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>begoniae</i> 'nin oluşturduğu yaprak yanıklıkları.....	49
Şekil 4.29	<i>Saxifraga stolonifera</i> 'da yaprak yanıklığı.....	50

SİMGELER VE KISALTMALAR

ABD: Amerika Birleşik Devletleri

DNA: Deoksiribonukleik asit

ELISA: Enzim bağlı immunolojik deney

FAME: Fatty acid methyl ester

g: Gram

GSPB: Göttingen Sammlung Phytopathogener Bakterien

KOH: Potasyum Hidroksit

NaCl: Sodyum Klorür

NaOCl: Sodyum Hipoklorit

PBS: Phosphate buffered saline

PCR: Polymerase Chain Reaktion

°C: Santigrat derece

YDC-agar: Yeast extract kalsium karbonat agar

King B: King's medium B

MD-5: A Modified Kado ve Heskett's D5 Medium

min: Minimum

max: Maksimum

mg: Miligram

ml: Mililitre

mm: Milimetre

nm: Nanometre

µm: Mikro metre

µl: Mikro litre

pv: Pathovar

SX: A selective Medium for *Xanthomonas*

SM: A Starch-Methionine Medium

1.GİRİŞ

Günlük yaşantımızda süs bitkileri görsel ve fonksiyonel etkileri ile hemen her alana girmiştir. Ayrıca gelişen bir tarımsal sektör olarak süs bitkileri üretiminin ülke ekonomisine belirli bir düzeyde katkısı da bulunmaktadır. Ülkemizde özellikle son on-on beş yılda süs bitkileri üretimi ve ticaretinde hızlı ve dinamik bir artış göze çarpmaktadır. Bu artış içinde kesme çiçek üretiminde Antalya, dış mekan süs bitkileri üretiminde İzmir ve Yalova, iç mekan süs bitkileri üretiminde ise Yalova ve Adana illeri ilk sıralarda yer almaktadır. Dış mekan süs bitkileri ihtiyacı çoğunlukla kamu kurum ve kuruluşlara bağlı olarak tesis edilen fidanlıklarda yapılmaktadır. Ancak, bu konuda giderek çeşitlenen ve artan ihtiyaçları tam olarak karşılayacak bir yurt içi üretim kapasitesine ve teknolojik seviyeye ise henüz ulaşamamıştır. Ortaya çıkan süs bitkileri açığı yurt dışı kaynaklı çelik, fide, fidan ve yetişkin bitkilerle kapatılmaya çalışılmaktadır. İthalatı yapılan türler iç ve dış mekanda farklı amaçlar için kullanılmaktadır. Yurtdışı kaynaklı iç mekan bitki türlerinin küçük fideleri sera koşullarında büyütülerek pazarlanmaktadır (Sözen ve ark. 1991; Zencirkıran, 2004).

Bu sektöre bitki korumacı gözüyle bakıldığında aşı gözü, çelik, fide, fidan, anaç bitki gibi üretim materyali ithalatı ile ülkemize yeni hastalıkların girişi olabilmektedir. Öden (1991)'in bildirdiğine göre ülkemizde süs bitkileri hastalıkları üzerine ilk çalışmalar Türkmenoğlu (1953), Karel (1958), Karahan (1969) ve Gürcan (1970) tarafından yapılan fungal hastalıkların ilk kayıtlarıdır. Bornova Zirai Mücadele Araştırma Enstitüsü tarafından 1979-1984 yılları arasında süs bitkilerinde sorun olan hastalıklar üzerine yürütülen proje sonucunda hiçbir bakteriyel hastalık etmeni bulunamamıştır Bakteri hastalıkları üzerine ilk detaylı araştırma Öden tarafından yapılan doktora çalışması olmuştur (Öden, 1991). Araştırmacı İstanbul ve İzmir illerinde yaptığı incelemelerde krizantem ve güllerde *Agrobacterium tumefaciens* (kök boğazı uru), *Schlangenlcrout palustris* (Kala), *Ariocarpus trigonus* (Kaktüs), *Lilium candidum* (Zambak), *Sainipaulia ionatha* (Afrika Menekşesi), *Dieffenbachia* sp. (Difenbahya) ve *Gerbera* L. da (Gerbera) yumuşak çürüklüğe neden olan *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*'yı tanılamıştır (Öden, 1991). Doğu Akdeniz bölgesinde 2000'li yılların başlarında ise Gül'lerde *A. tumefaciens*'in ve

Difenbahya’larda ise *E. c. subsp. carotovora*’nın neden olduğu bir hastalık patlaması belirlenmiştir (Aysan ve Şahin, 2003a; Aysan ve Çetinkaya-Yıldız, 2002; Çetinkaya-Yıldız ve ark., 2004). Aysan ve Sahin (2003b) *Antrium andreanum*’da (Filamingo Çiçeği) bakteriyel yanıklığa neden olan *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae*’nın ülkedeki ilk raporunu yayınlamıştır. Mirik ve ark (2004) dal, gövde ve yapraklarda ur oluşumuna neden olan *Pseudomonas savastanoi*’yi Adana, Mersin, Antalya ve İzmir illerinden topladıkları *Nerium oleander* (Zakkum), *Jasminum officinale* (Yasemin), *Myrtus communis* (Mersin Çalısı) ve *Fontonesia phillyreoides* (Cılbırtı Çalısı)’den izole edilmiş ve bu izolatların fenotipik karakterizasyonları yapmışlardır. Konya’da Lale’lerde soğan, yaprak ve sap çürüklüğüne neden olan *Pectobacterium* (synonim:*Erwinia*) *carotovorum* da problem olduğu bildirilmiştir (Boyraz ve ark., 2006).

Son birkaç yıldır Doğu Akdeniz Bölgesinde Begonya bitkilerinde yaprak lekesi ve yanıklığı belirtileri gözlenmektedir. Begonya’da yaprak leke hastalığına *Xanthomonas axonopodis* (syn:*campestris*) pv. *begoniae* adlı bakteri neden olmaktadır. Bu hastalık yaklaşık 50 yılı aşkın bir geçmişi olan Begonya’ların önemli bir yeşil aksam hastalığıdır. Begonyalarda bu hastalığın bakteriyel kökenli olduğu ilk kez 1928 yılında Danimarka’da Dawson tarafından rapor edilmiştir. 1938 yılında da ABD’de varlığı belirlenmiştir. O tarihten bu zamana kadar Begonya yetiştirilen hemen hemen her yerde bu hastalık görülmüştür (Daughtrey ve ark., 1995).

Xanthomonas axonopodis pv. *begoniae*’nin bugüne kadar tespit edilmiş tek konukçusu Begonyadır. Anavatanı Hindistan olan Begonya bitkisi rizomlu, lifliköklü ve yumrulu olarak üç ana gruba ayrılır. Bu gruplar içerisinde yaklaşık 900 farklı çeşit bulunmaktadır (Daughtrey ve ark., 1995).

Adana ve Mersin illerinde üretim yapan çeşitli işletmelerde 2004’den beri begonya yaprak yanıklığı belirtileri gösteren bitkiler tespit edilmiştir. Ayrıca İstanbul ve Manisa illerinde de bu tip belirti gösteren bitki örnekleri laboratuvarımıza gönderilmiştir. Bu yüksek lisans tez çalışmasında Doğu Akdeniz Bölgesinde Begonya’da bakteriyel yaprak leke ve yanıklığa neden olan etmenin izolasyonu, elde edilen izolatların morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal testler, serolojik (Indirect-ELISA), moleküler (PCR) ve yağ asit metil ester (Fatty Acid Methyl Ester:FAME)

analizleriyle tanısı amaçlanmıştır. Patojenite testlerinde rizomlu, lifliköklü, yumrulu begonya çeşitleri ve çilek begonyası kullanılmıştır. Çilek begonyasının (*Saxifraga stolonifera*) bu etmenin konukçusu olup olmadığı bilinmese de çalışmaya dahil edilmiştir.

Xanthomonas axonopodis pv. *begoniae* pek çok begonya çeşidinde farklı düzeylerde hastalık oluşturmaktadır. Güzel yaprak şekillerine sahip ve uzun zaman çiçekli kalan farklı hibrit begonya çeşitleri son yıllarda ülkemize giriş yapmaktadır. Bu çalışma çerçevesinde biz etmeni yumrulu begonya çeşitlerinden izole ettik ancak diğer çeşitler de etmenin tehdidi altında olabilir. Bu nedenle yeni ithal edilen çeşitlerde patojenin potansiyel bir tehlike oluşturup, oluşturmayacağı dikkate alınarak farklı çeşitlerin bu hastalığa dayanıklılığının belirlenmesi bu yüksek lisans çalışmasının diğer bir amacını oluşturmuştur.

2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Amerikan Fitopatoloji Derneğinin hazırlamış olduğu yeşil yapraklı ve çiçekli süs bitkileri hastalıkları kitaplarında *Pseudomonas* ve *Xanthomonas*'ların neden olduğu yaprak lekeleri, *Erwinia* yumuşak çürüklükleri ve ur oluşumuna neden olan *Agrobacterium* türleri üzerine pratik bilgiler, bakteriyel hastalıkların simptomları, tanısı ve mücadelesi hakkında resimli bilgiler yer almaktadır (Chase, 1987; Daugtery ve ark., 1995).

Süs bitkilerinde hastalık oluşturan *Xanthomonas* türleri incelendiğinde *Xanthomonas axonopodis* (sinonim *campestris*)'in pek çok patovaryanın çeşitli süs bitkilerinde patojen olduğu görülmektedir. Bu türler genellikle yaprak lekesi, yaprak ve gövde yanıklığı belirtileri oluşturarak süs bitkileri üretiminde önemli kayıplara neden olurlar.

Florida, ABD'de *Araceae* familyasından çeşitli süs bitkilerinde (*Aglaonema*, *Anthurium*, *Colocasia*, *Dieffenbachia*, *Epipremnum*, *Philodendron*, *Syngonium* ve *Xanthosoma*) kloroz ve sistemik enfeksiyona ve sonuçta bitki ölümüne neden olan bakteriyel etmenleri *Xanthomonas campestris* pv. *syngonii* ve *Xanthomonas campestris* pv. *dieffenbachiae* olarak tanımlanmıştır. Fizyolojik ve patojenite testleri ile yağ asit analizlerine göre izolatların karakterizasyonunu yapılmıştır (Chase ve ark., 1992). Norman ve Alvarez (1989 ve 1994) *Anthurium andreanum*'da (Filamingo Çiçeği) *Xanthomonas campestris* pv. *dieffenbachiae*'nın hızlı tanısında seçici besi yerine ve serolojiye dayanan bir yöntem geliştirmiştir. Bu etmenin ülkemizdeki varlığı da rapor edilmiştir (Aysan ve Sahin, 2003b). Etmenin *Anthurium andreanum*'da moleküler yöntemlere (RAPD-PCR, IC-PCR ve nested PCR) dayanan duyarlı tanısı üzerine çeşitli araştırmalar bulunmaktadır (Khoodoo ve Jaufeerally-Fakim, 2004; Khoodoo ve ark., 2005a ve 2005b ; Robene-Soustrade ve ark., 2006).

Stravato ve ark. (2004), *Euphorbia pulcherrima*'da (Atatürk Çiçeği) *Xanthomonas axonopodis* pv. *poinsettiicola*'nın varlığını İtalya'da saptamışlardır. Çin'de de *Euphorbia pulcherrima*'da (Atatürk Çiçeği) yaprak lekesi etmeni olarak *Xanthomonas campestris* pv. *poinsettia*'nın neden olduğu belirlenmiştir (Li ve ark., 2006).

Sahin ve ark. (2003) 1997-1998 yılları arasında sinya bitkisinde (*Zinnia elegans*) yaprak lekelerine neden olan bakteriyi morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal, yağ asit analizleri ve patojenite testleriyle *Xanthomonas campestris* pv. *zinniae* olarak tanılamışlardır.

Bu etmenler dışında *Euphorbiaceae* familyasındaki bitkilerde yaprak lekesine neden olan *Xanthomonas axonopodis* pv. *euphorbiae*, *Clerodendrum phlomidis*'de (Ganikarika bitkisi) patojen olan *Xanthomonas campestris* pv. *clerodendri*, *Lantana camara*'da (Çalı Minesi) patojen olan *Xanthomonas axonopodis* pv. *lantanae*, *Ficus* spp.'de patojen olan *Xanthomonas axonopodis* pv. *fici*, *Hedera helix*'de (Orman Sarmaşığı) patojen olan *Xanthomonas axonopodis* pv. *hederae*, *Hibiscus rosa-sinensis*'de (Japon Güllü) patojen olan *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* türleri bilinmektedir (Daughtrey ve ark., 1995; Chase, 1999).

Sardunyada bakteriyel leke ve solgunluğa neden olan *Xanthomonas campestris* pv. *pelargonii* üzerine pek çok çalışmanın da yapıldığı görülmektedir (Manulis ve ark., 1994; Sulzinski ve ark., 1995; Batur-Michaelis, 2003). Bu hastalık da pek çok Avrupa ülkesinde ve İsraill'de yaygındır. Etmenin serolojik ve moleküler yöntemlerle hızlı tanısı, uygun besi yerlerinin belirlenmesi, semptomsuz bitkilerde saptanması için çeşitli yöntemler ve mücadelesi üzerine çeşitli araştırmalar bulunmaktadır (Nameth ve ark., 1999). Bölümümüzde ise bu etmenin biyolojik mücadelesi üzerine bir yüksek lisans çalışması da yürütülmektedir.

Bu tez çalışmasın yapıldığı süs bitkisi olan Begonya'da bakteriyel hastalık olarak yumuşak çürüklüğe neden olan *Erwinia chrysanthemi* ile yaprak lekesi ve yanıklığa neden olan *Xanthomonas axonopodis* pv. *begoniae* bilinmektedir (Saltink ve Kamerman, 1971; Benedict ve ark., 1990; Daughtrey ve ark., 1995; Chase, 1997).

Xanthomonas campestris pv. *begoniae* ilk kez 1928 yılında Dawson tarafından Danimarka'da *Begonia socotrana* x *Begonia Dregei* 'Gloire de Lorraine' hibrit Begonyada tanımlanıp rapor edilmiştir. 1938 yılında Avrupa'da ve 1939 yılında da ABD'de varlığı belirlenmiştir. O tarihten bu zamana kadar Begonya yetiştirilen hemen hemen her bölgede görülmüştür (Daughtrey ve ark., 1995). Hastalığın ilk belirtileri Begonyanın alt yapraklarında 1 mm çapındaki küçük su emmiş lekeler şeklindedir. Lekeler arttıkça özellikle yaprak kenarlarında düzensiz

dairesel, nekrotik alanlar oluşur ve bunlar birleşebilir. Hastalık simptomları Begonya çeşitlerine ve etmenin bitkiye girişine göre değişiklik gösterebilir. Etmen hidadotlardan bitkiye giriş yapmış ise yaprak kenarında tek leke şeklinde hastalık başlar. İnce uzun yapraklı türler hariç genelde yapraklarda hastalık “V” şeklinde lekeler oluşturur. Lifliköklü begonyalarda (*Begonia x semperflorens-cultorum*) ise karakteristik yaprak lekeleri gözlenmemiştir. Bakteri kökteki yaralardan bitkiye girip sistemik ilerlemişse, yaprak lekeleri görülmez, bitkide solgunluk, yaprak ve gövdede yanıklık belirtileri gözlenir. Sistemik enfeksiyonların ilk simptomlarından biri de, yaprak saplarındaki su emmiş lekelerdir. Bunun sonucunda gövde içi boşaldığından bitkiler çökebilir. İnce uzun büyüyen, gövdesi kalın ve sert dokulara sahip rizomlu begonyalar (örneğin; salon begonyası *Begonia corallina*) kısmen de olsa sistemik enfeksiyonlara dayanıklıdır. Yumuşak gövdeli yumrulu ve lifliköklü çiçekli begonya çeşitleri sistemik enfeksiyonlara son derece duyarlıdır. Şiddetli enfeksiyonlarda yumrulu begonyaların çiçekleri hızlıca kuruyarak dökülürken, yaprakları gövde üzerinde sararmış şekilde kalır. Şiddetli enfeksiyonlarda rizomlu begonyaların yaprakları kuruyarak dökülür. Yılda bir kez çiçek açtığı için her zaman çiçek enfeksiyonlarına rastlanılmayabilir (Daughtrey ve ark., 1995).

Yüksek sıcaklık ve nem bu hastalığın gelişimini artırır. Bulaşıklığın engellenmesi patojenin yayılımı için önemlidir. Enfekteli bitki materyalleri bulaşıklık için önemli kaynaklardır. *Xanthomonas axonopodis* pv. *begoniae* bir yıldan daha az bir süre kuru havada begonya üzerinde yaşayabilir. Patojen hastalık oluşumundan önce birkaç ay yeşil aksamda epifitik olarak bulunabilir. Tohumda ise bakterinin varlığına rastlanılmamıştır. Hastalık köklerden yeşil aksama, yeşil aksamdan köklere taşınabilir. Bu esnada hastalığın sağlıklı bitkilere taşınması sulama suyuyla da az oranda olabilmektedir (Daughtrey ve ark., 1995).

Atmatjidou ve ark (1991) *Begonia x hiemalis* yetiştirilen bir alanda *Xanthomonas axonopodis* pv. *begoniae* ile bulaşık sulama suyu kullanıldığında temiz alanlara etmenin sulama suyuyla taşınma oranının %2.5 gibi düşük bir düzeyde olduğunu belirlemişlerdir.

Xanthomonas axonopodis pv. *begoniae*'nın bugüne kadar belirlenmiş konukçuları *Begonia alba*, *Begonia x hiemalis*, *Begonia gracilis*, *Begonia socotrana*,

Begonia rex-cultorum, *Begonia semperflorens-cultorum*, *Begonia x tuberhybrida*, *Begonia cucullata*, var. *hookeri*, *Begonia x drostii*, *Begonia x pictavenis*, *Begonia schmidniana* var. *orosea* ve *Begonia rex* olarak rapor edilmiştir (Daughtrey ve ark., 1995).

Begonya çeşitlerinin pek çoğu bu etmene duyarlı olmasına rağmen çeşitler arasında farklılıklar olduğu tespit edilmiştir. Begonya çeşitlerinin tümü orta duyarlıdan çok duyarlıya doğru gruplandırılmıştır (Strider, 1975). Pek çok araştırmacı bu çeşitlerin orta ve çok duyarlı olması konusunda aynı fikirde olmamasına rağmen rizomlu begonya grubunda yer alan bazı begonya çeşitlerinin duyarlılığı konusunda farklı görüşler vardır. Daughtrey ve ark. (1995) nın bildirdiğine göre Harri ve ark. (1977) rizomlu begonyaları oldukça dayanıklı olarak nitelerken Welhburg (1967) çok duyarlı çeşitlerin de bulunduğunu belirtmektedir.

Chase (1992) rizomlu begonyalardan *Begonia rex-cultorum*'un 15 farklı çeşidinin *Xanthomonas axonopodis* pv. *begoniae*'ya duyarlılık düzeylerini araştırmıştır. New Drop, Meteor, Mikado ve Phoenix Red çeşitlerin çok duyarlı; Cleopatra, Her Majesty, Red Pride ve Tiger Kitten çeşitlerinin orta duyarlı; Duarten, Helen Teupel, Marion Louise, Pauline, Peace, Red Dot ve Vesuvius çeşitlerinin az duyarlı olduklarını belirlemiştir.

Dye adlı araştırmacı bu bakterinin besinsel isteklerini belirlemiş ve karakteristik özelliklerini listelemiştir (Daughtrey ve ark., 1995). *Xanthomonas axonopodis* pv. *begoniae* etmeni çubuk şeklinde (0.5-0.7 x 1.0-1.5 µm) ve tek flagelluma sahiptir. Etmen %3-4'lük NaCl (maximum konsantrasyonda) varlığında gelişir ve min/max sıcaklık istekleri 7-9°C ve 35°C'dir. Cysteine hidrojenchlorid ve peptondan hidrojen sülfid ve sadece peptondan amonyum üretir. Etmen hidrojen, nişasta, esculin içeren besi yerinde (tamamiyle 30 günde) ve orta düzeyde lipolitik aktiviteye sahiptir. Patojen Yeast Dekstroz Calsiyum Carbonat Agar (YDCA) besi yerinde parlak sarı renkte gelişirken en iyi A Selective Medium for *Xanthomonas* (SX) besi yerinde gelişir (Chase, 1987).

Benedict ve ark. (1990) *Xanthomonas axonopodis* pv. *begoniae*'nın hızlı ve güvencilir (patovara spesifik) tanısında kullanmak üzere bakterinin lipopolisakkaritlerini izole ederek bunlara spesifik monoklonal antibadiler

üretmişlerdir. Üretilen antiserum 130 *Xanthomonas* ve 89 *Xanthomonas* olmayan türe karşı testlendiğinde sadece *Xanthomonas axonopodis* pv. *begoniae*'yı tanıyarak patovara spesifik bir monoklonal serum olduğu belirlenmiştir.

Senchenkova ve ark. (1999) *Xanthomonas axonopodis* pv. *begoniae*'nın bitkide su emmiş lekelerine neden olurken virülenslik faktörü olarak lipopolisakkaritleri kullandığını belirlemiştir. Zhang ve Kong (2002), lipopolisakkaritlerin yapısında bulunan zincirleri açığa çıkarmışlardır.

Hakkaart ve Versluijs (1983) *Xanthomonas axonopodis* pv. *begoniae* ile mücadelede hastalıksız üretim materyali kullanımının önemini vurgulamış ve araştırmacı bulaşık olmayan Begonya bitkileri üretebilmek için *Begonia elatior* ana bitkilerinden doku kültürüyle hastalıksız bitkiler elde etmişlerdir.

Bakteriyel yaprak leke ve yanıklık hastalığı 1920'lerin başından beri Begonya üretiminde kayıplara neden olmasına rağmen, kimyasal kontrol dışında hastalığın mücadelesiyle ilgili çok az araştırma yapılmıştır. Bakır hidroksit ve Streptomycin sülfat en iyi kimyasallardır. Streptomycin sülfat 600 ppm'de çok etkilidir. 200 ppm oranında ise haftada 2 kez uygulanabilir. Bakır hidroksit tamamiyle kontrol sağlar ancak *Rieger elatior* gibi bazı begonyalarda fitotoksiteye neden olabilir. Hastalık kontrolünde enfekteli yaprakların uzaklaştırılması gibi kültürel önlemler önemlidir. Kültürel önlemler yapılmadıkça kimyasal kontrolde de başarı elde edilmez. Temizlik önlemleri bu etmenin kontrolünde önemli bir uygulamadır. Üretim alanındaki hasta bitkiler görülür görülmez yok edilmelidir. Sistemik enfeksiyonlara neden olacağından yaprakları lekeli bitkiler atılmalıdır. Hastalıklı bitki parçaları da en kısa sürede üretim alanından uzaklaştırılmalı ve çalışanların bunlara elle teması engellenmelidir. Çalışanların sık sık ellerini yıkamaları gerekmektedir. Aynı şekilde kullanılan sulama suyunun da temizliği hastalığın yayılmasında önemlidir. Yağmurlama sulama sonucu yapraklar uzun süre ıslak kalacağından bakteri kısa sürede hızla çoğalır. Bu nedenle yağmurlama sulamadan kaçınmak gerekir (Chase ve ark., 1992). Gübreleme ile hastalık gelişimi arasında ilişki bulunmaktadır. Önerilenden daha yüksek dozda gübreleme yapıldığında hastalık düzeyinde azalma gözlenmiştir (Chase, 1997).

Shaw and Chase, (1991) rizomlu Begonya'lardan *Begonia rex-cultorum*'un Mikado çeşidi üzerinde yaptıkları bir çalışmada normal doz gübrelemeye göre 3 kat

fazla doz kullandıklarında *Xanthomonas axonopodis* pv. *begoniae*'nin neden olduğu hastalığın şiddetinde azalma tespit etmişlerdir. Ancak bu tür uygulamaların verdiği maddi zarar ve bitkide meydana gelebilecek diğer değişiklikler araştırılmamıştır.

3.MATERYAL VE METOD

3.1.Materyal

Survey alanı, bölge izolatları, Yunanistan Benaki Enstitüsünden Dr. Alivizatos'dan temin edilen BPIC 2013/94 kodlu *Xanthomonas axonopodis* pv. *begoniae* referans kültürü, Almanya Georg-Agust Üniversitesi Dr. Rudolph'dan temin edilen GSPB 382 kodlu *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, GSPB 1405 kodlu *Erwinia caratovora* subsp. *caratovora*, GSPB 224 kodlu *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*, GSPB 2097 kodlu *Pseudomonas cichorii* referans izolatları, 58/1 (r) kodlu *Erwinia amylovora* bölge izolatu, Adana, İncirlik, Tarsus ve Hatay illerinden elde edilen Begonya çeşitleri, besi yerleri, çeşitli kimyasallar, ELISA tanı kiti ve PCR malzemeleri bu çalışmada materyal olarak kullanılmıştır.

3.2.Metod

3.2.1.Hasta Begonya Bitkilerinin Toplanması

Adana ve Mersin'de begonya üretimi yapan veya başka yerden getirip satışının yapıldığı yerler Mart 2005, Şubat 2006, Nisan 2006 ve Mayıs 2006 tarihlerinde ziyaret edilmiştir. Üretim ve satış yapan kişilerle yapılan görüşmelerde saksılı halde bulunan toplam Begonya sayısı ve bu etmeden dolayı hastalanmış bitki sayıları kaydedilmiştir. Hasta Begonya bitkileri çeşitli izolasyon yöntemleriyle patojen bakteriyi izole etmek için toplanmıştır. Ayrıca Manisa ve İstanbul illerinde Begonya'larda benzer şikayetler olmuş ve örnekler laboratuvarımıza posta yoluyla gönderilmiştir.

3.2.2. Begonyada Bakteriyel Leke ve Yanıklık Etmeninin İzolasyonu

Yaprak lekesi ve yanıklık simptomsu gösteren Begonya bitkileri gazete kağıdı arasına sarılıp polietilen torba içerisinde laboratuara getirilmiştir. Gövde ve yaprakta hastalıklı ve sağlıklı kısmı içeren 2-3 mm büyüklüğünde bitki parçaları alınıp %70'lik alkol veya %1'lik NaOCl ile yüzeyden dezenfekte edilmiştir. Parçalar steril havanda %0.85 NaCl içeren saline bufferda homojenize edilmiştir. Bir öze dolusu süspansiyon alınıp Nutrient agar, YDC agar ve King B besi yeri içeren petrilere çizgi ekimiyle çizilmiş veya 100 µl süspansiyon besi yerlerine yayılmıştır. 25°C'deki inkübatörde 4-5 günlük inkübasyondan sonra gelişen koloniler incelenmiş ve sarı renkli koloni morfolojisine sahip olanlar saflaştırılmıştır. Saflaştırılan izolatlar gelecekteki çalışmalarda kullanılmak üzere eğik olarak hazırlanmış YDC agar besi yerinde geliştirilmiş ve +4°C'de buzdolabında saklanmıştır (Lelliott ve Stead, 1987).

3.2.3. Patojenite Testi

Patojenite testinde rizomlu Begonya (*Begonia carollina*, *B.carollina* hyb 'Lucerna', *Begonia masoniana*), yumrulu begonya (*Begonia x tuberhybrida*), lifli köklü begonya (*Begonia semperflorens-cultorum*) çeşitleri ve çilek begonyası (*Saxifraga stolonifera*) kullanılmıştır. Ticari olarak satın alınan Begonya çeşitleri içinde 3:2 oranında toprak ve torf karışımı bulunan plastik saksılara (8.5 x 8.5) şaşırtılmıştır. Şaşırtılan bitkiler 25°C sıcaklık, % 70-80 nem ve 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık koşullardaki iklim odasında muhafaza edilmiştir.

Patojenite testinde kullanılacak bakteri inokulum düzeyi yapılan bir ön denemeye tespit edilmiştir. YDC besi yerinde geliştirilen 48 saatlik bölge izolatları ve referans kültür spektrofotometrede 600 nm 0.2 ölçüm değerine ayarlanarak süspansiyonlar hazırlanmıştır. Elde edilen süspansiyonlardan 100µl alınarak içerisinde 0.9 ml steril su bulunan tüplerde 7 kez seri sulandırmalar yapılmıştır. Her bir sulandırmadan içerisinde YDC besi yeri bulunan petrilere 100µl süspansiyon koyulmuş ve bir bağıt yardımı ile besi yeri üzerine yayılmıştır. Her seyreltme için üç

adet petri kullanılmıştır. 25°C’de 48 saat inkübasyondan sonra petrilere gelişen koloniler sayılarak ml’deki bakteri hücre sayısı formüle (koloni sayısı x örneğin seyreltme serisi x 10) göre hesaplanmıştır (Klement ark., 1990). Patojenite çalışmalarında yaklaşık 7×10^6 hücre/ml inokulum yoğunluğu kullanılmıştır. Hazırlanan bakteri süspansiyonu bir el pülverizatörü yardımıyla yapraklara püskürtülmüştür. İnokulasyonda kolaylık sağlaması amacıyla yapraklar elle hafifçe ovalanarak yaralanması sağlanmıştır. Patojenite testlerinde pozitif kontrol olarak BPIC 2013/94 kodlu *Xanthomonas axonopodis* pv. *begoniae* referans kültürü, negatif kontrol olarak ise steril su kullanılmıştır. İnokule edilen bitkiler yukarıda özellikleri belirtilen iklim odasına yerleştirilmiş ve yüksek nem sağlamak amacıyla 24 saat süreyle ıslak polietilen torba içerisinde tutulmuştur. İnokulasyondan bir gün sonra bitkiler nem çemberinden alınmış ve günlük olarak symptom gelişimi açısından incelenmiştir. İnokulasyondan 8 gün sonra yapraktaki tipik leke oluşumuna göre hastalık var/yok olarak değerlendirilmiş ve izolatların patojen olup olmadığı belirlenmiştir. Symptom veren bitkilerden re-izolasyonlar yapılarak elde edilen re-izolatlar ile tanı çalışmaları yapılmıştır.

3.2.4. *Xanthomonas axonopodis* pv. *begoniae*’nın Tanı Testleri

3.2.4.1.Koloni Gelişimi

3.2.4.1.(1).YDC Agar Besi Yerinde Gelişim

Begonyada yaprak lekesi ve yanıklık symptomu gösteren bitkilerden re-izole edilen bakteri kültürleri ve referans izolat (BPIC 20134/94) taze hazırlanmış yeast (maya) dekstrozu kalsiyum karbonat (YDC) agar besi yeri (Ek 1) içeren petrilere çizgi ekim şeklinde aşılanmıştır. Petrilere 48-60 saat 25°C’de inkübe edildikten sonra sarı koloni gelişimine göre değerlendirilmiştir (Lelliot ve Stead, 1987).

3.2.4.1.(2).Nutrient Agar Besi Yerinde Gelişim

Nutrient Agar (NA) besi yerine (Ek 1) çizilen begonya re-izolatları ve referans bakteri kültürü 48-60 saat 25°C'de inkübasyondan sonra açık sarı koloni gelişimine göre değerlendirilmiştir (Schaad ve ark., 2001).

3.2.4.1.(3).Tween B Besi Yerinde Gelişim

Tween B besi yerine (Ek 1) çizilen begonyada bakteriyel leke ve yanıklık re-izolatları ve referans bakteri kültürü 7-14 gün 25°C'de inkübasyondan sonra dairesel tümsek beyaz kristalize bir alanla çevrili sarı koloni gelişimine göre değerlendirilmiştir (McGuire ve ark., 1986).

3.2.4.1.(4).CKTM Besi Yerinde Gelişim

CKTM besi yerine (Ek 1) çizilen begonya re-izolatları ve orijinal bakteri kültürü 7-14 gün 25°C'de inkübasyondan sonra dairesel tümsek çevresinde temiz bir hale bulunan sarı koloni gelişimine göre değerlendirilmiştir (Sijam ve ark, 1991; 1992).

3.2.4.1.(5). SM Besi Yerinde Gelişim

Starch-Methionine (SM) besi yerine (Ek 1) çizilen begonya yaprak leke ve yanıklık izolatları ile referans bakteri kültürü 5-7 gün 25°C'de inkübasyondan sonra dairesel, konveks, merkezi koyu mavi koloni gelişimine göre değerlendirilmiştir (Chun ve Alvarez, 1983).

3.2.4.1.(6). SX Besi Yerinde Gelişim

Xanthomonas'lar için seçici bir besi yeri olan SX'e (Ek 1) çizilen Begonya yaprak leke ve yanıklık izolatları ile referans bakteri kültürü 3-5 gün 30°C'de inkübasyondan sonra 4-5 mm çapında dairesel, konveks, merkezi SM ortamına göre daha açık mavi koloni gelişimine göre değerlendirilmiştir (Schaad ve White, 1974).

3.2.4.1.(7). MD-5 Besi Yerinde Gelişim

Modifiye edilmiş Kado ve Heskett'in D5-Besi yerine (MD-5) (Ek 1) çizilen begonya re- izolatları ve referans bakteri kültürü 7-10 gün 30°C'de inkübasyondan sonra 3-5 mm çapında dairesel, sarı, parlak ve konveks koloni gelişimine göre değerlendirilmiştir (Kuan ve Minsavage, 1985).

3.2.4.2. Potasyum Hidroksit Testi (KOH)

Taze hazırlanan %3'lük potasyum hidroksit solüsyonundan lam üzerine bir damla damlatıldıktan sonra begonya re-izolatları ve referans izolatın 48 saatlik kültüründen platin özeyle alınarak solüsyona dairesel hareketlerle karıştırılmıştır. 15-20 saniye sonra öze yukarı kaldırıldığında viskoz, yapışkanimsi bir sünmenin oluşması gram negatif olarak değerlendirilmiştir (Sands, 1990). Kontrol olarak gram pozitif özelliğe sahip *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis* (GSPB 382) kültürü ve gram negatif özelliğe sahip *Pseudomonas cichorii* (GSPB 2297) kültürü kullanılmıştır

3.2.4.3.Oksidaz Testi

Taze hazırlanan %1'lik N; N; N; N' - Tetramethyl- 1.4 phenylene diammonium diclorid eriği steril filtre kağıdına damlatılmıştır. Begonya re-izolatları ve referans izolatın 48 saatlik kültürü platin öze ile ıslak kurutma kağıdına çizildiğinde 10 saniye

içinde oluşan koyu mor renk pozitif olarak değerlendirilmiştir (Kovaks, 1956). Pozitif kontrol olarak *Pseudomonas cichorii* (GSPB 2097) kültürü kullanılmıştır

3.2.4.4.Oksidasyon/ Fermantasyon Testi (O/F)

Litrede 2g pepton, 5g NaCl, 0.3g KH₂PO₄, 3g agar, 3ml %1'lik bromothymolblue içeren besi yeri hazırlandıktan sonra tüplere 5'er ml konulmuştur. 121°C'de 15 dakika otoklavdan sonra 50°C'ye kadar soğutulan tüplerin her birine soğuk sterilizasyon yapılan %10'luk glikoz solüsyonundan 0.5 ml ilave edilmiştir. Taze geliştirilmiş 48 saatlik begonya re- izolatları ve referans bakteri kültürü ile nokta aşılama yapılmıştır. Her izolat için 6 tüp kullanılmıştır. Bu tüplerden üçüne 1 ml steril ılık vaspar (bir ölçü vaselin, üç ölçü parafin karışımı) konarak yüzeyi kapatılmış diğer üçüne hiçbir ekleme yapılmamıştır. 25°C'de 5-6 günlük bir inkübasyondan sonra ortam renginin sarıya dönmesi pozitif olarak değerlendirilmiştir (Sands, 1990). Kontrol olarak oksidatif özelliğe sahip *Erwinia amylovora* ve fermantatif özellikteki *Erwinia caratovora* (GSPB 1405) kültürleri kullanılmıştır.

3.2.4.5.Nişasta Hidrolizasyonu

Niştastanın hidrolizasyonu için litrede 23 gr nutrient agar içeren besi yeri içerisine %2 oranında eriyebilir nişasta ilave edilmiştir. Bunun için 10ml distile suda eritilen nişasta ısıtılarak çözüldükten sonra nutrient agara ilave edilmiş ve 121°C'de 15 dakika otoklav edilip steril petrilere dökülmüştür. Besi yerine çizilen begonya re- izolatları ve referans bakteri kültürü 7-14 gün 25°C'de inkübasyondan sonra kültürler üzerine lugol eriği (1g iyot ve 2g KI 300ml distile suda eritilmiştir) dökülmüştür. Niştastanın hidrolizasyonu şerit şeklindeki bakteri kolonisinin etrafında meydana gelen boyanmamış alanın izlenmesiyle saptanmıştır (Lelliot ve Stead, 1987). Pozitif kontrol *Xanthomonas vesicatoria* (GSPB 224) ve negatif kontrol olarak *Erwinia caratovora* subsp. *caratovora* (GSPB 1405) kullanılmıştır

3.2.4.6.Katalaz Reaksiyonu

Litrede 23g nutrient agar ile hazırlanan ortam 121°C’de 15 dakika otoklav edildikten sonra petrilere dökülmüştür. 36- 48 saatlik begonya re-izolatları ve referans bakteri kültürü ile zigzag şeklinde aşılanan petriler 25°C’de 24 saat inkübe edildikten sonra üzerlerine 1ml %3’lük hidrojen peroksit dökülmüştür (solüsyon taze olarak hazırlanmamış ve koyu renkli cam şişelerde muhafaza edilmiştir). Pozitif reaksiyonda birkaç saniye içinde katalaz aktivitesi sonucu açığa çıkan oksijen kabarcıkları gözle görülmüştür (Lelliott ve Stead, 1987). Pozitif kontrol olarak *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (GSPB 224) kullanılmıştır

3.2.4.7.Hareketlilik Testi

Litrede 10g tryptone, 5g NaCl ve 5g agar (pH:6.8-7.2) içeren ortam tüplere 5’er ml konulmuş ve 121°C’de 15 dakika otoklav edilmiştir. Besi yeri yarı katı formdadır. Tüp içersisindeki besi yerine begonya re-izolatları ve referans kültür delme şeklinde aşılandıktan 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 (Schaad ve ark, 2001). Pozitif kontrol olarak *Erwinia caratovora* subsp. *caratovora* (GSPB 1405) izolatı kullanılmıştır

3.2.4.8.Levan Oluşumu

Nutrient Agar besi yerine %5 oranında Sakkaroz eklenerek hazırlanan Sakkaroz nutrient agar (SNA) besi yerine (EK 1) begonya re-izolatları ile referans izolat çizgi ekim yöntemiyle aşılandıktan sonra petriler 25°C’de 3-4 gün inkübe edilmiştir. Kalın, beyaz, konveks, mukoid koloniler pozitif olarak değerlendirilmiştir (Lelliot ve Stead, 1987). Pozitif kontrol olarak 58/1 (r) kodlu *Erwinia amylovora*’nın bir bölge izolatı kullanılmıştır.

3.2.4.9.Pektolitik Aktivite Testi

Patates yumruları yüzeysel dezenfeksiyon için önce deterjanlı suda fırçalanarak yıkanmış ve daha sonra %1'lik NaOCI'da (hypo marka %48'lik ticari solusyon) 3 dakika bekletilmiştir. NaOCI'yi uzaklaştırmak için 3 kez steril saf su ile durulanmıştır. Bu işlemten sonra steril bir bisturi ile patates yumrularının kabukları soyulmuştur. Steril ıslak filtre kağıdı içeren steril petri içine kabuğu soyulmuş bir cm kalınlığındaki patates dilimleri yerleştirilmiştir. Bir öze dolusu bakteri kültürü patates dilimi üzerine bulaştırılmıştır. 25°C'de iki günlük inkübasyondan sonra değerlendirme yapılmıştır. İnokule edilen bölgedeki yumuşama pozitif olarak kabul edilmiştir (Lelliot ve Stead, 1987). Pozitif kontrol olarak *Erwinia caratovora* subsp. *caratovora* (GSPB 1405) izolatı kullanılmıştır

3.2.4.10.Tütünde Aşırı Duyarlılık Testi

Tütün (*Nicotiana tabacum* cv Samsun N) bitkisi yaprağının alt yüzeyine damar aralarına begonya re-izolatları ve referans kültürün 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.

3.2.5.Begonya İzolatlarının Indirect-ELISA Testi İle Tanısı

Doğu Akdeniz Bölgesinde farklı illerden izole edilen, patojenite, morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal testlere göre *Xanthomonas axonopodis* pv. *begoniae* olarak tanılanmış begonya izolatlarında tanıyı desteklemek amacıyla ELISA testleri Vunakis (1980) ile Coligan ve ark. (1991)'e göre üç tekrarlı olarak yapılmıştır. Çalışmada tüm re-izolatlar kullanılmıştır. Negatif kontrol olarak kültür hazırlanmasında kullanılan PBS, pozitif kontrol olarak referans izolat kullanılmıştır. Testte kullanılan çözeltilerin içerikleri ayrıca Ek 2'de detaylı olarak açıklanmıştır.

Tanısı desteklenecek izolatlar 48 saat YDC agar besi yerinde geliştirilmiş ve bu kültürlerden birer öze alınıp 1 ml PBS içine konarak spektrofotometrede yoğunluğu 600 nanometrede (nm) 0.1 absorbans değerine ($A_{600:0.1}$) ayarlanmıştır. Süspansiyonlar ELISA plakası (Agdia marka, katalog no BRA 23700/0500) çukurlarına 100'er µl ve 3 tekrarlı olarak yerleştirilmiştir. Plaka 37°C'de bir gece inkübe edilmiştir. 30 ml PBS'e 1.5g Pınar Yağsız Süt tozu eklenerek hazırlanan süspansiyondan her bir çukura 200 µl eklenmiştir. Plaka 60 dakika oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edilmiştir. Plaka dökülüp 5 kez yıkama tamponu (PBS+%0.05 Tween 20) ile yıkanmıştır. Yıkama tamponu (PBS+%0.05 Tween 20) ile %2.5'luk Pınar Yağsız Süt tozunun karışımıyla primer antibody hazırlanmıştır (10 ml yıkama tamponu, 0.25g Pınar Yağsız Süt tozu ve 1/200 oranında sulandırılmış 50 µl antibody karıştırılmıştır). Karıştırılıp her bir çukura 3 tekrarlı olmak üzere 100 µl konulmuştur. Plaka 1 saat oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edilmiştir. Plaka dökülüp 5 kez yıkama tamponu (PBS+%0.05 Tween 20) ile yıkanmıştır. Yıkama tamponu (PBS+%0.05 Tween 20) ile %2.5'luk Pınar Yağsız Süt tozunun karışımıyla enzim konjugant hazırlanmıştır (10 ml yıkama tamponu, 0.25g Pınar Yağsız Süt tozu ve 1/200 oranında sulandırılmış 50 µl enzim konjugant karıştırılmıştır). Karıştırılıp her bir çukura 3 tekrarlı olmak üzere 100 µl konulmuştur. Plaka 1 saat oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edilmiştir. Plaka dökülüp 5 kez yıkama tamponu (PBS+%0.05 Tween 20) ile yıkanmıştır. Substrat tamponu (800 ml destile su, 0.1g magnezyum klorid hexahidrat, 0.2g sodyum azid, 97.0 ml diethanolamid pH:9.8) 1 mg/1 ml konsantrasyonda hazırlanmış (0.01 PNP (para nitrophenil phosphat) ve 10 ml substrat tamponu) ve her bir çukura 3 tekrarlı olmak üzere 100 µl konulmuştur. Plaka 60 dakika oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edilmiştir. ELISA okuyucunda 405 nm'de absorbans değerleri okunmuş ve negatif kontrolde (PBS tamponu) okunan değerlerin en az iki katı ve fazlası veya pozitif kontrole yakın olan değerler pozitif olarak değerlendirilmiştir.

3.2.6. Begonya İzolatlarının Yağ Asit Profillerinin Belirlenmesi

Çalışmanın bu kısmı Atatürk Üniversitesi Biyoteknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezinde (Erzurum) Prof. Dr. Fikrettin ŞAHİN danışmanlığında Xab2/r, Xab7/r, Xab13/r ve Xab14/r kodlu 4 izolat ile yapılmıştır. Bakteri hücrelerinden yağ asitleri izolasyonu aşağıda belirtildiği üzere Chase ve ark. (1992)'ye göre yapılmıştır. Türlerin tanısında Mikrobiyal Identifikasyon Sisteminin (MIS) bilgisayar paket programı kullanılıp (Sherlock MIS version 4.5 Microbial ID. Inc. Newark, Delaware) izolatların içerdiği yağ asit türleri ve % oranları karşılaştırılarak tanı yapılmıştır. İzole edilen yağ asitlerinin çeşitliliği ve oranları dikkate alınarak SPSS istatistik programıyla izole edilen yağların aritmetik ortalamaları ve standart sapmaları hesaplanmıştır. Bu veriler karşılaştırılarak küme analizi yapılmış ve izolatlar arasındaki akrabalık dereceleri belirlenmiştir.

Bakteri hücreesindeki yağ asitlerin izolasyonu: Tryticase soy agar (TSBA) besi yerine (Ek 4) 4 fazlı şekilde çizilen izolatlar 25 °C'de 24 saat geliştirilmiştir. Geliştirilen bakterinin 3. ve 4. fazından toplanarak ağız teflon kapaklı steril cam tüplere konmuştur. Hücreleri parçalamak için her bir test türüne 1ml çözelti 1'den (Ek 4) eklenmiştir. Tüpler 10 saniye çalkalandıktan sonra 100 °C'deki su banyosunda 5 dakika bekletilmiştir. Çıkarılan tüpler tekrar 10 saniye daha çalkalanmıştır. Daha sonra 100°C'deki su banyosunda 25 dakika bekletilmiştir. Bu işlemle bakteri hücreleri parçalanarak yağ asitlerinin serbest kalması sağlanmıştır. Test tüplerine 2ml çözelti 2'den (Ek 4) eklenip 10 saniye çalkalandıktan sonra tüpler 80°C'deki su banyosunda 10 dakika bekletilmiştir. Bunu takiben tüpler -20°C'de 10 dakika tutulmuştur. Bu işlem ile serbest yağ asitlerine ester bağları ile metil eklenerek yağ asitlerinden yağ asit metil esteri elde edilmiştir. Bu durum yağ asitlerine yüksek sıcaklıkta buharlaşma özelliği kazandırmaktadır. Soğutulmuş tüplere 2.5ml çözelti 3 (Ek 4) eklenerek 5 dakika tüpler çalkalanmıştır. Bu aşamada tüplerin alt kısmında asidik, üst kısmında da organik sıvı fazları olmak üzere iki ayrı faz oluşmuştur. Pastör pipet kullanılarak tüplerin alt kısmındaki asidik faz atılmış ve organik faz toplanmıştır. En son aşamada ise her tüpe 3ml çözelti 4 (Ek 4) ilave edilerek 5 dakika çalkalanmıştır. Daha sonra tüpler 10 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Çözelti 4

bazik bir solüsyon olup serbest yağ metil esterlerinin daha fazla saf olarak elde edilmesini sağlar. Bu aşamadan sonra tüpler içerisinde yine iki farklı faz oluşmuştur. Üst fazda toplanan yağ asit metil esterlerini içeren faz, pastör pipet ile alınarak 2ml'lik gaz kromatografisi tüplerine aktarılmış ve ağızları sıkıca kapatılmıştır. Tüpler MIS cihazı (HP6890, HewlettPackard, Palo Alto, CA) üzerindeki örnek depolama birimine yerleştirilmiş ve daha sonra Mikrobiyal Identifikasyon Sistemin (MIS) bilgisayar paket programı kullanılarak (Shelock MIS version 4.5 Microbial ID. Inc. Newark, Delaware) her izolat tanımlanmıştır.

3.2.7.Begonya Çeşitlerinin *Xanthomonas axonopodis. pv.begoniae*'ya Karşı Dayanıklılığının Saptanması

Çalışmada rizomlu begonya çeşitlerinden 4 tane (*Begonia carollina*, *Begonia carollina* hyb "Lucerna", *Begonia masoniana* ve *Begonia metallica*), lifliköklü begonyalardan 7 tane (*Begonia semperflorens-cultorum* hibritleri; kırmızı çiçekli ve kırmızı yapraklı, kırmızı çiçekli ve yeşil yapraklı, pembe çiçekli ve kırmızı yapraklı, pembe çiçekli ve yeşil yapraklı, pembe katmerli çiçekli ve kırmızı yapraklı, beyaz çiçekli ve yeşil yapraklı, beyaz çiçekli ve kırmızı yapraklı), yumrulu begonyalardan 3 tane (*Begonia tuberhybrida* "Kleo", Futta", "Pale Pink") ve çilek begonyası (*Saxifraga stolonifera*) olmak üzere 15 farklı begonya çeşidi kullanılmıştır. Xab1/r kodlu bölge izolatının yaklaşık 7.10^6 hücre/ml yoğunluğunda hazırlanan bakteri süspansiyonu her bir bitkiye eşit gelecek şekilde bir el pülverizatörü yardımıyla yaprak altına püskürtülmüştür (Şekil 3.1). Her bir bitki çeşidinden en az 6 tane bitki kullanılmıştır. Negatif kontrol olarak her bir çeşitten 3 bitki sadece su ile inokule edilmiştir. İnokule edilen begonya çeşitleri 25°C sıcaklık, % 70-80 nem ve 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık koşullardaki iklim odasında muhafaza edilmiştir (Şekil 3.2). İnokulasyondan sonra bitkiler 24 saat nem çemberine (polietilen torba içerisinde) alınmıştır (Şekil 3.3). Haftada 3 kez bitkilere su verilmiştir (yumrulu begonya çeşitleri haftada 2 kez sulanmıştır). Simptomları oluşuncaya kadar haftada 4 kez bitkiler incelenmiştir. İnokulasyondan 15 gün sonra yapraklar 0-5 skalasına (0: hastalık yok; 1: yaprakların %1-10'unda hastalık var; 2: yaprakların %11-25'inde

hastalık var; 3: yaprakların %26-50'sinde hastalık var; 4: yaprakların %51-75'inde hastalık var; 5: yaprakların %76-100'ünde hastalık var) göre, gövde enfeksiyonu ise 0-3 skalasına (0: hastalık yok; 1: gövdenin %1-30'u hasta; 2: gövdenin %31-60'ı hasta; 3: gövdenin %61-100'ü hasta) göre değerlendirilmiştir. Çizelge 3.2'de görüldüğü gibi çeşitler dayanıklı, az duyarlı, orta duyarlı ve çok duyarlı olarak gruplara ayrılmıştır.

Çizelge 3. 1. Begonya Çeşitlerinin *Xanthomonas axonopodis. pv.begoniae*'ya Karşı Dayanıklılığının Belirlenmesinde Kullanılan Yaprak Skalası

Skala Değeri	Hastalık Yüzdesi	Duyarlılık Düzeyi
0	hastalık yok	Dayanıklı
1	%1-10	Az duyarlı
2	%11-25	Orta duyarlı
3	%26-50	Orta duyarlı
4	%51-75	Çok duyarlı
5	%76-100	Çok duyarlı

Çizelge 3. 2. Begonya Çeşitlerinin *Xanthomonas axonopodis. pv.begoniae*'ya Karşı Dayanıklılığının Belirlenmesinde Kullanılan Gövde Skalası

Skala Değeri	Hastalık Yüzdesi	Duyarlılık Düzeyi
0	hastalık yok	Dayanıklı
1	%1-30	Az duyarlı
2	%31-60	Orta duyarlı
3	%61-100	Çok duyarlı



Şekil 3. 1. Kullanılan inokulasyon yönteminin görünümü



Şekil 3. 2. İnokule edilen bitkilerin iklim odasındaki görünümü



Şekil 3. 3. İnokule edilen bitkilerin nem çemberine alınması

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Hasta Begonya Bitkilerinin Toplanması

Adana ve Mersin illerinde begonya üretimi ve satışını yapan yerlere yapılan ziyaretlerde Mersin ilinde hasta bitkilere rastlanılmamıştır (Şekil 4. 1). Adana ilinde dört farklı tarihte (2005, Şubat 2006, Nisan 2006 ve Mayıs 2006) yapılan incelemelerde hasta begonya bitkileri gözlenmiştir. Hasta bitkiler simptomolojik olarak incelendiğinde hastalık yoğun olarak hibrit yumrulu çeşitlerde tespit edilmiştir. Rizomlu ve lifli köklü begonya çeşitlerinde hastalığa rastlanılmamıştır. Yumrulu çeşitlerde hastalık yaygınlığının %15-30 oranında olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.1. Mersin’de yumrulu begonya üretimi yapılan bir seranın görünümü

Yumrulu çeşitlerde hastalık belirtileri yaprakların uç kısmında su emmiş lekeler şeklinde başlamış, hastalanmış kısım daha açık ve sarıya yakın bir renk almıştır (Şekil 4.2). Yapraklarda hastalık “V” şeklinde lekeler oluşturmuştur. Bu lekeler zamanla incelmış ve kağıt gibi bir görünüm almış ve kahverengileşmiştir (Şekil 4.3). bu nekrotik alanlar ileri dönemde yaprağın geniş alanlarını kaplamıştır. Kuruyan yaprak dökülmeden yanmış bir şekilde gövdede asılı kalmıştır. Bakteri iletim demetlerine giriş yaptığında meydana gelen sistemik enfeksiyonlar sonucu gövdede bakteriyel akıntı (Şekil 4.4) ve gövdede yanıklık (Şekil 4.5) belirtileri tespit edilmiştir. İleri dönemde ise bitkide çöküşler gözlenmiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4.2. Yaprakta su emmiş leke ve sararma belirtileri



Şekil 4.3. Yapraklarda “V” şeklinde lekeler ve kağıt gibi incelmış görünüm



şekil 4.4. Sistemik enfeksiyonlar sonucu oluşan bakteriyel akıntı



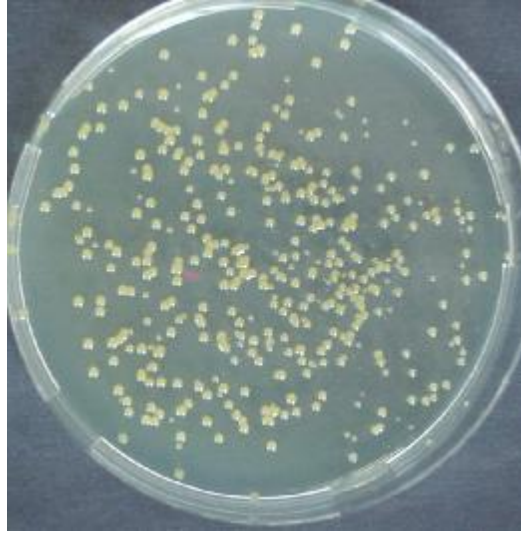
Şekil 4.5. Sistemik enfeksiyonlar sonucu oluşan gövde ve yaprak yanıklığı



Şekil 4.6. Şiddetli enfeksiyonlar sonucu oluşan bitki ölümü

4.2. Begonyada Bakteriyel Leke ve Yanıklık Etmeninin İzolasyonu

Adana, Manisa ve İstanbul’da üretilen begonya bitkilerinin yaprak ve gövdelerinden yapılan izolasyonlarda 4-5 gün içinde YDC besi yerinde koyu sarı ve King B besi yerinde açık sarı (Şekil 4.7) renkte koloniler dominant olarak gelişmiştir. Çizelge 4.1.’de görüldüğü gibi 17 izolat saflaştırılarak bu tez çalışmasında kullanılmıştır.



Şekil 4.7. King B besi yerinde gelişen açık sarı renkte koloniler

Çizelge 4.1. Kullanılan izolatların kod numaraları, izole edildikleri yer ve tarih

İzolatların Kod Adları	Konukçu	İzole Edildiği Yer	İzolasyon Tarihi	Referans Kaynağı
BPIC 2013/94	Begonya	Yunanistan (Referans izolat)	-	Dr. Alivizatos
Xab1/r	Begonya	Adana	2005	Tez Çalışması
Xab2/r	Begonya	Adana	2005	Tez Çalışması
Xab3/r	Begonya	Adana	2005	Tez Çalışması
Xab4/r	Begonya	Adana	2005	Tez Çalışması
Xab5/r	Begonya	Adana	2005	Tez Çalışması
Xab6/r	Begonya	Manisa	2005	Tez Çalışması
Xab7/r	Begonya	Manisa	2005	Tez Çalışması
Xab8/r	Begonya	Manisa	2005	Tez Çalışması
Xab9/r	Begonya	Manisa	2005	Tez Çalışması
Xab10/r	Begonya	İstanbul	2006	Tez Çalışması
Xab11/r	Begonya	İstanbul	2006	Tez Çalışması
Xab12/r	Begonya	İstanbul	2006	Tez Çalışması
Xab13/r	Begonya	İstanbul	2006	Tez Çalışması

Xab14/r	Begonya	Adana	2006	Tez Çalışması
Xab15/r	Begonya	Adana	2006	Tez Çalışması
Xab16/r	Begonya	Adana	2006	Tez Çalışması
Xab17/r	Begonya	Adana	2006	Tez Çalışması

4.3. Patojenite Testi

Bakteri inokulumu hazırlanırken yapılan ön denemede $A_{600}:0.2$ ölçüm değerinde yaklaşık 7×10^8 hücre/ml bakteri yoğunluğu hesaplanmıştır. Patojenite testlerinde bu yoğunlukta hazırlanan bakteri süspansiyonu 1/100 oranında seyreltilerek (yaklaşık 7×10^6 hücre/ml) kullanılmıştır. 17 adet bölge izolatu ve referans kültür ile yapılan patojenite testlerinde tüm izolatlar inokulasyondan sonraki 7-10 gün içinde begonya yapraklarının alt yüzeyinde önce su emmiş ve daha sonra karakteristik sarı lekeler ve yanıklık belirtileri oluşturarak patojen özellikte oldukları saptanmıştır (Şekil 4.8). Negatif kontrol olarak sadece suyla inokule edilen bitkilerde herhangi bir hastalık belirtisi gözlenmemiştir. Tipik hastalık belirtisi gösteren bitkilerden yapılan re-izolasyonlar sonucu 17 re-izolat tekrar elde edilmiştir.



Şekil 4.8. Patojenite testinde çilek begonyasında (solda) ve lifli köklü begonyada (sağda) oluşan yaprak lekeleri ve yanıklıkları

4.4.Bakteri İzolatlarının Tanılama Test Sonuçları

4.4.1.Koloni Gelişimi

4.4.1.1.YDC Besi Yerinde Gelişim

Begonya izolatları ve referans kültürler YDC besi yerinde mukoid, sarı, konveks koloniler şeklinde gelişmiştir (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. Xab 2/r kodlu izolatının YDC besi yerindeki koloni gelişimi

4.4.1.2.Nutrient Agar (NA) Besi Yerinde Gelişim

Begonya izolatları ve referans kültür NA besi yerinde tipik sarı yuvarlak koloni gelişimi göstermişlerdir.

4.4.1.3.Tween B Besi Yerinde Gelişim

Begonya izolatları ve referans kültür Tween B besi yerinde yuvarlak, sarı tümsek ve çevresinde temiz haleli koloniler geliştirmiştir (Şekil 4.10).

4.4.1.4.CKTM Besi Yerinde Gelişim

Begonya izolatları ve referans kültür CKTM yerinde 1-2 gün sonra koloni etrafında temiz bir halka oluşturmuştur (Şekil 4.10).

4.4.1.5. SM Besi Yerinde Gelişim

Begonya izolatları ve referans kültür 5-7 gün sonunda, merkezi koyu mavi, kenarları daha açık renkli kubbemsi koloni gelişimi göstermiştir (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. Xab2/r kodlu izolatının SM (üstte), Tween B (alt solda) ve CKTM (altta sağda) besi yerinde oluşturduğu koloni morfolojisi

4.4.1.6. SX Besi Yerinde Gelişim

Begonya izolatları ve referans kültür 5 gün sonra kubbemsi SM ortamına göre daha açık mor renkli koloniler oluşturmuştur.

4.4.1.7. MD-5 Besi Yerinde Gelişim

Begonya izolatları ve referans kültür 7-10 gün içinde açık sarı, parlak, kubbemsi koloni gelişimi gözlenmiştir.

4.4.2.Potasyum Hidroksit Testi (KOH)

Begonya izolatları ve referans kültür test sonucunda özeye yapışarak sümüksü bir yapı oluşturduğundan gram negatif olarak kabul edilmiştir (Çizelge 4.4, Şekil 4.11). Karşılaştırma kültürü olarak kullanılan gram pozitif *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'de (GSPB 382) sümüksü bir oluşum gözlenmezken *Pseudomonas cichorii* (GSPB 2297) kültürü özeye yapışarak sümüksü bir yapı oluşturmuştur.



Şekil 4.11. KOH testinde Gram negatif kültürlerinin oluşturduğu sümüksü yapı

4.4.3.Oksidaz Testi

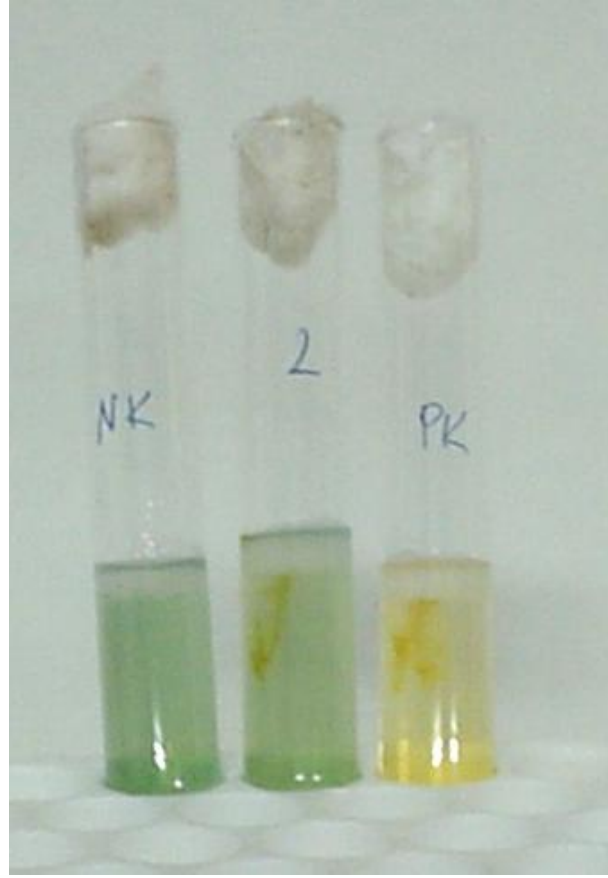
Begonya izolatları ve referans kültür oksidaz test solüsyonu emdirilmiş filtre kağıdına çizilen zigzaglar sonucu hiçbir renk değişimi meydana getirmediğinden oksidaz negatif olarak değerlendirilmiştir. Pozitif kontrol olarak kullanılan *P. cichorii* kültürü birkaç saniye içinde koyu mor renk oluşturmuştur (Çizelge 4.4, Şekil 4.12).



Şekil 4.12. Oksidaz pozitif (solda) ve negatif (sağda) reaksiyon

4.4.4.Oksidasyon / Fermantasyon Testi (O/F)

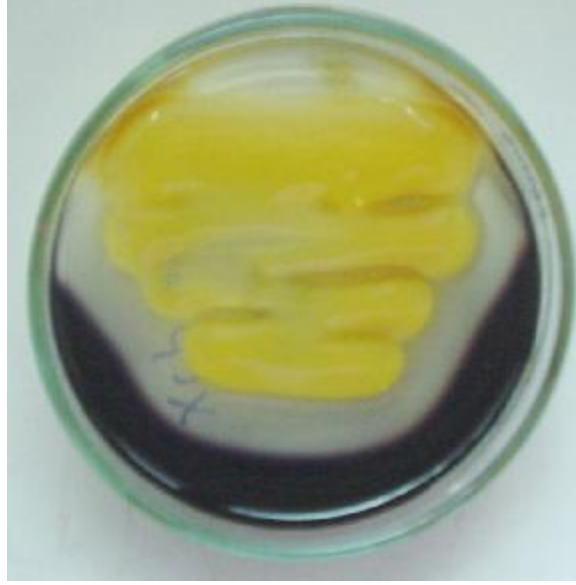
Değerlendirme 26°C’de altı günlük bir inkübasyondan sonra yapılmış ve bütün bakteri kültürleri oksijenli (vasparsız) besi yerinde gelişim göstererek tüplerin rengini sarıya çevirmişlerdir. Oksijensiz (vasparlı) besiyerinde, elde edilen izolatlar ve orijinal kültürlerin tümü gelişmediğinden besi yerinin renginde bir değişim olmamıştır (Çizelge 4.4, Şekil 4.13). Begonya izolatlarının oksidatif özellikte olduğu saptanmıştır. Kontrol olarak kullanılan *Erwinia amylovora* ile aşılansız oksijensiz besiyerinde de hiçbir değişim gözlenmezken *Erwinia caratovora* (GSPB 1405) bu besi yerinde gelişerek rengini sarıya çevirmiş ve fermantatif olarak değerlendirilmiştir.



şekil 4.13 .Oksijensiz ortamda gelişme gösteren (sağda) ve göstermeyen (soldan ilk iki) bakteri kültürleri

4.4.5.Nişasta Hidrolizasyonu

Nişasta besiyeri yerine çizilen begonya izolatları ve referans kültür 7-14 günlük inkübasyon sonunda üzerine lugol eriğı döküldüğünde koloni çevresinde belirgin parlak bir alan gözlendiğinden nişasta hidrolizi pozitif olarak değerlendirilmiştir (Çizelge 4.4, şekil 4.14).



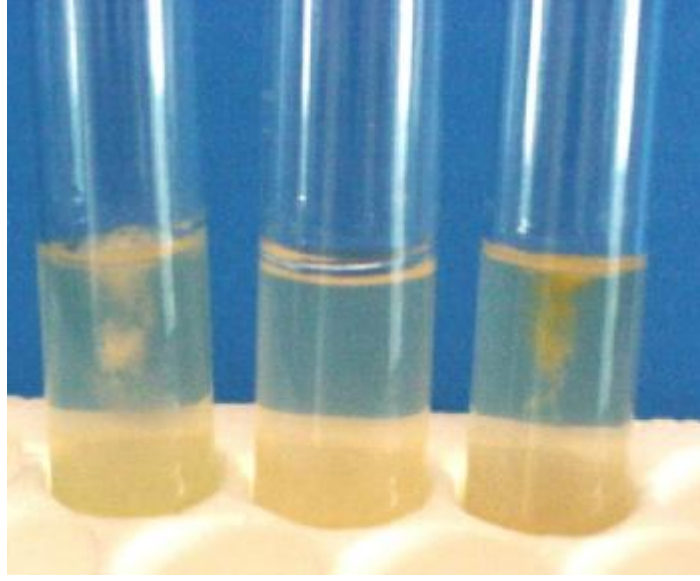
Şekil 4.14. Xab2/r kodlu izolatının nişastayı hidrolize etmesi

4.4.6.Katalaz Reaksiyonu

Besi yerine aşılama yapıldıktan 24 saat sonra %3'lük H_2O_2 döküldüğünde birkaç saniye içersinde gaz kabarcıkları gösteren begonya izolatları ve referans kültür katalaz pozitif olarak kabul edilmiştir (Çizelge 4.4).

4.4.7.Hareketlilik Testi

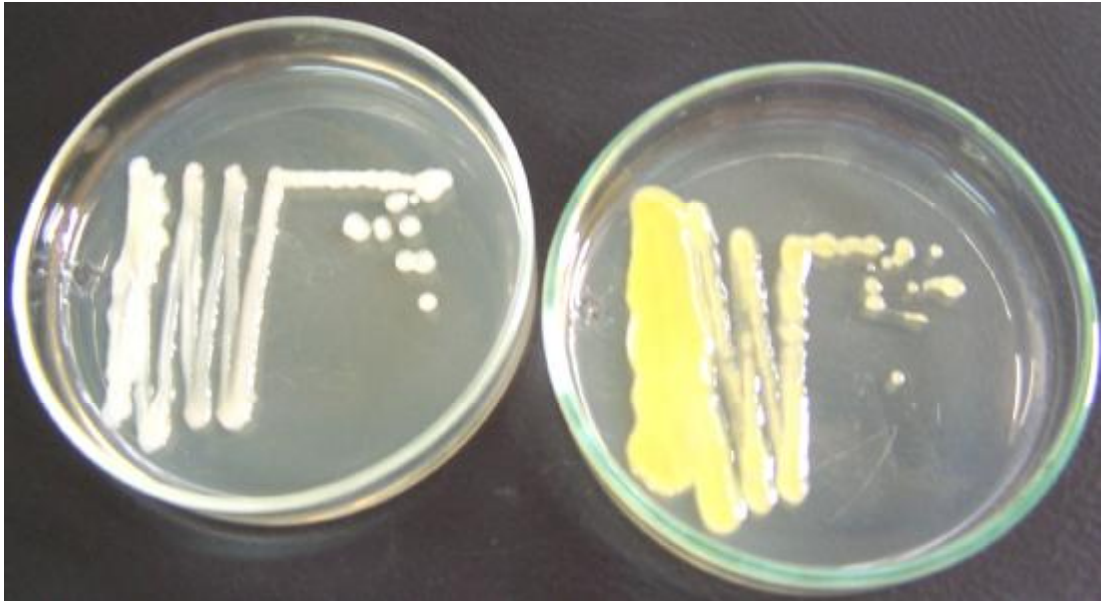
Begonya izolatları ve referans kültür ile aşılama yapılan bölgenin çevresinde koloni gelişimi gösterdiklerinden pozitif olarak değerlendirilmiştir (Çizelge 4.4, Şekil 4.15).



Şekil 4.15. Xab2/r kodlu izolatın (solda) ve referans kültürün (sağda) hareketlilik özelliği, negatif kontrol olarak aşılınmamış besi yeri (ortada)

4.4.8.Levan Oluşumu

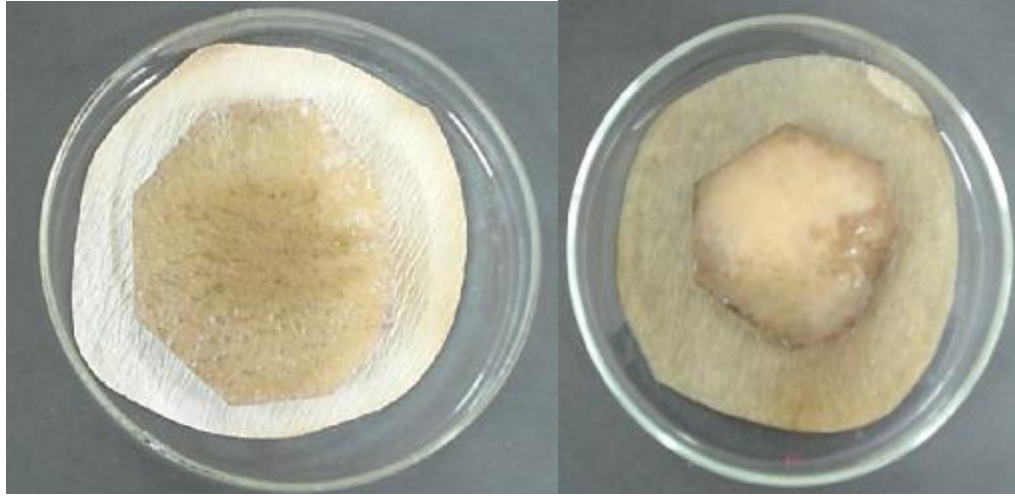
SNA besi yerine çizimi yapılan begonya izolatları ve referans kültür levan tipi koloniler üretmiştir (Çizelge 4.4, Şekil 4.16).



Şekil 4. 16. Xab2/r kodlu izolatın (sağda) ve *E. amylovora*'nın (solda) oluşturduğu levan tipi koloniler

4.4.9. Pektolitik Aktivite

Begonya izolatları ve referans kültürün hiç biri patates dilimleri üzerinde yumuşak çürüklük oluşturmamıştır. Pozitif kontrol olarak kullanılan *Erwinia caratovora* subsp. *caratovora* (GSPB 1405) patates dilimlerinde yumuşamaya neden olmuştur (Çizelge 4.4, Şekil 4.17).



Şekil 4.17. Patateste çürümeye neden olmayan Xab2/r kodlu izolat (solda) ve yumuşak çürüklük oluşturan *Erwinia caratovora* subsp. *caratovora* (PD-1302) (sağda)

4.4.10. Tütünde Aşırı Duyarlılık (Hypersensitive Reaction-HR) Testi

Begonya izolatları ve referans kültürün hiç biri tütün yapraklarında tipik aşırı duyarlılık reaksiyonuna neden olmamıştır (Çizelge 4.4).

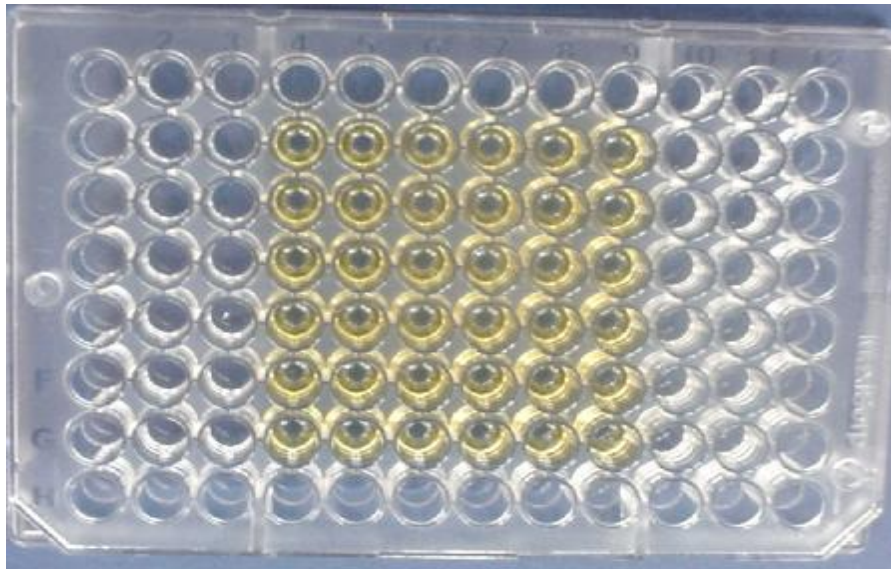
Yapılan tanı testleri sonucu elde edilen sonuçlar topluca Çizelge 4.2’de verilmiştir. Görüldüğü gibi tüm testlerde begonya izolatı ve referans izolat benzer sonuç verdiği için dolaylı izolatlar *Xanthomonas axonopodis* pv. *begoniae* olarak tanımlanmıştır.

Çizelge 4.2. Tanılama test sonuçları

Testler	Begonya İzolatları (17 adet)	Referans İzolat (BPIC 2013/94)
Gram reaksiyon	-	-
Oksidaz testi	-	-
Oksidatif/Fermantatif(O/F)	O	O
Nişasta hidrolizasyonu	+	+
Katalaz reaksiyonu	+	+
Hareketlilik	+	+
Levan oluşumu	+	+
Pektolitik aktivite	-	-
Tütünde HR	-	-

4.5. Begonya İzolatlarının Indirect-ELISA Testi İle Tanısı

Agdia marka ticari tanı kiti ile yapılan Indirect-ELISA testinde, 405nm’de absorbans değerleri 1.317-3.346 arasında kaydedilmiştir (Çizelge 4.3). Pozitif kontroldeki absorbans değeri 1.356 iken negatif kontrolde 0.622 olarak belirlenmiştir. Elde edilen absorbans değerlerinin negatif kontrolün değerinin 2 katından fazla oluşu ve pozitif kontrole yakın oluşuyla tüm testlenen izolatların *Xanthomonas axonopodis* pv. *begoniae* olduğu ELISA testiyle de doğrulanmıştır. Pozitif reaksiyonda ELISA plakalarının almış olduğu sarı renk de Şekil 4.18’de görülmektedir.



Şekil 4.18. Begonya izolatlarıyla yapılan indirect-ELISA testinde plakalarının görünüşü

Çizelge 4.3. ELISA plate okuyucusunda begonya izolatlarının okunan absorbens değerleri (ölçümler 405 nm’de yapılmıştır)

İzolat adı	İzolatın alındığı yer	Ortalama	Sonuç
PBS	-	0.622	-
BPIC 2013/94	Referans	1.356	+
Xcb 1/r	Adana	2.635	+
Xcb 2/r	Adana	3.064	+
Xcb 3/r	Adana	3.346	+
Xcb 4/r	Adana	2.929	+
Xcb 5/r	Adana	3.413	+
Xcb 6/r	Manisa	2.297	+
Xcb 7/r	Manisa	2.765	+
Xcb 8/r	Manisa	2.588	+
Xcb 9/r	Manisa	3.269	+
Xcb 10/r	İstanbul	2.952	+
Xcb 11/r	İstanbul	1.852	+
Xcb 12/r	İstanbul	1.725	+
Xcb 13/r	İstanbul	3.539	+
Xcb 14/r	Adana	2.858	+
Xcb 15/r	Adana	3.016	+
Xcb 16/r	Adana	3.267	+
Xcb 17/r	Adana	2.413	+

4.6. Begonya İzolatlarının Yağ Asit Profillerinin Belirlenmesi

Çizelge 4.4’de de görüldüğü üzere 4 begonya izolatının yağ asit metil ester analiz çalışması yapılmış ve yapılan bu çalışmada 23 farklı yağ asidi izole edilmiştir (Çizelge 4.4). İzole edilen yağ asitleri, 10:0 (%1.03), 10:0 3OH (%0.48), 11:0 ISO (%4.78), unknown 11:799 (%1.07), 11:0 ISO-3OH (%1.7), 11:0 3OH (%0.30), 12:0-3OH (%4.03), 14:0 (%2.44), 13:0 ISO-3OH (%3.41), 15:0 ISO (%28.33), 15:0 ANTEISO (%9.14), 15:1 w6c (%0.8), 15:0 (%1.93), 16:0 ISO (%1.65), 16:1 w9c (%2.38), Sum in feature 3 (%23.66), 16:0 (%5.72), ISO 17:1 w9c (%4.25), 17:0 ISO (%5.77), 17:0 w8c (%3.02), 17:1 w6c (%0.63), 18:0 ISO (%0.49) ve Summed feature 3 (%23.66) olarak belirlenmiştir. İzole edilen yağ asitleri doymuş (10:0, 14:0, 15:0, 16:0), doymamış (15:1 w6c, 16:1 w9c, 17:1 w8c, 17:1 w6c, ISO17:1 w9c), bir metil grubu bağlanmış (11:0 ISO, 11:0 ISO-3OH, 13:0 ISO-3OH, 15:0 ISO, 15:0 ANTEISO, 16:0 ISO, 17:0 ISO, 18:0 ISO), bir tane sum in features (3), hidroksil (10:0 3OH, 11:0-3OH, 12:0-3OH) ve bilinmeyen yağ asidi (unknown 11.799) olmak

üzere 6 grup olduğu saptanmıştır. Genelde yağ asit çeşidi ve miktarı açısından büyük benzerlikler olduğu görülmektedir. Yağ asitlerinden 11:0 ISO, 12:0-3OH, 13:0 ISO-3OH, 15:0 ISO, 15:0 ANTEISO, Summed feature 3, 16:0, ISO17:1 w9c ve 17:0 ISO yağ asitlerinin tüm izolatlarda bulunduğu belirlenmiştir. Diğer yağ asitleri açısından değişen oranlarda farklılıklar bulunmaktadır. Obradovic ve ark. (2004) 11:0 ISO, 11:0 ISO 3OH ve 13:0 ISO 3OH yağ asitlerinin *Xanthomonas*'lar için karakteristik olduğunu belirtmiştir. Yağ asit analizlerine göre yapılan tanıda izolatlar %23-76 benzerlik oranıyla *Xanthomonas axonopodis* pv. *begoniae* olduğu saptanmıştır. Bir izolatın MIDI sonucu Şekil 4.5'de görülmektedir.

İzole edilen yağ asitlerinin miktarına göre yapılan analiz sonucu oluşan dendogramda 4 izolatın %92.5 oranında birbirleri ile benzer oldukları saptanmıştır (Şekil 4.19).

Çizelge 4.4. Begonya kültürlerinden izole edilen yağ asitleri ve bulunma oranları (%)

İzole edilen yağ asitleri	Begonya izolatları			
	Xab2	Xab7	Xab13	Xab14
10:00	1.27	0.92	1.09	0.0
10:0 3OH	0.0	0.48	0.0	0.0
11:0 ISO	5.85	3.84	4.10	5.34
11:799?	1.19	1.00	1.02	0.0
11:0 ISO 3OH	1.72	1.69	1.69	0.0
11:0 3OH	0.0	0.0	0.30	0.0
12:0 3OH	4.03	3.38	3.33	5.41
14:00	3.06	1.91	2.35	0.0
13:0 ISO 3OH	3.50	3.53	2.91	3.71
15:0 ISO	26.03	28.02	28.76	30.52
15:0 ANTEISO	9.21	9.00	8.65	9.72
15:1 w6c	0.0	1.13	0.62	0.0
15:00	2.20	1.67	1.93	0.0
16:0 ISO	1.72	1.04	2.21	0.0
16:1 w9c	3.60	1.68	1.88	0.0
SumIn Feature3	22.83	22.02	23.41	26.41
16:00	6.34	4.88	6.09	5.57
ISO 17:1 w9c	3.18	4.80	3.40	5.64
17:0 ISO	4.28	5.90	5.24	7.67
17:1 w8c	0.0	1.99	1.03	0.0
17:1 w6c	0.0	0.63	0.0	0.0
18:0 ISO	0.0	0.49	0.0	0.0
SummedFeature3	22.83	22.02	23.41	26.41

Çizelge 4.5. Bir begonya izolatının MIDI sonucu

Begonya 7 Xcb7

E047075.40A [1509] m7 Page 1

Volume: DATA File: E047075.40A Seq Counter: 4 ID Number: 1509
 Type: Samp Bottle: 3 Method: TSBA40
 Created: 7/7/04 2:14:01 PM
 Sample ID: m7

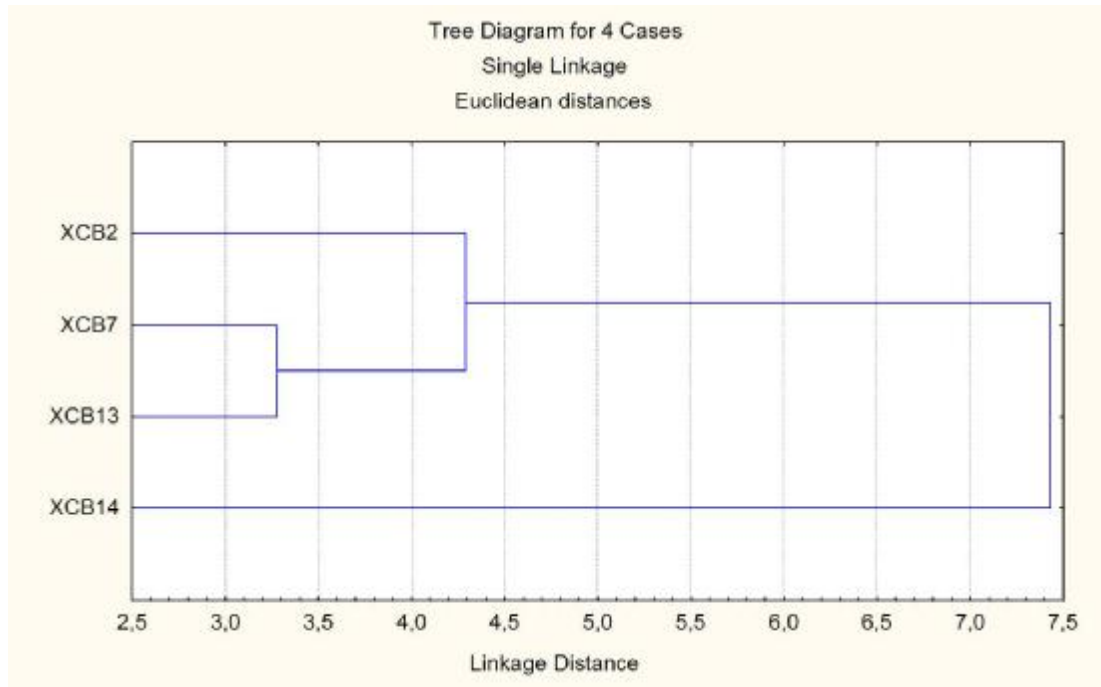
RT	Response	Ar/Hr	RFact	ECL	Peak Name	Percent	Comment1	Comment2
0.038	447	0.038	----	2.295		----	< min rt	
0.410	385	0.032	----	2.273		----	< min rt	
0.466	645	0.029	----	2.404		----	< min rt	
1.391	1.08E+6	0.021	----	7.358	SOLVENT PEAK	----	< min rt	
1.691	36921	0.019	----	7.293		----	< min rt	
2.838	441	0.022	1.264	10.300	10:0	0.92	ECL deviates 0.000	Reference -0.010
3.195	1935	0.023	1.208	10.507	11:0 ISO	3.84	ECL deviates 0.001	Reference -0.007
3.754	257	0.026	1.138	11.416	10:0 ISOH	0.48	ECL deviates -0.006	
4.087	546	0.023	1.111	11.799	unknown 11.799	1.00	ECL deviates 0.000	
4.200	937	0.029	1.093	12.384	11:0 ISO ISOH	1.69	ECL deviates -0.005	
5.771	2008	0.035	1.022	12.430	12:0 ISOH	3.38	ECL deviates -0.004	
6.445	1161	0.036	1.008	14.300	14:0	1.91	ECL deviates 0.000	Reference -0.004
6.491	2151	0.035	0.996	14.106	13:0 ISO ISOH	3.53	ECL deviates -0.003	
7.317	17368	0.037	0.979	14.422	15:0 ISO	38.02	ECL deviates -0.001	Reference -0.005
7.442	5595	0.037	0.976	14.711	15:0 ANTEISO	9.00	ECL deviates -0.002	Reference -0.005
7.641	706	0.036	0.972	14.852	15:1 w/c	1.13	ECL deviates -0.004	
7.849	1047	0.029	0.968	15.300	15:0	1.67	ECL deviates 0.000	Reference -0.003
8.819	661	0.036	0.951	15.527	16:0 ISO	1.04	ECL deviates 0.000	Reference -0.003
9.042	1077	0.030	0.947	15.771	16:1 w/c	1.68	ECL deviates -0.003	
9.109	14127	0.042	0.946	15.515	Sum In Feature 3	22.02	ECL deviates -0.007	16:1 w/c/15 iso ISOH
9.398	3142	0.040	0.942	16.302	16:0	4.88	ECL deviates 0.002	Reference -0.001
10.075	3128	0.043	0.932	16.414	ISO 17:1 w/c	4.80	ECL deviates -0.002	
10.430	2863	0.040	0.927	16.532	17:0 ISO	5.90	ECL deviates 0.002	Reference -0.001
10.690	1307	0.048	0.923	16.790	17:1 w/c	1.99	ECL deviates -0.002	
10.814	412	0.034	0.922	16.566	17:1 w/c	0.63	ECL deviates 0.006	
11.756	109	0.014	----	17.428		----	< min ar/h	
12.098	330	0.038	0.904	17.630	18:0 ISO	0.49	ECL deviates -0.002	Reference -0.005
----	14127	----	----	----	Summed Feature 3	22.02	16:1 w/c/15 iso ISOH	13:0 ISO ISOH/16:1 w/c

ECL Deviation: 0.003 Reference ECL Shift: 0.005 Number Reference Peaks: 10
 Total Response: 62305 Total Named: 62196
 Percent Named: 99.83% Total Amount: 60689

Matches:

Library	Sim Index	Entry Name
TSBA40 4.10	0.761	Xanthomonas-axonopodis-begoniae
	0.709	Xanthomonas-axonopodis-manihotis
	0.676	Xanthomonas-axonopodis-vitians
	0.642	Xanthomonas-axonopodis-physalidicola
	0.620	Xanthomonas-axonopodis-vesicatoria
	0.608	Xanthomonas-axonopodis-dieffenbachiae
	0.607	Xanthomonas-axonopodis-zinniae
	0.600	Xanthomonas-axonopodis-malvacearum
	0.594	Xanthomonas-axonopodis-phaseoli fuscans
	0.575	Xanthomonas-axonopodis-phaseoli

Sherlock Version 4.5 (0209B) Printed on 07-Jul-2004



Şekil 4. 19. Yağ asit profillerine dayanan küme analizi sonucu izolatların farklılık oranları

4.7.Begonya Çeşitlerinin *Xanthomonas axonopodis* pv. *begoniae*'ya Karşı Dayanıklılığının Saptanması

Farklı begonya çeşitlerinin *Xanthomonas axonopodis* pv. *begoniae*'ya karşı gösterdikleri yaprak reaksiyonları 0-5 skalasına göre değerlendirilirken gövde reaksiyonları 0-3 skolasına göre değerlendirilmiş ve elde edilen bulgular Çizelge 4.6 ve 4.7'de verilmiştir. Bakteri inokulumu 15 farklı begonya çeşidine yapraktan ve gövdeden püskürtme şeklinde inokule edildiğinde oluşan hastalık belirtilerinde çeşitlere göre farklılık gösterdiği belirlenmiştir. Genellikle simptomlar yapraklarda su emmiş lekeler şeklinde başlamış ve ilerleyen günlerde sararma ve nekrotik alanlar oluşturmuştur.

Rizomlu begonyalardan *Begonia corallina* hibrit "Lucerna" da ilk simptomlar toplu iğne başı büyüklüğünde kahverengi lekelerle şeklinde başlamış ileriki günlerde bu alanların yaprağın tamamını kapladığı, yaprak sapının inceliyor ve kırılarak

döküldüğü gözlenmiştir (Şekil 4.20). Hastalık sadece inokule edilen yapraklarda görülmüş ancak diğer yapraklara bulaşmamıştır. İnokule edilen yaprakların ortalama %77'si hastalanmış ve skala değeri olarak 5 içinde yer almıştır. Gövdede ise hiç hastalık belirtisine rastlanılmamış ve gövde skala değeri olarak 0 içinde yer almıştır. *Begonia corallina* hibrit “Lucerna” çeşidin yaprakları hastalığa çok duyarlıyken gövdesinin hastalığa dayanıklı olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4. 20. *Begonia corallina* hibrit “Lucerna” çeşidinde *Xanthomonas axonopodis* pv. *begoniae*'nin oluşturduğu yaprak lekeleri ve bir dökülmüş yaprak

Rizomlu begonyalardan *Begonia corallina*'da ilk belirtiler geniş su emmiş lekelerle başlamış daha sonra yapraklarda yeşilimsi-kahverengi renklenme ve kâğıt gibi incelmeler gözlenmiş ve sonunda hasta yapraklar dökülmüştür (Şekil 4.21). Hastalık sadece inokule edilen yapraklarda görülmüş ancak diğer yapraklara bulaşmamıştır. Hasta yapraklar döküldükten sonra bitki canlılığını korumuş ve gelişmeye devam etmiştir. İnokule edilen yaprakların ortalama %57'si hastalanmış ve skala değeri olarak 4 içinde yer almıştır. Gövdede hiç hastalık belirtisine rastlanılmamış ve gövde skala değeri olarak 0 içinde yer almıştır. Bu çeşidin yaprakları hastalığa çok duyarlı olarak belirlenirken gövdesinin hastalığa dayanıklı olduğu saptanmıştır. Benzer şekilde Chase (1987)'nin bildirdiğine göre Harri (1977) yaptığı çalışmada *Begonia corallina*'nın gövdesinin sertliği nedeniyle sistemik enfeksiyonlara dayanıklı olduğunu bildirmiştir.



Şekil 4. 21. *Begonia corallina*'da *Xanthomonas axonopodis* pv. *begoniae*'nin hastalık belirtileri

Rizomlu begonyaların diğ er bir çeşidi olan *Begonia metallica*'da ilk belirtiler yaprakların uç kısmında gözlenmiştir. Belirtiler kenardan içe doğru genişleyerek yaprağın tamamını kaplamış ve yaprağı kurutmuştur ( ekil 4.22). İlerleyen dönemde kuruyan yapraklar dökülmüştür. Yaprakların ortalama %62'si hastalanmış ve skala değeri olarak 4 içinde yer almıştır. Gövdenin %15'inde küçük küçük beneklenmeler şeklinde gövde lekeleri kaydedilerek gövde enfeksiyonu skala değeri olarak 1 içinde yer almıştır. Bu çeşidin gövdesi diğ er rizomlu begonyalara göre daha yumuşak olduğundan hastalık belirtilerinin oluştunu düşünmekteyiz. Sonuç olarak *Begonia metallica*'nın yaprakları hastalığa çok duyarlıyken olarak gövdesinin hastalığa az duyarlı olduğı saptanmıştır.



Şekil 4. 22. *Begonia metallica*'da *Xanthomonas axonopodis* pv. *begoniae* tarafından hastalandırılmış ve kurumuş yaprak

Rizomlu begonyaların diğ er bir çeşidi olan *Begonia masoniana*'da simptomlar sadece yaprak kenarında ince bir hat şeklinde kıvrılma ve sarı haleli kahverengileşme şeklinde ortaya çıkmıştır (Şekil 4.23). Hastalık sınırlı olarak kalmış hiç ilerlememiştir. Hastalana yapraklar d ok lmemiştir. İnokule edilen yaprakların ortalama %13'  hastalanmış ve skala değeri olarak 1 içinde yer almıştır. Gövdede hiç hastalık belirtisine rastlanılmamış ve gövde skala değeri olarak 0 içinde değ erlendirilmiştir. Bu çeşit hem yaprak hem de gövde enfeksiyonlarına karşı dayanıklı olarak saptanmıştır.



Şekil 4. 23. *Begonia masoniana*'da *Xanthomonas axonopodis* pv. *begoniae*'nın hastalık belirtileri

Lifliköklü begonya veya her zaman iekli oluşlarıyla iek begonyaları olarak adlandırdığımız *Begonia semperflorens-cultorum* hibridlerinin tümünde yaprak enfeksiyonları yaprağın uç kısmında su emmiş ince uzun şeritler halinde başlayıp yaprağın tümünü kaplamıştır. Enfeksiyon yapraktan yaprak sapına ve gövdeye doğru ilerlemiştir. Yaprak lekeleri yerine bu eşitin tüm hibritlerinde ani ve hızlı yaprak yanıklıkları gözlenmiştir. Sonunda tüm bitkide yumuşama ve çöküşler tespit edilmiştir.

Begonia semperflorens-cultorum hibridleri arasında en fazla hastalıktan etkilenen çeşit kırmızı iekli ve kırmızı yapraklı iek begonyası olmuştur. Hem yaprak hem de gövdede belirtiler çok hızlı ilerlemiş ve iki bitkinin 10. günde tamamen çöktüğü gözlenmiştir. Yaprakların ortalama %80'i kurumuş ve skala değeri olarak 5 içinde yer almıştır. Bu çeşidin gövdesinin yaprak kadar yumuşak ve sulu oluşu nedeniyle şiddetli gövde enfeksiyonları belirlenmiştir. Gövdenin %97'si etkilenerek bitkiler lmştir. Devrilmiş olan gövde incelendiğinde sistemik enfeksiyonların olduğu saptanmıştır. Bu çeşit hem gövde hem de yaprak enfeksiyonlarına en duyarlı çeşit olarak bulunmuştur.

Begonia semperflorens-cultorum hibridlerinden beyaz iekli ve yeşil yapraklı begonya (şekil 4. 24) pembe katmerli iekli ve kırmızı yapraklı begonya (şekil 4. 25) ile kırmızı iekli ve yeşil yapraklı begonyaların (şekil 4. 26) yapraklarında sırasıyla ortalama %57, 57 ve 70 oranında yanıklık belirlenerek 4 nolu skala içerisinde yer alarak yaprak enfeksiyonlarına çok duyarlı çeşitler olduğu saptanmıştır. Bu eşitler arasında beyaz iekli ve yeşil yapraklı begonya gövde enfeksiyonlarında orta duyarlı iken pembe katmerli iekli ve kırmızı yapraklı begonya ile kırmızı iekli ve yeşil yapraklı begonya çok duyarlı olarak belirlenmiştir. *Begonia semperflorens-cultorum* hibridlerinden beyaz iekli ve kırmızı yapraklı begonya, pembe iekli ve kırmızı yapraklı begonya ile pembe iekli ve yeşil yapraklı begonya (şekil 4. 27) eşitlerinin yapraklarında sırasıyla % 50, 50, 37 düzeyinde yanıklık meydana gelmiş, skala değeri olarak 3 içinde yer almış ve yaprak enfeksiyonlarına orta duyarlı olarak saptanmıştır. Bu eşitler gövde enfeksiyonlarına çok duyarlı oldukları belirlenmiştir.



Şekil 4. 24. *Begonia semperflorens-cultorum* hibridlerinden beyaz çiçekli ve yeşil yapraklı begonyada hastalık belirtisi



Şekil 4. 25. *Begonia semperflorens-cultorum* hibridlerinden pembe katmerli çiçekli ve kırmızı yapraklı begonyada hastalık belirtisi



Şekil 4. 26. *Begonia semperflorens-cultorum* hibridlerinden kırmızı çiçekli ve yeşil yapraklı begonyada hastalık belirtisi



Şekil 4. 27. *Begonia semperflorens-cultorum* hibridlerinden pembe çiçekli ve yeşil yapraklı begonyada hastalık belirtisi

Yumrulu begonyalardan *Begonia tuberhybrida* çeşitlerinden “Futta”, “Kleo” ve “Pale Pink”’de sırasıyla yaprak yanıklığı %53, 57, 67 oranında belirlenmiş ve skala değeri olarak 4’de yer almıştır. *Xanthomonas axonopodis* pv. *begoniae*’nın yaprak enfeksiyonlarına karşı bu çeşitlerin çok duyarlı olduğu saptanmıştır. Hastalanmış yapraklar tamamen yanmasına rağmen dökülmemiştir (Şekil 4. 28). Gövde enfeksiyonu açısından değerlendirme yapıldığında çeşitlerin hastalığa az duyarlı olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4. 28. *Begonia tuberhybrida*’nın hibrit illumination serisinden “Pale Pink” çeşidinde *Xanthomonas axonopodis* pv. *begoniae*’nın oluşturduğu yaprak yanıklıkları

Hastalık *Saxifraga stolonifera*'nın yapraklarının uç kısmından V şeklinde başlamış ve içeriye doğru genişleyerek ilerlemiştir. Yapraklarda uç kısımlardan başlayan genel bir sararma, yaprak lekeleri ve yaprağın tamamında yanıklık gözlenmiştir. Etkilene yapraklar kıvrılarak kurumuş ve yanmış bir şekilde dalda asılı kalmıştır (Şekil 4. 29). Yaprakların ortalama %53'i kurumuş ve skala değeri olarak 4 içinde yer almıştır. Gövdenin %27'si etkilenmiş ve bu çeşit gövde enfeksiyonlarına orta duyarlı olarak değerlendirilmiştir.

Yapılan bu çalışmayla *Saxifraga stolonifera*'nın *Xanthomonas axonopodis* pv. *begoniae*'nin bir konukçusu olduğu saptanmıştır. *Saxifraga stolonifera* taksonomik olarak diğer begonyalar ile aynı cins altında yer almamaktadır. *Saxifraga stolonifera* Magnoliopsida sınıfından Rosidae alt sınıfından, Rosales takımından Saxifragaceae familyası cinsi içinde yer alan bir türdür. *Begonia* türleri ise Magnoliopsida sınıfından, Violales takımından Begoniaceae familyası cinsi içinde yer almaktadır. Bu çalışmayla *Xanthomonas axonopodis* pv. *begoniae*'nin konukçu dizisine bir tür eklenmiştir.



Şekil 4. 29. *Saxifraga stolonifera*'da yaprak yanıklığı

Çizelge 4.6. Begonya çeşitlerinin *Xab*’ye karşı gösterdikleri yaprak reaksiyonları yüzdesi ve skala değerleri

Çeşitler	Ortalama Hastalık %’si	Skala	Değerlendirme
<i>Begonia carollina</i> “Lucerna”	77	5	Çok Duyarlı
<i>Begonia carollina</i>	57	4	Çok Duyarlı
<i>Begonia metallica</i>	62	4	Çok Duyarlı
<i>Begonia masoniana</i>	33	1	Az Duyarlı
<i>Begonia semperflorens-cultorum</i> hibridleri			
kırmızı çiçekli ve kırmızı yapraklı	80	5	Çok Duyarlı
kırmızı çiçekli ve yeşil yapraklı	70	4	Çok Duyarlı
beyaz çiçekli ve yeşil yapraklı	57	4	Çok Duyarlı
beyaz çiçekli ve kırmızı yapraklı	50	3	Orta Duyarlı
pembe katmerli çiçekli ve kırmızı yapraklı	70	4	Çok Duyarlı
pembe çiçekli ve kırmızı yapraklı	50	3	Orta Duyarlı
pembe çiçekli ve yeşil yapraklı	37	3	Orta Duyarlı
<i>Begonia tuberhybrida</i> “Futta”	54	4	Çok Duyarlı
<i>Begonia tuberhybrida</i> “Kleo”	57	4	Çok Duyarlı
<i>Begonia tuberhybrida</i> “Pale Pink”	67	4	Çok Duyarlı
<i>Saxifraga stolonifera</i>	54	4	Çok Duyarlı

Çizelge 4.7. Begonya çeşitlerinin *Xab*’ye karşı gösterdikleri gövde reaksiyonları yüzdesi ve skala değerleri

Çeşitler	Ortalama Hastalık %’si	Skala	Değerlendirme
<i>Begonia carollina</i> “Lucerna”	0	0	Dayanıklı
<i>Begonia carollina</i>	0	0	Dayanıklı
<i>Begonia metallica</i>	18	4	Az Duyarlı
<i>Begonia masoniana</i>	0	0	Dayanıklı
<i>Begonia semperflorens-cultorum</i> hibridleri			
kırmızı çiçekli ve kırmızı yapraklı	97	3	Çok Duyarlı
kırmızı çiçekli ve yeşil yapraklı	87	3	Çok Duyarlı
beyaz çiçekli ve yeşil yapraklı	33	2	Orta Duyarlı
beyaz çiçekli ve kırmızı yapraklı	37	2	Orta Duyarlı
pembe katmerli çiçekli ve kırmızı yapraklı	67	3	Çok Duyarlı
pembe çiçekli ve kırmızı yapraklı	70	3	Orta Duyarlı
pembe çiçekli ve yeşil yapraklı	62	3	Orta Duyarlı
<i>Begonia tuberhybrida</i> “Futta”	10	1	Az Duyarlı
<i>Begonia tuberhybrida</i> “Kleo”	13	1	Az Duyarlı
<i>Begonia tuberhybrida</i> “Pale Pink”	10	1	Az Duyarlı
<i>Saxifraga stolonifera</i>	27	1	Az Duyarlı

Sonuç olarak rizomlu begonyalardan *Begonia carollina* “Lucerna”, *Begonia carollina* ve *Begonia metallica*, lifliköklü begonyalardan-*Begonia semperflorens-cultorum* hibridlerinden kırmızı çiçekli ve kırmızı yapraklı begonya, kırmızı çiçek ve yeşil yapraklı begonya, beyaz çiçek ve yeşil yapraklı begonya ile pembe katmerli çiçek ve kırmızı yapraklı begonya, yumrulu begonyalardan *Begonia tuberhybrida* “Futta”, *Begonia tuberhybrida* “Kleo” ve *Begonia tuberhybrida* “Pale Pink” ile çilek begonyası *Saxifraga stolonifera* çok duyarlı çeşitler, lifliköklü begonyalardan beyaz çiçekli ve kırmızı yapraklı begonya, pembe çiçekli ve yeşil yapraklı begonya ile pembe çiçekli kırmızı yapraklı begonya çeşitleri orta duyarlı, rizomlu begonyalardan *Begonia masoniana* yaprak enfeksiyonlarına az duyarlı çeşitler olarak saptanmıştır.

Lifliköklü begonyalardan pembe çiçekli ve yeşil yapraklı begonya, pembe katmerli çiçek ve kırmızı yapraklı begonya, kırmızı çiçek ve yeşil yapraklı begonya ile kırmızı çiçekli ve kırmızı yapraklı begonya çok duyarlı, beyaz çiçek ve yeşil yapraklı begonya, beyaz çiçekli ve kırmızı yapraklı begonya ile pembe çiçekli kırmızı yapraklı begonya orta duyarlı, rizomlu begonyalardan *Begonia metallica* , yumrulu begonyalardan *Begonia tuberhybrida* “Futta”, *Begonia tuberhybrida* “Kleo” ile *Begonia tuberhybrida* “Pale Pink” ve çilek begonyası *Saxifraga stolonifera* az duyarlı, rizomlu begonyalardan *Begonia carollina* “Lucerna”, *B.carollina* ve *B.masoniana* gövde enfeksiyonlarına karşı dayanıklı olarak saptanmıştır.

5.SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Begonyada bakteriyel leke ve yanıklık hastalığına neden olan *Xanthomonas axonopodis* (syn: *campestris*) pv. *begoniae*'nın tanılanması ve farklı begonya çeşitlerinin bu hastalığa dayanıklılığının araştırılması hedeflenen bu yüksek lisans çalışmasında elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

1. Adana, Manisa ve İstanbul illerinden toplanan begonya bitkilerinde yaprak lekesi ve yanıklığı simptomsu gösteren örneklerden etmen izole edilip, izolatların tanısı morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesiyle ve Indirect-ELISA, ve yağ asit metil ester analizleri ile *Xanthomonas axonopodis* pv. *begoniae* olarak tanılanmıştır. Yapılan bu çalışmayla begonyada bakteriyel leke ve yanıklık hastalığına neden olan *Xanthomonas axonopodis* (syn: *campestris*) pv. *begoniae*'nın varlığı ülkemizde ilk olarak saptanmıştır.

2. Ayrıca bu çalışmayla *Saxifraga stolonifera*'nın (çilek begonyası) da *Xanthomonas axonopodis* pv. *begoniae*'nin konukçusu olduğu belirlenmiştir.

3. Farklı begonya çeşitlerin bu hastalığa duyarlılığı üzerine yapılan çalışmada rizomlu begonyalardan *Begonia carollina* "Lucerna", *Begonia carollina* ve *Begonia metallica* çeşitleri yaprak enfeksiyonlarına çok duyarlı bulunurken, gövde enfeksiyonlarına karşı ise dayanıklı bulunmuşlardır. Bir diğer rizomlu begonya çeşidi olan *Begonia masoniana* yaprak enfeksiyonuna karşı az duyarlı, gövde enfeksiyonlarına karşı ise dayanıklı olarak saptanmıştır. Lifliköklü begonyalardan *Begonia semperflorens-cultorum* hibridlerinden kırmızı çiçekli ve kırmızı yapraklı begonya, kırmızı çiçek ve yeşil yapraklı begonya, beyaz çiçek ve yeşil yapraklı begonya ile pembe katmerli çiçek ve kırmızı yapraklı begonya yaprak enfeksiyonlarına çok duyarlı, beyaz çiçekli ve kırmızı yapraklı begonya, pembe çiçekli ve yeşil yapraklı begonya ile pembe çiçekli ve kırmızı yapraklı begonya çeşitleri orta duyarlı olarak saptanmıştır. *Begonia semperflorens-cultorum* hibridlerinden gövde enfeksiyonları ise, pembe çiçekli ve yeşil yapraklı begonya, pembe katmerli çiçek ve kırmızı yapraklı begonya, kırmızı çiçek ve yeşil yapraklı begonya ile kırmızı çiçekli ve kırmızı yapraklı begonya çok duyarlı, beyaz çiçek ve yeşil yapraklı begonya, beyaz çiçekli ve kırmızı yapraklı begonya ile pembe çiçekli

kırmızı yapraklı begonya çeşitleri ise orta duyarlı olarak saptanmışlardır. Yumrulu begonyalardan *Begonia x tuberhybrida* “Futta”, “Kleo” ve “Pale Pink” çeşitleri yaprak enfeksiyonlarına çok duyarlı bulunurken gövde enfeksiyonlarına karşı az duyarlı olarak bulunmuştur. *Saxifraga stolonifera* (çilek begonyası) yaprak enfeksiyonlarına karşı çok duyarlı bir çeşit olarak bulunurken, gövde enfeksiyonlarına karşı az duyarlı bir çeşit olduğu saptanmıştır.

4. Bu yüksek lisans tez çalışmasında elde edilen veriler doğrultusunda yapacağım öneriler ise aşağıda belirtilmiştir. Bu çalışmayla ülkemiz için yeni bir hastalık belirlenmiş ve Begonya üreticileri bu hastalık konusunda uyarılmalıdır. Üretim yerlerinde görüldüğü zaman alınacak önlemler konusunda üreticiler bilgilendirilmelidir. Şiddetli enfeksiyonların görüldüğü bitkiler yok edilmelidir. İşçiler bu bitkilerle temas ettikten sonra ellerini dezenfekte etmelidir. Ardından üretim alanı bakırlı preparatlardan biriyle ilaçlanmalıdır. Fazla nemden ve yağmurlama sulamadan kaçınılmalıdır.

5. *Saxifraga stolonifera* ‘nın (Çilek Begonyası) da bu etmenin konukçusu olduğu tespit edildiğinden bu tür diğer Begonya çeşitleri ile yanyana yetiştirilmemelidir.

6. Hastalığın yaprak enfeksiyonlarına dayanıklı çeşit belirlenmemiştir. *Begonia masoniana* yaprak enfeksiyonlarına az duyarlı olarak saptanırken *Begonia carollina* ve *Begonia masoniana* gövde enfeksiyonlarına karşı dayanıklı oldukları belirlenmiştir. Bu iki çeşit Begonya’da bakteriyel leke ve yanıklığa neden olan bu hastalığa karşı dayanıklı bitki üretiminde ıslah materyali olarak değerlendirilebilir.

KAYNAKLAR

- ATMATJIDOU, V. P., FYNN, R. P., HOITINK, H. A. J. 1991. Dissemination and transmission of *Xanthomonas campestris* pv *begoniae* in an ebb and flow irrigation system. Plant Disease. 75:1261-1265
- AYSAN, Y. ve CETINKAYA-YILDIZ, R., 2002. Süs bitkilerinde önemli bakteriyel hastalıklar. 2. Ulusal Süs Bitkileri Kongresi, Antalya.
- AYSAN, Y. ve SAHIN, F., 2003a. An outbreak of crown gall disease on rose caused by *Agrobacterium tumefaciens* in Turkey. Plant Pathology 52:780.
- AYSAN, Y. ve SAHIN, F., 2003b. First report of bacterial blight of anthurium caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* in Turkey. Plant Pathology (2003) 52:783.
- BATUR-MICHAELIS, H., 2003. Langzeitversuche zur Latenz von *Xanthomonas campestris* pv. *pelargonii* und Vergleich mikrobiologischer, serologischer und molekulargenetischer Nachweisverfahren. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades des Fachbereiches Agrarwissenschaften der Georg-August-Universität zu Göttingen, (Doktora Tezi).
- BENEDICT, A.A., ALVAREZ, A.M., POLLARD, L. W., 1990. Pathovar specific antigens of *Xanthomonas campestris* pv. *begoniae* and *X. campestris* pv. *pelargonii* detected with monoclonal antibodies. Applied and Environmental Microbiology 56: 572-574.
- BOYRAZ, N., BASTAS, K. K., MADEN, S., A. YASAR, 2006. Bacterial Leaf and Peduncle Soft Rot Caused by *Pectobacterium carotovorum*, on Tulips, in Konya, Turkey. Phytoparasitica 34:272-280
- CETINKAYA YILDIZ, R., MIRIK, M., AYSAN, Y., KUSEK M., SAHIN, 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.
- CHASE, A.R., 1987. Compendium of ornamental foliage plant diseases. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA.

- CHASE, A.R., STALL, R.E., HODGE, N.C., JONES, J.B., 1992. Characterization of *Xanthomonas campestris* strains from Aroids using physiological, pathological, and fatty acid analysis. *Phytopathology* 82: 754-759.
- CHASE, A.R., 1992. Resistance of some Rex Begonia cultivars to *Xanthomonas campestris* pv. *begoniae*. University of Florida, IFAS Central Florida Research and Education Center-Apopka CFREC-Apopka Research Report, RH-92-18.
- CHASE, A.R., 1997. Foliage plant disease diagnosis and control. The American Phytopathological Society St. Paul, Minnesota 97:73395:20
- CHASE, A.R., 1999. Bacterial diseases of ornamentals. A Monthly Publication From Western Farm Service Leaders in Horticulture 1:5
- CHUN, W.W.C., ve ALVAREZ A.M., 1983. A starch-methionine medium for isolation of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* from plant debris in soil. *Plant Disease* 67:632-635.
- COLIGAN, J. E., KRUESBEEK, A. M., MARGULIES, D. H. SHEVACH, E. M. STROBER, W., 1991. Current Protocols in Immunology. (John Wiley & Sons) New York.
- DAUGHTREY, M.L., WICK, R.L., PETERSON, J.L., 1995. Compendium of flowering potted plant diseases. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA.
- HAKKART, F.A., ve VERSLUIJS, J.M.A. 1983. Control of leaf curl and *Xanthomonas begoniae* in *Begonia* 'Elatior' by meristem culture and an isolation test. *Acta Horticulturae* 131:299-301.
- KHOODOO, M.H.R. ve JAUFEEERALLY-FAKIM, J., 2004. RAPD-PCR fingerprinting and southern analysis of *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* strains isolated from different aroid hosts and locations *Plant Disease* 88: 980-988
- KHOODOO, M.H.R., SAHIN, F., DONMEZ, M.F. and JAUFEEERALLY-FAKIM, J., 2005a. Molecular characterisation *Xanthomonas* strains isolation from aroids in Mauritius. *Systematic and Applied Microbiology* 28:366-380.

- KHOODOO, M.H.R., SAHIN F., AUFEERALLY-FAKIM, J., 2005b. Sensetive detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* on *Antrium andreanum* by immunocapture-PCR (IC-PCR) using primers designed from sequence characterized amplified regions (SCAR) of the blight pathogen. European Journal of Plant Pathology 112:379-390.
- KLEMENT, Z., GOODMAN, R. N., 1967. The hypersensitive reaction to infektion by bacterial plant pathogens. Annual Review of Phytopathology 5:17-44.
- KLEMENT, Z., MAVRIDIS, A., RUDOLPH, K., VIDAVER, A., 1990. Inoculation of plant tissue. In:Methods in Phytobacteriology (Edts:Klement, Z., Ruholph, K., andSands, D. C).,99.
- KOVAKS, N., 1956. Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. Nature (London) 178:703.
- KUAN, T.L., ve MINSAVAGE, G.V., 1985. Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *carotae* in carrot seed. Plant Disease 69:758-760.
- LELLIOT, R.A., ve STEAD, D.E., 1987. Diagnostic procedures for bacterial plantdiseases. In Methods for the Diagnosis of Bacterial Diseases of Plants 58-59. Blackwell Scientific Publications, 216p.
- LI B., XIE G.L., SWINGS J. 2006. First report of leaf spot caused by *Xanthomonas campestris* on poinsettia in China. Plant Pathology 55: 293.
- MANULIS, S., VALINSKY, L., LICHTER, A., GABRIEL, D. W., 1994. Sensitive and spesific detection of *Xanthomonas campestris* pv. *pelargonii* with DNA primers and probes identified by random amplified polymorphic DNA analysis. Applied and Environmental Microbiology 60: 4094-4099.
- McGUIRE, R. G., JONES, J. B., SASSER, M.,1986. Tween media for semiselective isolation of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* from soil and plant material. Plant Disease 70:887-891.
- MIRIK, M., AYSAN,Y., IINAR, O ve SAHIN, F. 2004. Türkiye’de çeşitli bitkilerden izole edilen *Pseudomonas savastanoi* izolatlarının fenotipik karakterizasyonu. Türkiye 1. Bitki Koruma Kongresi 8-10 Eylül 2004,

Samsun, 139.

NAMETH, ST, DAUGHTREY, ML., MOORMAN, GW, SULZINSKI, M. A., 1999. Bacterial blight of geranium: A history of diagnostic challenges. Plant Disease 83:204-212.

NORMAN, D.J. ve ALVAREZ, A.M., 1989. A rapid method for presumptive identification of *Xanthomonas campestris* pv. *dieffenbachiae* and other Xanthomonads. Plant Disease 73: 654-658.

NORMAN, D. J. ve ALVAREZ, A. M., 1994. Rapid detection of *Xanthomonas campestris* pv. *dieffenbachiae* in *Anthurium* plants with miniplate enrichment ELISA system. Plant Disease 78:954-958.

ODEN, S., 1991. İzmir ve İstanbul illerinde önemli süs bitkilerinde görülen bakteriyel hastalıklar ve etmenlerin saptanması üzerine araştırmalar. Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilim Dalı, Doktora Tezi.

ROBENE-SOUSTRADE, I., LAURENT, P., GAGNEVIN, L., JOUEN, E., PRUVOST, O., 2006. Specific detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* in anthurium (*Anthurium andreanum*) tissues by nested PCR. Applied and Environmental Microbiology 72:1072-1078.

SAHIN, F., KOTAN, R., ABBASI, PA. and MILLER, SA. 2003. Phenotypic and genotypic characterization of *Xanthomonas campestris* pv. *zinniae* strains. European Journal of Plant Pathology. 109: 165-172.

SALTINK, G.J., KAMERMAN W. 1971. *Begonia bertinii*, a new host of *Erwinia chrysanthemi*. European Journal of Plant Pathology 77:25-29.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., and MANIATIS, T., 1989. Molecular cloning- a Laboratory Manual: Second edition (1989). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

SANDS, D. C., 1990. Physiological criteria-determinate tests. In: Methods in

- Phytobacteriology. (Edts. Klement, Z.; Rhudolp, K.; Sands, D. C.) Academia Kiado, Budapest, Hungary.
- SCHAAD, N.W., ve WHITE, W.C., 1974. A selective medium for soil isolation and enumeration of *Xanthomonas campestris*. Phytopathology 64:876-880.
- SCHAAD, N. W., JONES, J.B., 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., Chun, W.. APS Press, St. Paul Minnesota. P:175-193.
- SENCHENKOVA S. N., SHASHKOV A. S., LAUX P., KNIREL Y. A., RUDOLPH, K., 1999. The O-chain polysaccharide of the lipopolysaccharide of *Xanthomonas campestris* pv. *begoniae* GSPB 525 is a partially L-xylosylated L-rhamnan. Carbohydrate Research 319: 148-153.
- SHAW, D.M., CHASE, A.R., 1991. Effect of Fertilizer Rate on Susceptibility of 'Mikado' Begonia to *Xanthomonas campestris* pv. *begoniae*. University of Florida, IFAS, Central Florida Research and Education Center-Apopka CFREC-Apopka Research Report, RH-91-9.
- SIJAM, K., CHANG, C. J., GITAITIS, R. D., 1991. An agar medium for the isolation and identification of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* from seed. Phytopathology, 81:831-834.
- SIJAM, K., CHANG, C. J., GITAITIS, R. D., 1992. A medium for differentiating tomato and pepper strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* Canadian Journal of Plant Pathology. 14:162-164.
- SOZEN, N., HALEPLOOGLU, N., SAHIN, Ş. 1991. Ülkemizde süs fidancılığının durumu ve pazar açısından karşılaşılan sorunlar. Türkiye I. Fidancılık Sempozyumu. 411-419.
- STRAVATO, V. M., CARANNANTE, G., SCORTICHINI, M., 2004. Occurrence of *Xanthomonas axonopodis* pv. *poinsetticola* on *Euphorbia pulcherrima* in Italy. Journal of Plant Pathology. 86:177
- STRIDER, D.L., 1975. Susceptibility of Rieger Elatior begonia cultivars to bacterial

- blight caused by *Xanthomonas begonia*. Plant Disease Reporter. 59:70-73.
- SULZINSKI, M.A., MOORMAN, G.W., SCHLAGNHAUFER, B., 1995. Fingerprinting of *Xanthomonas campestris* pv. *pelargonii* and related pathovars using random primed PCR. Journal of Phytopathology 143: 429-433.
- VUNAKIS, H. V., 1980. Radioimmunoassay: An overview. In : (Engvall, E.: Enzyme immunoassay ELISA and EMIT Methods in Enzymology), Academic Press., New York, vol 70 , s.201-209, s.419-439.
- ZENCİRKİRAN, M., 2004. Dış mekan süs bitkilerinde çelik ile üretimin optimizasyonu. http://www.agr.ege.edu.tr/~fitekno/Doc12.htm#_ftn1
- ZHANG J. J., ve KONG F. Z., 2002.. Synthesis of an xylosylated rhamnose pentasaccharide, the repeating unit of the O-chain polysaccharide of the lipopolysaccharide of *Xanthomonas campestris* pv. *begoniae* GSPB 525. Carbohydrate Research 337: 391-396.

ÖZGEÇMİŞ

1979 yılında Hatay’da doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Ceyhan’da tamamladım. 1998 yılında başladığım Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü’nden 2003 yılında mezun oldum. Aynı yıl Bitki Koruma Bölümü Fitopatoloji Anabilimdalı Bakteriyoloji Laboratuvarında yüksek lisansa başladım. “Begonyada bakteriyel leke ve yanıklığa neden olan *Xanthomonas axonopodis* (syn: *campestris*) pv. *begoniae*’nın karakterizasyonu ve farklı begonya çeşitlerinin hastalığa dayanıklılığı” adlı yüksek lisans tezimi bitirme aşamasındayım.

EKLER

EK 1

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

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

121°C’de 15 dakika otoklav edilmiştir.

Nutrient Agar (NA) Besi Yeri (Lelliott ve Stead, 1987)

Nutrient Agar	13.0g
Distile Su	1000ml

121°C’de 15 dakika otoklav edilmiştir.

Tween B Besi Yerinde (McGuire ve Jones, 1986)

Peptone	10.0g.
KBr	10.0g
CaCL ₂ .	0.25g
Borik Asit	0.30g
Agar	15.0g
Distile Su	100ml

121°C’de 15 dakika otoklav edilmiştir. Ortam 50°C’ye kadar soğutularak içerisine aşağıdaki kimyasallar ilave edilmiştir.

Tween 80	10.0ml
Cycloheximide	50.0mg
Cephalexin	65.0mg
5-flouracil	12.0mg
Tobramycin	0.4mg

CKTM Besi Yeri (Sijam ve ark, 1992)

Distile Su	900ml
Soy Peptone	2.0g
Bacto Tryptone	2.0g
Dekstroz	1.0g
L-glutamine	6.0g
L-histidine	1.0g
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0.8g
KH ₂ PO ₄	1.0g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.4g
CaCl ₂	0.25g
Borik asit	0.30g
Agar	15.0g

121°C'de 15 dakika otoklav edilmiştir. Ortam 50C'ye kadar soğutularak içerisine

Tween 80	10.0ml
Cycloheximide	50.0mg
Bacitracin	100.0mg
Neomycin sulphate	10.0mg
100ml distile su içerisinde eritilen;	Cephalexin 65.0mg
	5-flouracil 12.0mg
	Tobramycin 0.4mg ilave edilmiştir.

SNA Besi Yeri (Lelliot ve Stead, 1987)

Nutrient Agar	13.0g
Sukroz	50.0g
Distile Su	1000ml

121°C'de 15 dakika otoklav edilmiştir.

Nutrient Broth Sıvı Besi Yeri (Lelliot ve Stead 1987)

Nutrient broth	8g
Distile Su	1000ml

121°C'de 15 dakika otoklav edilmiştir.

King B Besi Yeri (King ve ark 1954)

Proteose Peptone	20.0g
Gliserin	10.0ml
K ₂ HPO ₄	1.5g
MgSO ₄ 7H ₂ O	1.5g
Agar	15.0g
Distile Su	1000ml

121°C'de 15 dakika otoklav edilmiştir.

SX Besi Yeri (Shaad ve White 1974)

Starch (soluble-potato)	10.0g
Beef extract	1.0g
Ammonium chloride	5.0g
K ₂ HPO ₄	2.0g
Methyl violet 2B	1.0ml*
Methyl gren	2.0ml**
Agar	15.0g

Otoklavdan sonra;

Cycloheximide	5.0ml***
---------------	----------

*%20'lik alkolde %1'lik solüsyon.

**Solüsyon %1'lik sulandırılacak.

***100ml steril su içinde, 5.0g Cyc. 10.0ml methonole eklenir.

SM Besi Yeri (Chun ve Alvarez 1983)

K ₂ HPO ₄	1.0g
Na ₂ HPO ₄	2.6g
NH ₄ Cl	1.0g
NaCl	2.0g
Mg.SO ₄ .7H ₂ O	0.2g
CaCl ₂ .2H ₂ O	67.0mg
Glucose	1.0g
L-methionine	0.2g
Starch (soluble-potato)	10.0g
Methyl violet 2B	1.0ml*
Methyl gren	2.0ml**
Trace element solution	1.0ml***
Triphenyltetrazolium chloride	1.0ml****
Cycloheximide	50.0mg
Agar	20.0g

*%20'lik alkolde %1'lik solüsyon.

**Solüsyon %1'lik sulandırılacak.

***100 ml H₂O:EDTA, 250mg;FeSO₄.7.H₂O, 500mg;ZnSO₄.O,
10mg;CuSO₄.5H₂O, 10mg;MnSO₄.H₂O, 10mg;NaMoO₄.2H₂O,
25mg;Na₂B₄O₇.10H₂O, 18mg;CoSO₄.7H₂O, 10mg.

****Solüsyon %1 sulandırılır.

MD-5 Besi Yeri (Kuan ve Minsavage 1985)

D-cellobiose	10.0g*
K ₂ HPO ₄	3.0g
NaH ₂ PO ₄	1.0g
NH ₄ Cl	1.0g
Mg.SO ₄ .7H ₂ O	0.3g
Cycloheximide	0.2g*
Agar	15.0g

*Otoklavdan sonra;

D-cellobiose ve Cycloheximide eklenir.

EK 2

ELISA testinde Kullanılan Tampon Çözeltiler

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

NaCl	8.0g
KH ₂ PO ₄	0.2g
Na ₂ HPO ₄ veya	1.15g
Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O	1.44g
Na ₂ HPO ₄ 7H ₂ O	2.3g
Na ₂ HPO ₄ 12H ₂ O	2.9g
KCl	0.2g
NaN ₃	0.2g

Yukarıda miktarları verilen kimyasallar 1 litre saf suda eritilip pH'sı 0.1N NaOH veya 0.1N HCl ile ayarlanmış ve +4°C'de saklanmıştır

Coating buffer pH 9.6 (Kaplama Tampon Çözeltisi)

Na ₂ CO ₃	1.59g
NaHCO ₃	2.93g
NaN ₃	0.2g

Yukarıda miktarı verilen kimyasallar 1 litre saf suda eritilip pH'sı ayarlanmış ve +4°C'de saklanmıştır

Washing Buffer (Yıkama Tamponu)

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

Sample Extraction Buffer (Örnek Tamponu Çözeltisi)

Bir litre yıkama tamponu çözeltisi içine 20g Polyvinylpyrrolidone (PVP-40) ilave edilerek hazırlanmıştır.

Enzyme Conjugate Buffer (Konjugate Tampon Çözeltisi)

Bir litre örnek tampon çözeltisine 2g ovalbumin (egg albumin) ilave edilerek hazırlanmıştır.

Substrat Buffer pH:9.8 (Subtrat Tampon Çözeltisi)

97 ml Diethanolamine 800ml saf su içine ilave edildikten sonra 0.2g NaN₃ konmuş ve HCl ile pH 9.8'e ayarlanarak 1 litreye tamamlanmıştır.

EK 3

Yağ Asit Analizi Çalışmasında Kullanılan Ortam ve Çözeltiler

Trypticase Soy Broth Agar (TSBA) Besi yeri

Trypticase Soy Broth (BBL # 11768)	30.0g
Agar	15.0g
Distile su	1000ml

121°C’de 15 dakika otoklav edilmiş ve petrilere dökülmüştür.

Çözelti 1

Metil Alkol	150ml
Distile su	150ml
Sodyum Hidroksit	45g

Sırası ile 150ml metil alkol ve 150ml H₂O bir litrelik renkli çözelti şişesine ilave edilmiş ve daha sonra katı formdaki 45g sodyum hidroksit ekleyip iyice çözülünceye kadar karıştırılmıştır

Çözelti 2

6 N Hidroklorik Asit	325mL
Metil Alkol	225ml

Sırası ile 6N’lik 325ml hidroklorik asit ve 225ml metil alkol bir litrelik renkli çözelti şişesinde iyice çözününceye kadar karıştırılmıştır.

Çözelti 3

Methyl-tert-butyl Ether	200ml
Hexane	200ml

Sırası ile 200ml methyl-tert-butyl ether. 200ml hexane üzerine ilave edilerek bir litrelik renkli çözelti şişesinde iyice çözülünceye kadar karıştırılmıştır.

Çözelti 4

Sodyum Hidroksit	10.8g
Distile su	900ml

Sırası ile 10.8g katı formdaki sodyum hidroksit. 900ml distile su içerisinde bir litrelik renkli çözelti şişesinde iyice çözülünceye kadar karıştırılmıştır.