

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Hacer TEKMAN

**DOMATESTE ÖZ NEKROZUNA NEDEN OLAN TANILANAMAYAN
Pseudomonas spp İZOLATLARIN MORFOLOJİK, FİZYOLOJİK,
BİYOKİMYASAL VE SEROLOJİK YÖNTEMLERLE TANILANMASI VE
KARAKTERİZASYONU**

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

ADANA, 2005

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOMATESTE ÖZ NEKROZUNA NEDEN OLAN TANILANAMAYAN
***Pseudomonas spp* İZOLATLARIN MORFOLOJİK, FİZYOLOJİK,**
BİYOKİMYASAL VE SEROLOJİK YÖNTEMLERLE TANILANMASI VE
KARAKTERİZASYONU

Hacer TEKMAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

Bu tez 12/12/2005 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oybirliği/
Oyçokluğu İle Kabul Edilmiştir.

İmza	İmza.....	İmza.....
Prof. Dr. Özden ÇINAR	Prof. Dr. Kazım ABAK	Doç. Dr. Yeşim AYSAN
DANIŞMAN	ÜYE	ÜYE

Bu tez Enstitümüz Bitki Koruma Anabilim Dalında Hazırlanmıştır.

Kod No:

Prof. Dr. Aziz ERTUNÇ
Enstitü Müdürü
İmza ve Mühür

Bu çalışmada Ç.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.
Proje no:ZF2005YL-2

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

ÖZ

YÜKSEK LİSANS

**DOMATESTE ÖZ NEKROZUNA NEDEN OLAN TANILANAMAYAN
Pseudomonas spp İZOLATLARININ MORFOLOJİK, FİZYOLOJİK,
BİYOKİMYASAL VE SEROLOJİK YÖNTEMLERLE TANILANMASI VE
KARAKTERİZASYONU**

Hacer TEKMAN

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI**

Danışman : Prof.Dr. Özden ÇINAR

Yıl : 2005, Sayfa: 53

Jüri: Prof. Dr. Özden ÇINAR

Prof. Dr. Kazım ABAK

Doç. Dr. Yeşim AYSAN

Doğu Akdeniz bölgesinde Ceyhan (Adana), Yumurtalık (Adana) Tarsus (Mersin)'da domates bitkilerinde gövde öz nekrozu etmeni *Pseudomonas* spp izolasyonu ve tanılanması amacıyla bu çalışmalar yapılmıştır. Elde edilen izolatların King B ve YDC besi yerinde gelişimleri, Oksidaz Testi, Patates Çürüklük Testi, Arginin Dehidrolaz Testi, Levan Oluşumu, Tütünde Aşırı Duyarlılık (HR), Oksidasyon / Fermantasyon Testi (O/F), Jelatin Hidrolizasyonu Testi, Lesitinaz Üretimi, Karbon Kaynaklarını Kullanma Testi, Sitrat Kullanım, NaCl Toleransı, Katalaz Reaksiyonu, Nişasta ve kazein hidrolizasyonu, Nitrat İndirgenmesi, ELISA Testi ve Yağ Asit Profillerinin Belirlenmesiyle tanıya gidilmiştir.

Yum-öz 1b1 izolatının levan, oksidaz, patates pektolitik aktivitesi arginin ve tütünde HR test sonuçlarına göre *Pseudomonas corrugata* GSPB (1224)'ye yakın olduğu diğer testlerde farklılık gösterdiği belirlenmiştir. İk-id2-1a izolatını *Pseudomonas cichorii*'den ayıran testler karbon kaynaklarından sukroz, sorbitol, trehaloz testleridir. TET-A, Mt-4a2 ve Adu-4d1 izolatları yapılan testler sonucu referans kültürlerden farklı olduğu saplandı ve *Pseudomonas* spp olarak tanılanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Domates, *Pseudomonas* spp, Tanı, ELISA,

ABSTRACT

MSc THESIS

CHARACTERIZATION and IDENTIFICATION by PHYSIOLOGICAL, MORPHOLOGICAL, BIYOCEMICAL and SEROLOGICAL METHODS of TOMATO PITH NECROSIS CAUSED by *Pseudomonas* spp

Hacer TEKMAN

**DEPARTMENT OF PLANT PROTECTION
INSTITUTE OF NATUREL AND APPLIED SCIENCES
UNIVERSITY OF ÇUKUROVA**

Supervisor: Prof. Dr. Özden ÇINAR

Year:2005, Pages: 53

Jury Prof. Dr. Özden ÇINAR

Prof. Dr. Kazım ABAK

Associated Prof. Dr. Yeşim AYSAN

This research has been conducted to isolate and to identify the casual agent *Pseudomonas* spp of pith necrosis of the stem of tomato in the east Mediterranean region. King B fluorescent pigment, levan production, oxidase, potato soft rot, argininedihydrolase gelatin hydrolysis, colony characteristics on YDC, tobacco hypersensitivity, nitrate reduction, lecithinase, starch hydrolysis, compound test catalase, O/F, NaCl tolerance, casein hydrolysis, citrate tests, ELISA test, determination of fat acid profile have been gone to diagnosis.

Yum-öz 1b1 isolate has been found to resemble *Pseudomonas corrugata* GSPB(1224) according to levan, oxidase potato pectolytic activity arginine and HR test on tobacco, but other tests have been found different. İK-id2-1a isolate is different from *Pseudomonas cichorii* from point of view sucrose, sorbitol, trehalose tests. TET-A, Mt-4a2 and Adu-4d1 isolates were established as different from reference cultures and our isolate was identified as *Pseudomonas* spp

Key Words : Tomato, *Pseudomonas* spp. Identification, ELISA,

TEŞEKKÜR

Bu araştırma konusunda bana tez yapma fırsatı veren ve çalışmamın her aşamasında bilgi birikimi ve tecrübeleri ile beni yönlendiren ve yardımlarını esirgemeyen çok kıymetli hocam Prof. Dr. Özden ÇINAR'a, teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarımın tüm aşamalarında bana yol gösteren, yapıcı ve yönlendirici fikirleri ile katkıda bulunan sayın Doç. Dr. Yeşim AYSAN'a özveri ve yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

Yüksek lisan tez çalışmam içerisinde bulunan yağ asit metil ester analizleri için Atatürk Üniversitesi Biyoteknoloji Araştırma ve Uygulama Laboratuvarı olanaklarından yararlanmamı sağlayan sayın Doç. Dr. Fikrettin ŞAHİN'e teşekkür ederim.

Çalışmalarımın sırasında emeği geçen kıymetli arkadaşlarım Dr. Nilüfer YILDIZ'a , Dr. Mustafa MİRİK'e, Arş. Gör. Raziye ÇETİNKAYA- YILDIZ'a, Arş. Gör. Mustafa KÜSEK'e, Zir. Müh. Şerife OLDAÇ'a, Zir. Müh. Hatice ÖRNEK ve Zir. Müh. Sencen ÜNLÜ'ye çok teşekkür ederim.

Manevi desteğini esirgemeyen YALTIR A.Ş. ve personeline, aileme ve eşime teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER	SAYFA
ÖZ.....	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ	VII
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	3
3. MATERYAL VE METOT.....	6
3.1. Materyal.....	6
3.2. Metot.....	6
3.2.1. Hastalıklı Bitki Materyalinin Toplanması.....	6
3.2.2. Hastalıklı Bitki Materyalinden İzolasyon.....	7
3.2.3. Patojenite Testi.....	7
3.2.4. <i>Pseudomonas</i> spp İzolatlarının Tanısı.....	7
3.2.4.1 King B besi yerinde gelişim.....	7
3.2.4.2. YDC Besi Yerinde Gelişim.....	8
3.2.4.3. Levan Oluşumu	8
3.2.4.4. Oksidaz Testi.....	8
3.2.4.5. Patates Çürüklük Testi.....	8
3.2.4.6. Arginin Dehidrolaz Testi.....	9
3.2.4.7. Tütünde Aşırı Duyarlılık (HR).....	9
3.2.4.8. Oksidasyon / Fermantasyon Testi(O/F).....	9
3.2.4.9. Jelatin Hidrolizasyonu Testi.....	10
3.2.4.10. Lesitinaz Üretimi	10
3.2.4.11. NaCl Toleransı.....	10
3.2.4.12. Karbon Kaynaklarını Kullanma Testi.....	11
3.2.4.13. Sitrat Kullanım.....	11
3.2.4.14. Katalaz Reaksiyonu.....	12
3.2.4.15. Nişasta Hidrolizasyonu.....	12

3.2.4.16. Kazein Hidrolizasyonu.....	12
3.2.4.17 Nitrat İndirgenmesi.....	13
3.2.5. <i>Pseudomonas</i> spp. İzolatlarının ELISA Testi ile Tanısı.....	13
3.2.5. <i>Pseudomonas</i> spp İzolatlarının Yağ Asit Profillerinin Belirlenmesi.....	15
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	17
4.1. Hastalıklı Bitki Materyalinden Etmenin İzolasyonu.....	21
4.2. King B Besi Yerinde Gelişimi.....	23
4.3. YDC Besi Yerinde Gelişim.....	24
4.4. Levan Oluşumu.....	25
4.5. Oksidaz Testi.....	25
4.6. Patates Çürüklük Testi.....	26
4.7. Arginin Dehidralaz Testi.....	26
4.8. Tütünde Aşırı Duyarlılık Testi (HR)	26
4.9. Oksidasyon / Fermantasyon Testi (O/F)	26
4.10. Jelatin Hidrolizasyonu Testi.....	26
4.11. Lesitinaz Üretimi.....	27
4.12. NaCl Toleransı.....	27
4.13. Karbon Kaynaklarını Kullanma Testi.....	28
4.14. Sitrate Kullanma.....	28
4.15. Katalaz reaksiyonu.....	28
4.16. Nişasta Hidrolizasyonu.....	29
4.17. Kazein hidrolizasyonu.....	29
4.16. <i>Pseudomonas</i> spp. İzolatlarının ELISA Testi ile Tanısı.....	32
4.17. <i>Pseudomonas</i> spp İzolatlarının Yağ Asit Profillerinin Belirlenmesi.....	34
5. Sonuç.....	37
KAYNAKLAR	38
ÖZGEÇMİŞ.....	44

ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 4.1. Çalışmada kullanılan <i>Pseudomonas</i> spp izolat listesi.....	21
Çizelge 4.2. Klasik bakteriyolojik yöntemlerle tanılama test sonuçları.....	29
Çizelge 4.3. Karbon kaynakları test sonuçları.....	30
Çizelge 4.4. <i>P. cichorii</i> antiserumu ile yapılan ELISA sonucu.....	31
Çizelge 4.5. <i>P. corrugata</i> antiserumu ile yapılan ELISA sonucu.....	32
Çizelge 4.6. <i>P. viridiflava</i> antiserumu ile yapılan ELISA sonucu.....	32
Çizelge 4.7. Yağ asit analizi sonucu izolatların yağ asitleri ve bulunan oranları(%)..	34

ŞEKİLLER DİZİNİ

SAYFA

Şekil 4.1. Domates bitkisinde solgunluk	16
Şekil 4.2. Gövdede renk değişimi	17
Şekil 4.3. Yan dallarda siyaha yakın renk değişimi	17
Şekil 4.4. Gövdede renk değişimi	18
Şekil 4.5. Özün kahverengileşmesi	18
Şekil 4.6. Budanan yan dallardan hastalık etmeninin girişi	19
Şekil 4.7. Budanan dallardan hastalık etmeninin girişi.....	20
Şekil 4.8. King B besi yerinde gelişimi.....	22
Şekil 4.9. Yum-öz1b1 izolatının YDCA'da gelişimi.....	23
Şekil 4.10. Yum-öz1b1 izolatının YDCA'da gelişimi.....	23
Şekil 4.11. SNA'da TET-A izolatının gelişimi	24
Şekil 4.12. Lesitinnaz ortamında koloniler etrafında parlaklık	26
Şekil 4.13. İzolatların sitratı kullanmasıyla yeşil rengin maviye dönmesi.....	27
Şekil 4.14. Referans kültürler ve bölge izolatlarının yağ asit profillerine göreden dogramları (GSPB 1224 <i>P. corrugata</i> , GSPB 1685 <i>P.</i> <i>viridiflava</i> , GSPB 2907 <i>P. cichorii</i> , CFBP 5447 <i>P. mediterrane</i> , INRA 2102 <i>P. fluorescens</i> , 1: Yum-öz1b1, 2: TET-A, 3: İk-İd 2- 1a, 4: Mt-4a2, 5: Adu-4d1)	35
Şekil 4.15. Referans kültür ve bölge izolatlarının yağ asit profillerine göre dendogramları (CFBP 5447 <i>P. mediterrane</i> , 1: Yum-öz1b1, 2: TET-A, 3: İk-İd 2-1a, 4: Mt-4a2, 5: Adu-4d1).....	35

1. GİRİŞ

İçerdiği çeşitli mineral ve vitaminler ile insan sağlığı için yararlı gıda maddelerinden biri olan domates *Solanaceae* familyasının *Lycopersicum* cinsine bağlı tek yıllık bir bitkidir (*Lycopersicum esculentum*). Domates ülkemizde ve dünyada yoğun olarak tüketilmektedir. Ülkemizde 2004 yılı verilerine göre toplam 24.098.617 ton olan sebze üretiminin 8.000.000 tonluk kısmını domates oluşturmakta ve birinci sırada yer almaktadır (<http://www.fao.org/>).

Ülkemizde farklı iklim bölgelerinde açık alanda ve örtü altında hem sofralık hem de sanayi domatesi üretilmektedir. Akdeniz bölgesinde sofralık domates üretimi yazın tarlada kışın ise cam ve plastik seralarda yapılmaktadır. Sera yetiştiriciliği artıkça; gerekli kültürel işlemlerin tam uygulanmaması, her yıl aynı bitkinin yetiştirilmesi ve hastalıklı bitki artıklarının üretim alanından uzaklaştırılmaması, seraların iyi havalandırılmaması gibi nedenlerden dolayı pek çok hastalık ortaya çıkmaktadır. Domateslerde fungal ve viral hastalık etmenlerinin yanı sıra pek çok bakteriyel etmen de önemli ürün kayıplarına neden olmaktadır.

Doğu Akdeniz Bölgesinde domateslerde 1970'li yılların sonunda *Pseudomonas syringae* pv *tomato* (Çınar, 1977) ve *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis*'in (Çınar, 1980) varlığı saptanmış ve bu hastalıkların her yıl ortaya çıkmasıyla üretici problem yaşamıştır. Son yıllarda serada domates öz nekrozu veya gövde nekrozu olarak adlandırılan hastalığa rastlanmaktadır (Çınar ve Aysan, 1995; Tokgönül, 1995).

1990'lı yılların sonlarında Ege ve Akdeniz Bölgesinde serada üretilen domateslerde farklı bakteri türlerinin (*Erwinia* ve *Pseudomonas*) neden olduğu öz nekrozuna hastalığına rastlanılmaktadır (Aysan ve Çınar, 1995; Baş ve Çınar, 1995; Tokgönül, 1995; Üstün ve Saygılı, 2001; Aysan, 2001) Bu hastalık etmenlerinin bitkilerde oluşturdukları semptomlar gövde, petiol, yaprak ve meyve olmak üzere tüm toprak üstü kısımlarında görülmektedir (Aysan ve Çınar, 2003). Bitkilerde genel bir sararma gövdenin dış yüzeyinde kahverengimsi siyah lekeler şeklinde gözlenmiştir. Gövdenin boyuna kesiti alındığında gövdedeki koyu nekrotik alanların iletim demetleri boyunca yayıldığı, özde boşalmalar meydana geldiği tespit

edilmiştir. Hasta bitkilerin alt yapraklarında sararma artarak tüm bitkiyi sardığı gözlenmiştir. Bu semptomlardan meydana gelen hastalık bazı seralarda ciddi zararlara neden olmaktadır. Bitkiler hasada kadar canlı kalmakta fakat meyve tutumu az olmakta ve gelişme gerilemektedir (Aysan ve ark., 2002). Domates öz nekrozu hastalığına *Pseudomonas corugata* (Scarlet ve ark., 1978), *Pseudomonas cichori* (Wilkie ve Dye, 1974), *Pseudomonas viridiflava* (Wilkie ve ark, 1973), *Pseudomonas fluorescens* (Alivizatos, 1984; Jacob, 1991), *Pseudomonas mediteranea* (Catara ve ark., 2002) ve tanılamayan *Pseudomonas* türleri neden olmaktadır. Bu etmenler bazı seralarda karışık enfeksiyonlara da neden olabildikleri belirlenmişti (Scortichini, 1992).

Domates gövde nekrozunun yoğun sulama ve gübreleme ile teşvik edildiği bilinmektedir (Üstün ve Saygılı, 2000). Tüketimi karşılamak için kullanılan yeni hibrit çeşitler, bazı fungus ve virüslere dayanıklı olurken yüksek verim için daha fazla azot ve potasyum isteğine sahiptirler. Böylece de bitki patojenlerini teşvik ederler. Diğer yandan bahar boyunca serada gündüz gece ısı farkı bitkide stres yaratabilir (Tognoni, 1990; Üstün ve Saygılı, 2000).

Gövde nekrozuna neden olan tür düzeyinde tanısı yapılmamış yeni *Pseudomonas* türlerinin ülkemizde de bulunduğu bilinmektedir. Ülkemizde yapılan çalışmalarda gövde nekrozuna neden olan florasan *Pseudomonas* izolatları elde edilmiştir (Tokgönül, 1995; Aysan, 2001; Üstün ve Saygılı, 2001). Bu izolatların Catara ve ark. (2002)'nın tanıladığı yeni türle (*P. mediteranea*) benzer olduğu düşünülmektedir. Ancak bu izolatlarla moleküler düzeyde detaylı çalışmalar yapılmamıştır. Akdeniz ve Ege Bölgesinde 2001-2002 domates üretim sezonunda bu izolatlar ek olarak florosan olmayan *Pseudomonas* türleri de izole edilmiştir. Bu izolatlar Catara ve ark. (2002)'nin tanıladığı yeni türden floresan olmama özelliğinden dolayı farklılaşmaktadır. Bu çalışmada adana (Yumurtalık, Ceyhan) ve Mersin (Tarsus ve Erdemli)'de domateslerde gövde nekrozuna neden olan henüz tanılanmamış *Pseudomonas* izolatların morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal testlerle, serolojik yöntemlerle ve yağ asit profillerinin belirlenmesiyle karakterizasyonu yapılmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Dünyada ilk defa Scarlett ve ark. (1978) tarafından 1971 yılında İngiltere’de domates seralarında gövde nekrozlarına rastlanmıştır. Hastalığa yeni bir etmenin neden olduğuna karar verilmiş ve izole edilen etmen bakteri morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerine göre *P. corrugata* olarak tanılanmıştır. Etmenin pek çok ülkede varlığı ilerleyen yıllarda çeşitli araştırmacılar tarafından ortaya konmuştur (Üstün, 2000). Dünyada gövde nekrozuna neden olan türler içinde en yaygın olanı *P. corrugata*’dır.

P. corrugata’nın varlığını Fiori ve ark (1983a) İtalya, ABD’de San Diago, Kaliforniya Lai ve ark (1983), Florida Jones ve ark (1983), İsrail Zutra ve Kritzman (1983), Yeni Zelanda Clark ve Watson (1986), Japonya Natsuaki ve Kagiwata (1986), Brezilya Neto ve ark (1990), Arjantin Allippi ve ark. (2003) rapor etmişlerdir.

Domates öz nekrozu *P. corrugata* 1100 bp DNA frangmetlerinin amplikasyonu yolu ile domates bitkisi dokularında ve tohumlarında multiplex Bio-PCR tekniği kullanılarak belirlenmiştir (Basım ve Basım,2004; Basım ve ark.,2005).

Ülkemizde Ege Bölgesindeki seralardan gelen semptomlu domates bitkilerinde yapraklarda solgunluk, gövdede lezyonlar ve özde nekrozlar olduğu 1989 yılında gözlenmiştir. Üç örnekten elde edilen saf bakteri kültürü ile yapılan morfolojik, biyokimyasal ve patojenite testleri, hastalık etmeninin *P. corrugata* olduğunu ortaya koymuştur. Bu çalışma ile Türkiye’de ki *P. corrugata* ‘un varlığı ilk olarak rapor edilmiştir (Demir, 1990). Akdeniz Bölgesinde Baş ve Çınar (1995) varlığı tespit edilmişlerdir.

Domates öz nekrozuna neden olan diğeri bir etmen olan *P. viridiflava*’ yı ilk olarak Wilkie ve ark., (1973) tarafından Yeni Zelanda’da saptanmış ve daha sonra ABD (Lukezic ve ark., 1983), İtalya (Fiori ve ark., 1984), Yunanistan (Alivizatos, 1984), Fas (Coln, 1996) Arjantin (Alippi, 1999), Bulgaristan (Bogetzevska ve ark., 1998) ve Türkiye’ de (Aysan, 2001; Üstün ve Saygılı, 2001) etmenin varlığı rapor edilmiştir.

Domates öz nekrozuna neden olan *P. cichorii*’nin varlığı ilk olarak Yeni Zelanda’da belirlenmiştir (Wilkie and Dye, 1974). Ülkemizde ise Ege Bölgesinde

(Demir ve Gündoğdu, 1988) ve Doğu Akdeniz Bölgesinde (Tokgönül, 1995) etmemin varlığını bildirmiştir.

Gövde nekrozuna neden olan *P. fluorescens*' in varlığı Yunanistan Alivizatos (1984) ve Portekiz Jacob (1991) rapor etmiştir. Ülkemizde ise ilk defa Saygılı ve ark. (2004) *Pseudomonas fluorescen* biotip I' in varlığını rapor etmişlerdir.

Catara ve ark. (2002) İtalya, Fransa ve İspanya'da gövde nekrozu semptomu gösteren bitkilerden izole ettikleri floresan *Pseudomonas* türleri ile yaptıkları çalışmada 20 biyokimyasal test, DNA-DNA hibridizasyonu, REP- ve BOX-PCR sonuçlarına göre *P. corrugata*'ya yakın akraba olan yeni bir türün *Pseudomonas mediteranea* olarak isimlendirilmesini önermişlerdir. Bu çalışma ile domateslerde gövde nekrozuna neden olan yeni bir bakteri türü daha saptanmıştır. Ülkemizde ise ilk defa Şahin ve ark. (2004) ile Basım ve ark. (2005) tarafından *Pseudomonas mediteranea*'nin varlığını rapor etmişlerdir.

Solaiman ve ark. (2005) PCR test metotunu kullanarak *P. corrugata*'da iki pha-distinguishable guruplar bulunmasıyla ve *P. mediteranea*'nın mcl-PHA'yı üretmesiyle bu iki tür arasındaki farklılığını ortaya koymuşlardır.

Tanılamayan *Pseudomonas* türlerinin de gövde nekrozuna neden olduğu Yunanistan'da Skoudridakis (1986) tarafından bildirilmiştir. Kanada'da domateslerde gövde nekrozuna neden olan bir patojenin fizyolojik, morfolojik ve biyokimyasal test sonuçlarına göre *E.c.subsp caratovora*, *E.crysanthemi*, *P. cichori*, *P. corrugata*, *P. viridiflava* ve *p fluorescens* olmadığı belirlenmiş ve etmenin tanılanamayan *Pseudomonas* türü olarak rapor edilmiştir (Dhavantari, 1990).

Gövde nekrozuna neden olan floresan *Pseudomonas* türlerinin tanısı ve taksonomisi ile ilgili yapılan çalışmalarda Sutra ve ark. (1997) bu floresan *Pseudomonas*'ları 3 genomik gruba ayırarak bir çok özellik bakımından *P. corrugata*'ya benzediğini saptamışlardır. Yapılan çalışmalarda 1. ve 2. genomik gurupların fenotipleri bakımından birbirine yakın olduğunu ve genomik grup 3 citraconate ve laevulinate organik tuzlarını kullanması genomik grup 1 ve 2'den ayrıldığını tespit etmişlerdir. Lipopolysaccaride ve yağ asit analizleri ile 3 farklı genom olduğunu ve bu 3 farklı genomlarında , *P. corrugata*'dan farklı olduğunu

belirlemişlerdir. Bu üçgenomic gurubu isimlendirilmemiş fakat *Pseudomonas* genomik türü FP1, FP2 ve FP3 olarak belirtmişlerdir.

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

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Domates bitkilerinde tipik hastalık simptomsu gösteren bitki örneklerinden izole edilen bakteriyel etmenlerin tanılanmasında karşılaştırma kültürleri olarak Georg-Agust Üniversitesi Bitki Koruma Bölümünden (Göttingen,Almanya) Dr K Roudolph'dan temin edilen orijinal *P. corrugata* (GSPP 1224), *P. viridiflava* (GSPB 1685), *P. cichori* (GSPB 2097), *Erwinia caratovora* subsp *caratovora* (GSPB 30/77), *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria* (GSPB 224) izolatları INRA, Fransa'dan Dr. L. Sutra'dan temin edilen *P. mediterranea* (CFBP 5447) ve *P. fluorescens* (CFBP 2102) izolatları *E. amylovora* izolatı ve bölgemizden izole edilen *Pseudomonas* spp izolatları Heniz-2274 çeşidi domates bitki ve tohumları, ELISA testinde kullanılan TOGTAG 2364 nolu proje çerçevesinde üretilen *P. corrugata*, *P. cichori* ve *P. viridiflava* antiserumları, çeşitli besi ortamları ve kimyasallar, saksılar, laboratuvar araç ve gereçleri materyal olarak kullanılmıştır.

3.2. Metot

3.2.1. Hastalıklı Bitki Materyallerinin Toplanması

Doğu Akdeniz Bölgesinde Mersin ilinin Tarsus, Erdemli ilçelerinde, Kocahasanlı beldesinde Adana'nın Ceyhan ve Yumurtalık ilçelerinde örtü altı domates yetiştiriciliği yapılan seralardan hastalık domates bitki örnekleri toplanmıştır. Öz nekrozu simptomsu gösteren bitki örnekleri gazete kağıdına sarılıp naylon torbalara yerleştirildikten sonra buz kutusu içerisinde Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümündeki laboratuvarımıza getirilmiş ve izolasyon işlemleri başlamıştır.

3.2.2. Hastalıklı Bitki Materyalinden İzolasyon

Öz nekrozu simptomsu gösteren domates bitkilerinin gövdeleri boyuna kesilmiş, hastalıklı ve sağlıklı doku kısımlarını içerecek şekilde 1-2mm'lik alınan bitki parçaları önce çeşme suyunda yıkanmış daha sonra %70'lik alkol ile yüzeyden dezenfekte edilmiş ve içerisinde 2ml steril su bulunan havanlarda ezilmiştir. Elde edilen ekstraktan bir öze dolusu süspansiyon alınarak King B (King ve ark., 1954) besi yerine çizimler yapılmıştır. 25 °C'de 48 saatlik inkübasyondan sonra florasan olan ve olmayan petride dominant bulunan kahverengimsi ve sarı koloniler saflaştırılmıştır.

3.2.3. Patojenite Testi

Elde edilen izolatlar ve karşılaştırma kültürlerinin 0.1 ml'si şırınga yardımıyla H-2274 domates gövdelerine enjekte edilerek patojenite testi gerçekleştirilmiştir (Jones ve ark., 1984). Yapılan re-izolasyonlar sonucu elde edilen izolatların tanısı klasik bakteriyolojik yöntemlerin yanında yağ asit profilleri ve ELİSA da yapılmıştır.

3.2.4. *Pseudomonas* spp İzolatlarının Tanısı

3.2.4.1. King B Besi Yerinde Gelişim

Litrede 20 g proteose pepton, 10 ml gliserin 1.5 g K₂HPO₄, 1.5 g MgSO₄·7H₂O ve 15 g agar içeren King B besi yeri 121°C'de 15 dakika otoklav edildikten sonra petrilere dökülmüştür (King ve ark., 1954). Besi yerine çizilen gövde öz nekrozu *Pseudomonas* spp izolatları ve referans kültürler *P. corrugata* (GSPB 1224) , *P. viridiflava* (GSPB 1685), *P. cichori* (GSPB 2097) 48 saat 26°C'de inkübe edilmiştir. Gelişen koloniler UV ışık altında florasan gelişme yönünden incelemiştir.

3.2.4.2. YDC Besi Yerinde Gelişim

Taze hazırlanan litrede 10 g yeast extract, 20 g kalsiyum karbonat, 15 g agar içeren besi yeri 121°C'de 15 dakika otoklav edildikten sonra petrilere dökülmüştür. Besi yerine çizilen *Pseudomonas* spp izolatları ve referans kültürleri *P. corrugata* (GSPP 1224), *P. viridiflava* (GSPB 1685), *P. cichori* (GSPB 2097) 48 ve 168 saat 26°C'de inkübasyondan sonra gelişimleri yönünden incelenmiştir.

3.2.4.3. Levan Oluşumu

Nutrient agar ortamına %5 oranında sukroz eklenerek hazırlanan besi yerine gövde öz nekrozu *Pseudomonas* spp izolatları, referans kültürler *P. corrugata* (GSPP 1224) , *P. viridiflava* (GSPB 1685), *P. cichori* (GSPB 2097) ve *E. amlyvora* kültürü çizildikten sonra 25°C'de 3-4 gün inkübe edilmiştir. İnci gibi kabarık, mukoid ve konveks, koloniler pozitif olarak değerlendirilmiştir (Lelliot ve Stead, 1987).

3.2.4.4. Oksidaz Testi

King B besi yerinde 48 saat geliştirilen bölge izolatları ve referans izolatlar taze hazırlanana %1 lik N:N:N:N- Tetrametilyl-1,4 phenylene diammonium diclorid solisyonu damlatılmış kurutma kağıtları üzerine sürülmüştür. 10 saniye sonra bakteri kitlesi maviye dönüşürse pozitif, mavi renk değişimi olmaz ise negatif olarak değerlendirilmiştir.

3.2.4.5. Patates Çürüklük Testi

Deterjanlı suda fırçalanarak yıkanan patatesler %1'lik NaOCl'de 3 dakika bekletilmiş daha sonra 3 kez saf ile durulanmıştır. Bu işlemten sonra steril bir bistüri ile kabuklar soyulmuş ve 1 cm eninde dilimlenmiştir. Steril ıslak filtre kağıdı içeren steril petrilere içine patates dilimleri yerleştirilmiştir. Testlenen izolatlar ve referans

kültürler patates dilimi üzerine bulaştırılmıştır. 26 °C’de 2 günlük inkübasyondan sonra değerlendirilme yapılmıştır (Lelliot ve Stead, 1987).

3.2.4.6. Arginin Dehidrolaz Testi

Litrede 1g pepton, 5g NaCl, 0.3g K₂HPO₄, 10g L(+) arginin HCl, 0.01g fenol kırmızısı, 3g agar içeren besi yeri hazırlandıktan sonra pH 7.2’ye ayarlanmıştır. 16*1,5 cm’lik tüplere 3 ’er ml besi yeri konup otoklav edilmiştir. Taze geliştirilmiş gövde öz nekrozu *Pseudomonas* spp izolatları ve orijinal kültürler ile nokta aşılama yapılmıştır. Tüplerin üzeri steril vaspar eriyiği (vaspar 1 ölçü vazelin, 3 ölçü sıvı parafin eritilen vazeline parafin ilave edilir ve 121 °C’de 15 dakika otoklav edilir) ile kapatılmıştır. Kültürler 26°C’de 2 hafta inkübe edildikten sonra kırmızıdan (pembe) vişne rengine dönenler pozitif kabul edilmiştir (Lelliot ve Stead, 1987). Negatif kontrol olarak üç tüp aşılanmamıştır.

3.2.4.7. Tütünde Aşırı Duyarlılık (HR)

King B besi yerinde 24-48 saat geliştirilmiş gövde öz nekrozu *Pseudomonas* spp izolatları ve orijinal kültürlerden 10⁸ hücre /ml yoğunluğunda süspansiyon hazırlanmış ve steril bir enjektör yardımı ile tütün yaprağına inokule edilmiştir. 24-48 saat sonra inokule edilen alanlarda oluşan nekrotik görünüm pozitif olarak kabul edilmiştir (Lelliot ve Stead, 1987).

3.2.4.8. Oksidasyon / Fermantasyon Testi (O/F)

Litrede 2 g pepton, 5 g NaCl, 0.3 g K₂HPO₄, 3 g agar, 3 ml %1’lik bromothymolblue içeren besi yeri hazırlandıktan sonra tüplere 5’er ml konulmuştur. 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 gövde öz nekrozu *Pseudomonas* spp izolatları ve orijinal bakteri kültürleri ile nokta aşılama yapılmıştır. Her izolat için 6 tüp kullanılmıştır. Bu tüplerin üçüne

hiçbir ekleme yapılmamıştır. 25°C’de 5-6 günlük inkübasyondan sonra besi yeri renginin sarıya dönmesi pozitif olarak kabul edilmiştir. Pozitif kontrol olarak *E. c. subsp. caratovora* negatif olarak ise *E. amylovora* kültürü kullanılmıştır.

3.2.4.9. Jelatin Hidrolizasyonu Testi

Litrede 3g yeast ekstrakt, 5g pepton, 120g jelatin içeren besi yerinden tüplere 5’er ml konup 121 °C’de 15 dakika otoklav edilmiştir. Besi yeri katılaştıktan sonra 48 saatlik *Pseudomonas* spp izolatları ve orijinal bakteri kültürleri ile 3 tekrarlı olarak delme aşılama yapılmıştır. 25°C’de 14 günlük inkübasyondan sonra +4°C’de yarım saat bekletilip buzdolabında çıkartılan tüplerde görülen sıvılaşma pozitif olarak kabul edilmiştir (Lelliot ve Stead, 1987). Negatif kontrol olarak üç tüp aşılammamıştır.

3.2.4.10. Lesitinaz Üretimi

Taze günlük yumurtalar deterjanlı su ile yıkandıktan sonra 5 dakika %70’lik alkolde bekletilip alevden geçirilmiştir. Steril bir mezür içine yumurtanın sarısı alınıp %40’lıksolüsyon hazırlanmıştır. Bu solüsyonun 48°C’ye kadar soğutulmuş steril nutrient agar besi yerine %10 oranında ilave edilip iyice karıştırıldıktan sonra steril petrilere dökülmüştür. Katılaştıran besi yerine 48 saatlik *Pseudomonas* spp izolatları ve orijinal bakteri kültürleri nokta aşılama yapılmıştır. Koloni çevresinde sütümsü parlak gelişme pozitif olarak değerlendirilmiştir (Fahy ve Persley, 1983).

3.2.4.11. NaCl Tolaransı

Nutrient broth sıvı besi yerine %5 oranında NaCl eklenmiş ve tüplere 5’er ml konularak otoklav edilmiştir. 48 saatlik *Pseudomonas* spp izolatları ve orijinal bakteri kültürleri ile tüplere aşılammıştır ve 25 °C’de 18 günlük inkübasyondan sonra bakteri kültürü kontrole göre değerlendirilmiştir. Yanılgı payını asgariye indirmek amacıyla bulanıklık gösteren tüplerden katı besi besi yerine ekim yapılmış ve gelişen

koloniler ile hazırlanan süspansiyon tütün yapraklarına inokule edilmiştir. Tütün testinde olumlu sonuç veren kültürler pozitif olarak değerlendirilmiştir (Lelliot ve Stead, 1987).

3.2.4. 12. Karbon Kaynaklarını Kullanma

Ayer ve ark. (1919)'nın tarif ettiği temel besi yeri litrede 1 g $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 0.2g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.0016 g bromocresol purpur, içeren temel besi yerinin pH'sı 7.1-7.2'ye ayarlanmıştır. Başlangıçta pH:4.5 civarında olan besi yerinin rengi sarı-turuncu iken pH yükseltilince mor renge dönüşmüştür. Agar ilave edilip kaynatılmış ve besi yeri 11 erlene eşit olarak dağıtılmıştır. Her bir erlendeki temel besi yerine %0.5 oranında sukroz, xyloz, laktoz, sorbitol, L(+)-arabinoz, D(-)-arabinoz, inulin, meliboz, raffinoz, mannoz, trehaloz ve mannitol ilave edilmiş ve tüplere 6'şar ml olarak dağıtılmıştır. Otoklav edilip eğik şeklinde dondurulan tüpler *Pseudomonas* spp izolatları ve orijinal bakteri kültürleri ile aşılanmıştır. 25°C'de 5 günlük bir inkübasyondan sonra mor renkli negatif kontrole rengin sarıya dönmesi pozitif olarak değerlendirilmiştir. Negatif kontrol olarak üç tüp aşılanmamıştır (Lelliot ve Stead, 1987).

3.2.4.13. Sitrat Kullanma

Litreye 5 g NaCl, 2.5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 g $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 2 g sodyum nitrat içeren besi yerin (pH:6,8) ayarlandıktan sonra süzgeç kağıdından geçirilerek süzülen besi sıvısına %2 oranında agar ve %0.008 oranında bromthymol mavisi ilave edilmiştir. Tüplere 8 ml dağıtılan besi yeri otoklavdan sonra eğik şeklinde dondurulmuştur. 48 saatlik *Pseudomonas* spp izolatları ve orijinal bakteri kültürleri ile tüplere aşılanmıştır ve 25 °C'de inkübe edilmiştir. 7 günlük inkübasyondan sonra yeşil renkteki ortamın maviye dönmesi ile bakterinin sitratı kullandığı anlaşılmaktadır (Köşker,1971).

3.2.4.14. Katalaz Reaksiyonu

Nutrient agar 121°C'de 15 dakika otoklav edildikten sonra petrilere dökülmüştür. 48 saatlik *Pseudomonas* spp izolatları ve orijinal bakteri kültürleri zigzag şeklinde petrilere aşılanmıştır 25°C' de 24 saat tutulduktan sonra üzerlerine 1ml %3'lük hidrojen proksit dökülmüştür (solüsyon taze hazırlanmalı veya koyu renkli cam şişelerde muhafaza edilmelidir). Pozitif reaksiyonunda hemen anında (birkaç saniye içinde) katalaz aktivitesi sonucu açığa çıkan oksijen kabarcıkları gözle görülmüştür (Lelliot ve Stead, 1987).

3.2.4.15. Nişasta Hidrolizasyonu

Nişasta hidrolizasyonu için nutrient agar besisi yerine %2 oranında eriyebilir nişasta ilave edilmiştir. Bunun için 10-20 ml destile suda eritilen nişasta ısıtılarak çözöldükten sonra nutrient agara ilave edilmiştir. 121°C'de 15 dakika otoklav edildikten sonra petrilere dökülmüştür. 48 saatlik *Pseudomonas* spp izolatları ve orijinal bakteri kültürleri zigzag şeklinde petrilere aşılanmıştır. Pozitif kontrol olarak *X. c. pv vesicatoria* (GSPB224) izolatı kullanılmıştır. 25°C' de 7 günlük bir inkübasyondan sonra kültürler lugal eriği (1g iyot ve 2g KI eritilip 300ml destile suya tamamlanmıştır) dökülmüştür. Nişastanın hidrolizasyonu şerit şeklindeki bakteri kolonisinin etrafında meydana gelen boyanmamış alanın izlenmesiyle saptanmıştır (Lelliot ve Stead, 1987).

3.2.4.16. Kazein Hidrolizasyonu

3 g beef extract, 5 g pepton, 15 g agar 1000 ml destile su içinde erilip %10 yağsız süt tozu ilave edilmiştir. 121°C'de 15 dakika otoklavdan sonra petrilere dökülen besiyeri üzerine 48 saatlik *Pseudomonas* spp izolatları ve orijinal bakteri kültürleri zigzag şeklinde petrilere çizilmiştir. 25°C' de 48 saatlik bir inkübasyondan sonra üzerine 8 ml ayıraç (12 g HgCl₂, 80 ml destile suda eritildikten sonra 16 ml konsantre HCl ilave edilerek çalkalanmıştır) dökülmüştür. Pozitif kontrol olarak

Erwinia c. subsp caratovora (GSPB 30/77) kültürü kullanılmıştır. Kazein hidralizasyonu kolonilerin etrafında ortaya çıkan açık renkli bölgeler yardımıyla saptanmıştır (Janke ve Dicksheit,1971). Aynı denemede nutrient agar + %10 skim milk ile tekrarlanmış ve aynı şekilde değerlendirilmiştir.

3.2.4.17.Nitrat İndirgenmesi

Nitrat için 10 g pepton, 1 g KNO₃, 1000 ml destile su ile hazırlanan besi ortamının pH'sı 7.2'ye ayarlanmıştır. Hazırlanan ortam 5'er ml tüplere konularak otoklav edilmiştir. 48 saatlik *Pseudomonas* spp izolatları ve orijinal bakteri kültürleri tüplere aşılanmıştır. Test nitrit reaktifi ile yapılmıştır. Araştırılan kültür sıvısına 24 saatlik inokulasyondan sonra A ve B ayraçlarından 5'er ml konulmuştur. Vişne rengi verenler pozitif, renk vermeyenler negatif olarak değerlendirilmiştir (Lelliot ve Stead, 1987).

Denemede aşılama 1 ve 5 gün sonra olmak üzere 2 kez yapılmıştır. 3 tüp 1 gün sonra, 3 tüp ise 5 gün sonra değerlendirilmiştir.

A) 8 gr sülfanilik asit 1 lt 5N asetik asitte ısıtılarak çözülmüştür.

B) 5 gr dimetihlnaphtylamin 20ml kaynar destile suda çözüldükten sonra renksiz sıvı çöktürden başka kaba alınarak 5N asetik asitle 1000 ml'ye tamamlanmıştır.

3.2.5. *Pseudomonas* spp. İzolatlarının ELISA Testi ile Tanısı

Pseudomonas spp izolatlarının ELISA yöntemi ile tanısında izolatların saf bakteri kültürleri kullanılmıştır.

Tanısı yapılacak saf bakteri kültürleri 48 saat King B besi yerinde geliştirilmişler bu kültürlerden birer öze alınmış ve 1ml PBS (10 µM KH₂PO₄, 10µM K₂HPO₄ pH:7.2, 0.15 M NaCl) içine konarak spektrofotometre de yoğunluğu A₆₀₀:0.1 nm'ye ayarlanmıştır. Süspansiyonlar ELISA platesi çukurlarına 100'er µl olacak şekilde 3 tekrarlı olarak yerleştirilmiştir (Vunakis, 1980 ve Voligan ve ark, 1991). Daha sonrada ELISA test prosedürü uygulanmıştır.

- 100µl bakteri kültürü ELISA platesi (Nuck marka, katalog no 439454) çukurlarına 3 tekrarlı olarak yerleştirilmiştir.
- Plate +4°C’de 1 gece inkübe edilmiştir.
- Plate dökülüp 3 kez yıkama tamponu (PBS+%0.05 Tween 20) ile yıkanmıştır.
- 100 ml PBS’e 1 gr Pınar Yağsız Süt tozu eklenerek hazırlanan süspansiyondan her bir çukura 200 µl eklenmiştir.
- Plate 1 saat 37C’de inkübe edilmiştir.
- Plate 3 kez yıkama tamponu ile yıkanmıştır.
- TARP-2364 nolu proje çerçevesinde TÜBİTAK-MAM, Gebze, Kocaeli’nde üretilen poliklonal antiserumlar kullanılmıştır (Aysan ve ark., 2002). Aysan ve ark. (2004)’de belirtildiği gibi sulandırılan antiserumlar (*P. cichorii* antiserumu 1/5000, *P. corugata* antiserumu 1/10000, *P. viridiflava* antiserumu 1/1000) her bir çukura 3 tekrarlı olmak üzere 100 µl konulmuştur.
- Plate 1 saat 37°C’de inkübe edilmiştir.
- Plate 3 kez yıkama tamponu ile yıkanmıştır.
- Antirabbit IgG ile birleştirilmiş alkaline fosfatazın 1/5000 seyrettilmesinde (PBS ile hazırlanmış) 100 µl her bir kuyuya eklenmiştir.
- Plate 5 kez yıkama tamponu ile yıkanmıştır.
- Her bir kuyuya 100 µl substrat tamponu eklenerek plate 45 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
- ELISA okuyucusunda 405 nm’de okunma yapılmış ve PBS tamponundan elde edilen değerinin en az iki katı ve fazlası veya karşılaştırma kültürleri yakın olan değerler pozitif olarak değerlendirilmiştir.

3.2.6. *Pseudomonas* spp İzolatlarının Yağ Asit Profillerinin Belirlenmesi

Çalışmanın bu kısmı Atatürk Üniversitesi Biyoteknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezinde (Erzurum) yapılmıştır. Çalışmada kullanılacak *Pseudomonas* spp izolatları De Boer ve Sasser (1986)'in yöntemine göre ekstrakte ve metile edilerek tüm hücre yağ asit profilleri gaz kromatografisi (HP6890, Hewlett-Packard, Palo Alto, CA) ile birbirinden ayrılmış ve yağ içerikleri tanımlanmıştır. İzolatların yağ içeriklerini tanılamak için 4 farklı çözelti kullanılmıştır. Türlerin tanısında Mikrobial Identification System software package (MIS version 4.5, Microbial ID, Inc., Newark, DE) bilgisayar programı kullanılmıştır. Çalışmada aşağıdaki prosedür izlenmiştir.

Tryticase soy agar (TSBA) besi yerine 4 fazlı şekilde çizilen izolatlar 25°C'de 24 saat geliştirilmiştir. Geliştirilen bakteri izolatları 3. ve 4. fazından toplanan kültür ağzı teflon kapaklı steril cam tüplere konmuştur. Hücreleri parçalamak için her bir test tüpüne 1 ml çözelti 1'den (sırası ile 150 ml metil alkol ve 150 ml H₂O bir litrelik renkli çözelti şişesine ilave edilmiştir ve daha sonra katı formdaki 45 g sodyum hidroksit ekleyip iyice çözülünceye kadar karıştırılmıştır) eklenmiştir. Tüpler 10 saniye çalkalandıktan sonra 100°C'deki su banyosunda 5 dakika bekletilmiştir. Çıkarılacak 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 çözelti 2'den (sırası ile 6 N'lik 325 ml hidroklorik asit ve 225 ml metil alkol bir litrelik renkli çözelti şişesinde iyice çözününceye kadar karıştırılmıştır) eklenip 10 saniye çalkalandıktan sonra tüpler 80°C'deki su banyosunda 10 dakika bekletilmiştir. Bu işlemi takiben tüpler -20°C'de 10 dakika tutulmuştur. Bu işlem ile serbest yağ asitlerine ester bağları ile metil eklenerek yağ asitlerinden yağ asit metil esterleri elde edilmiştir. Bu durum yağ asitlerine yüksek sıcaklıkta buharlaşma özelliği kazandırmaktadır. Soğutulmuş tüplere 2.5 ml çözelti 3 (sırası ile 200 ml methyl-tert-butyl ether, 200 ml hexane üzerine ilave edilerek bir litrelik renkli çözelti şişesinde iyice çözülünceye kadar karıştırılmıştır) eklenerek 5 dakika tüpler çalkalanmıştır. Bu aşamada tüplerin alt kısmında asidik, üst kısmında da organik sıvı fazları olmak üzere iki ayrı faz

oluşacaktır. Pastör pipet kullanılarak tüplerin alt kısmındaki asidik faz atılacak ve organik faz toplanmıştır. En son aşamada ise her tüpe 3 ml çözelti 4 (sırası ile 10.8 g katı formdaki sodyum hidroksit, 900 ml H₂O içerisinde bir litrelik renkli çözelti şişesinde iyice çözülünceye kadar karıştırılmıştır) 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 dilmesini sağlamaktadır. Bu aşamadan sonra tüpler içerisinde yine 2 farklı faz oluşacaktır. Üst fazda toplanacak yağ asit metil esterlerini içeren faz pastör pipet ile alınarak 2 ml'lik gaz kromatografisi tüplerine aktarılmıştır ve ağızları sıkıca kapatılmıştır. Tüpler MIS cihazı (HP6890, Hewlettpackard, Palo Alto, CA) üzerindeki örnek depolama birimine yerleştirilecek ve daha sonra sistem kılavuzunda belirtildiği gibi her örnek için analizler yapılarak tanı sonuçları alınmıştır.

4. TARTIŞMA ve BULGULARI

Doğu Akdeniz Bölgesinde İçel'in Tarsus, Erdemli, ve Kocahasanlı ilçelerinde Adana'nın Ceyhan ve Yumurtalık ilçelerinde örtü altı domates yetiştiriciliği yapılan seralarda alınan hastalık simptomsu gösteren domates bitki örneklerinde solgunluk, gövde üzerinde renk değişimi, köklerde renk değişimi gözlenmiş ve budanan yan dallardan hastalık etmeninin giriş yaptığı belirlenmiştir (Şekil 4.1., 4.2.). Gövdedeki renk değişimi siyaha yakın koyu kahverengidir (Şekil 4.3., 4.4.). Gövde boyunca kesildiğinde özün kahverengileştiği ve yapraklarda lekelenmeler gözlenmiştir. (Şekil 4.5.)



Şekil 4.1. Domates bitkisinde solgunluk



şekil 4.2. Gövde de renk değişimi



şekil 4.3 Yan dallara siyaha yakın renk değişimi



şekil 4.4. Gövdedeki renk değişimi



şekil 4.5 zn kahverengileşmesi

Hastalıklı bitkiler boyuna kesilip incelendiğinde pek çok bitkiye etmenlerin budama ve koltuk alma işlemleri sırasında açılan yaralardan giriş yaptığı görülmüştür (Şekil 4.6., Şekil 4.7.). Aysan ve Çınar (2001)'ın belirttiğı gibi budama aletlerinin etmeni bir bitkiden diğesine bulaştırdığı açıkça ortadadır. Serada hastalık birkaç bitkide ortaya çıktığında üretici bu bitkileri söküp atmadığından hastalık tüm seraya yayılabilmektedir (Aysan, 2001).



Şekil 4.6. Budanan yan dallardan hastalık etmenin girişi



şekil 4.7. Budanan dallardan hastalık etmeninin girişi

4.1. Hastalıklı Bitki Materyalinden Etmenin İzolasyonu

Domates bitkisinde oluşan tipik simptom gösteren dokulardan King B besi yerine yapılan re-izolasyonlar sonucu florasız ve non-florasız bakteriler elde edilmiştir. İzolatların tanısı klasik bakteriyolojik metotların yanı sıra serolojik ve moleküler teknikler ile de kanıtlanmıştır. Bu çalışmada elde edilen izolat listesi Çizelge 4.1.'de verilmiştir.

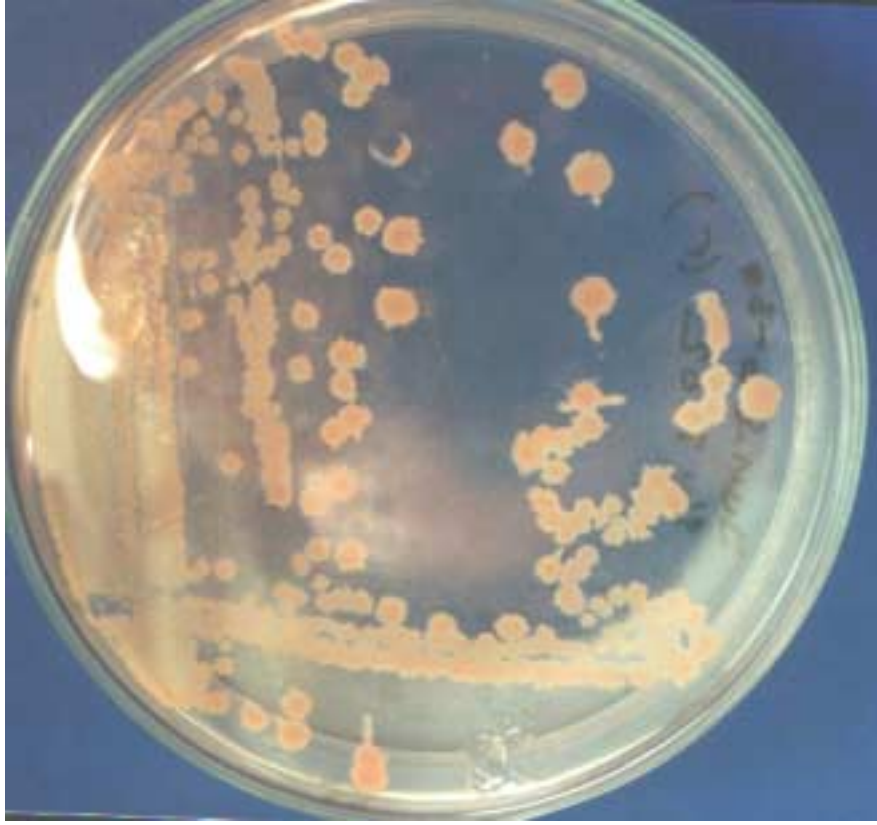
Çizelge 4.1. Çalışmada kullanılan *Pseudomonas* spp izolatlarının listesi

İzolatın Adı	Yer	Yıl
Yum-öz2-1	Yumurtalık	2002
Yum-öz2-2	Yumurtalık	2002
Yum-öz1b1	Yumurtalık	2002
Yum-öz1b2	Yumurtalık	2002
Yum-öz2b1	Yumurtalık	2002
Yum-öz3a1	Yumurtalık	2002
Yum-öz3a2	Yumurtalık	2002
Yum-öz3b	Yumurtalık	2002
Yum-id1b1	Yumurtalık	2002
İk-İd2-1a	Ceyhan	2002
İk-İd2-1b	Ceyhan	2002
İk-İd2-1c	Ceyhan	2002
TET-A	Tarsus	2002
TET-B	Tarsus	2002
Adu-4d1*	Kocahasanlı	1996
Mt-4a2*	Kocahasanlı	1996

* İzolatlar Doç. Dr. Yeşim AYSAN' dan temin edilmiştir.

4.2.King B Besi Yerinde Gelişimi

Pseudomonas spp izolatları ve *P. corrugata* (GSPP 1224), *P. viridiflava* (GSPB 1685), *P. cichorii* (GSPB 2097) 24 ve 48 saat 26°C’de inkübasyondan sonra Yum-öz1b1, TET-A, Adu-4d1,Mt-4a2, *P. viridiflava* ve *P. cichorii* florasan; İk-id2-1a ve *P. corrugata* non-florasan; Yum-öz1b1 ve *P. corrugata* kahverengimsi; TET-A, Adu-4d1, Mt-4a2, İk-id2-1a *P. viridiflava* ve *P. cichori* krem gelişim göstermiştir (Şekil 4.8.); (Çizelge 4.2.).



Şekil 4.8. King B besi yerinde Yum-öz1b1 izolatının gelişimi

4.3. YDC Besi Yerinde Gelişim

YDCA besi yerinde Yum-öz1b1 ve *P. corrugata* yeşil, yeşil-kıvrıcık TET-A, Mt-4a2, İk-id2-1a *P. viridiflava* ve *P. cichorii* krem ve Adu-4d1 krem kıvrıcık gelişim gözlenmiştir (Şekil 4.9., 4.10.); (Çizelge 4.2.).



Şekil 4.9. Yum-öz1b1 izolatının YDCA' da gelişimi



Şekil 4.10. Yum-öz1b1 izolatının YDCA' da gelişimi

4.4. Levan Oluşumu

Sukroz (% 5) içeren Nutrient Agar besi yerinde TET-A, Mt-4a2 ve Adu-4d1 izolatlarında kalın konveks ve mukoid gelişim gözlemlendiğinden levan pozitif olarak değerlendirilmiştir. Kalın konveks ve mukoid gelişmeyen koloniler ise levan negatif olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.11.), (Çizelge 4.2.).



Şekil 4.11. SNA’da TET-A izolatının gelişimi

4.5. Oksidaz Testi

Yum-öz1b1, TET-A, Mt-4a2, İk-id2-1a, Adu-4d1 *P. cichorii* ve *P. corrugata* izolatları oksidaz test solüsyonu emdirilmiş filtre kağıdına çizilen zigzaglar sonucu renk değişimi oluşturduğundan oksidaz pozitif olarak değerlendirilmiştir (Çizelge 4.2.).

4.6. Patates Çürüklük Testi

Patateslere aşılan kültür 48 saatlik inkübasyondan sonra Yum-öz1b1, TET-A, Mt-4a2, İk-id2-1a, Adu-4d1 *P. cichorii* ve *P. corrugata* izolatları yumuşaklık ve çürüme oluşturmamıştır ve deneme sonucu negatif olarak değerlendirilmiştir (Çizelge 4.2.).

4.7. Arginin Dehidralaz Testi

Bölge izolatlarından olan Yum-öz1b1, TET-A, Mt-4a2, İk-id2-1a ve Adu-4d1 referans kültürlerden *P. corrugata* izolatu yapılan ekimin 6.gününde ortamda vişne rengine dönmesiyle pozitif olarak değerlendirilmiştir (Çizelge 4.2.).

4.8. Tütünde Aşırı Duyarlılık Testi (HR)

İnokulasyondan 24-48 saat sonra Yum-öz1b1, TET-A, Mt-4a2, İk-id2-1a, Adu-4d1 *P. cichorii*, *P. viridiflava* ve *P. corrugata* tütün yaprağında hipersensitive reaksiyon oluştuğu için pozitif olarak değerlendirilmiştir (Çizelge 4.2.).

4.9. Oksidasyon / Fermantasyon Testi (O/F)

Değerlendirme 26°C'de 6 günlük bir inkübasyondan sonra Yum-öz1b1, TET-A, Mt-4a2, İk-id2-1a, Adu-4d1 *P. cichorii*, *P. viridiflava* ve *P. corrugata* oksijenli (vasparsız) ortamda gelişim olduğundan oksidatif olarak değerlendirilmiştir. (Çizelge 4.2.).

4.10. Jelatin Hidrolizasyonu Testi

25°C'de 14 günlük bir inkübasyondan sonra +4 °C'de yarım saat bekletilen Yum-öz1b1, TET-A, Mt-4a2, İk-id2-1a, Adu-4d1 ve *P. viridiflava* izolatlarında sıvılaşma gözleendiğinden pozitif değerlendirilmiştir (Çizelge 4.2.).

4.11 Lesitinaz Üretimi

Yum-öz1b1, TET-A, Mt-4a2, İk-id2-1a, Adu-4d1 *P. cichorii*, *P. viridiflava* ve *P. corrugata* izolatları aşılamadan 24-48 saat sonra koloni çevresinde parlaklık ve sütümsü bir gelişim gözleendiğinden pozitif olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.12.); (Çizelge 4.2.).



Şekil 4.12. Lesitinaz ortamında koloniler etrafında parlaklık

4. 12. NaCl Toleransı

Nutrient Broth ortamına % 5 oranında NaCl eklenerek hazırlanan besi yerinde 18 gün inkübe edilen Yum-öz1b1, TET-A, Mt-4a2, İk-id2-1a, Adu-4d1 *P. cichorii*, *P. viridiflava* ve *P. corrugata* izolatları tümü besi ortamında gelişmişlerdir. Yanılgıyı azaltmak amacıyla bulanıklık gösteren Yum-öz1b1, TET-A, Mt-4a2, İk-id2-1a, Adu-4d1 *P. cichorii*, *P. viridiflava* ve *P. corrugata* izolatlarının tüplerdeki besi ortamından katı besi yerine yapılan çizimlerde bakteriyel gelişim gözlenmiştir. Besi ortamında noktalı gelişen bakteri kolonilerinden hazırlanan süspansiyon bütün damar aralarına inokulasyonundan 24 saat sonra Yum-öz1b1, TET-A, Mt-4a2, Adu-4d1 ve *P. cichorii*, izolatları tipik aşırı duyarlılık reaksiyonu gözlenerek pozitif olarak değerlendirilmiştir (Çizelge 4.2.).

4.13. Karbon Kaynaklarını Kullanma

25 °C’de 5 günlük bir inkübasyondan sonra mor renkli negatif kontrole rengin sarıya dönmesi pozitif olarak değerlendirilmiştir. Yum-öz1b1 ve TET-A izolatları sukroz, xyloz, L(+) arabinoz, mannoz, trehaloz ve mannitol’ü kullanmıştır. İk-id2-1a izolatı Yum-öz1b1 ve TET-A izolatlarından farklı olarak sorbitol kullanmıştır. Adu-4d1 izolatı sukroz, xyloz, L(+) arabinoz, D(-)arabinoz, unilin, mannoz ve mannitol’ü kullanmıştır. Mt-4a2 izolatı Adu-4d1 izolatından farklı olarak trehalozu da kullanmıştır. *P. cichorii* ve *P. viridiflava* xyloz, L(+) arabinoz, mannoz ve mannitol’ü kullanırken *P. corrugata* bunlardan farklı olarak trehalozu kullanmıştır. Tanılama testi sonuçları toplu halde Çizelgede 4.3. de verilmiştir.

4.14. Sitrat Kullanma

Yum-öz1b1, TET-A, Mt-4a2, İk-id2-1a, Adu-4d1 *P. cichorii*, *P. viridiflava* ve *P. corrugata* izolatları 25 °C’ de inkübe edildikten 48 saat sonra yeşil renkteki ortamın maviye dönmesi pozitif olarak değerlendirildi (Şekil 4.13.); (Çizelge 4.2.).



Şekil 4.13. İzolatların Sitrati kullanmasıyla yeşil rengin maviye dönmesi

4.15. Katalaz Reaksiyonu

48 saatlik Yum-öz1b1, TET-A, Mt-4a2, İk-id2-1a, Adu-4d1 *P. cichorii*, *P. viridiflava* ve *P. corrugata* izolatları zigzag şeklinde petrilere çizilmiştir. 25°C’ de 24 saat tutulduktan sonra üzerlerine 1ml %3’lük hidrojen proksit dökülmesiyle oluşan oksijen kabarcıkları ile pozitif olarak değerlendirilmiştir (Çizelge 4.2.).

4.16. Nişasta Hidrolizasyonu

Pseudomonas spp izolatları ve orijinal bakteri kültürleri zigzag şeklinde petrilere aşılanmıştır. 25°C’ de 7 günlük bir inkübasyondan sonra kültürler lugal eriği dökülmüştür. Yum-öz1b1, TET-A, Mt-4a2, İk-id2-1a, Adu-4d1 *P. cichorii*, *P. viridiflava* ve *P. corrugata* izolatları nişastanın hidrolizasyonu şerit şeklindeki bakteri kolonisinin etrafında meydana gelen boyanmış alan izlenmemesiyle negatif olarak değerlendirilmiştir (Çizelge 4.2.).

4.17.Kazein hidrolizasyonu

Yum-öz1b1, TET-A, Mt-4a2, İk-id2-1a, Adu-4d1 *P. cichorii*, *P. viridiflava* ve *P. corrugata* izolatları 25°C’ de 48 saatlik bir inkübasyondan sonra üzerine 8 ml ayraç dökülmesiyle kolonilerin etrafında açık renkli bölgenin görülmemesiyle negatif olarak değerlendirilmiştir (Çizelge 4.2.).

Çizelge 4.2. Klasik bakteriyolojik yöntemlerle tanılama test sonuçları

Testler	P. vir 1685	P. cic 2097	P. cor 1224	Yum- öz1b-1	TET-A	İk-İd 2- 1a	Adu-4d1	Mt-4a2
Levan	-	-	-	-	+	-	+	+
Oksidaz	-	+	+	+	+	+	+	+
Patates Pek. Aktivitesi	+	-	-	-	-	-	-	-
Arginin	-	-	+	+	+	-	+	+
Tütün HR	+	+	+	+	+	+	+	+
O/F	O	O	O	O	O	O	O	O
Jelatin Erime Yet.	+	-	-	+	+	+	+	+
% NaCl(tütün)	+	+	-	+	-	-	+	+
KingB Florasan Pig.	+	+	-	+	+	-	+	+
YDCA'da Gelişim	Krem	Krem	Yeşil- Kıvrıcık	Yeşil- Kıvrıcık	Krem	Krem	krem Kıvrıcık	Krem
NA' da Mavi Pigm. Olş.	-	-	-	-	-	-	-	-
Nişasta Hidralizi	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitratın nitrite İnd.(1.gün)	-	-	+	-	+	-	+	+
Nitratın nitrite İnd.(7.gün)	-	-	+	-	+	-	+	+
Sitrat	+	+	+	+	+	+	+	+
Kazaein Hidralizasyonu	-	-	-	-	-	-	-	-
Katalaz Akt.	+	+	+	+	+	+	+	+
Lesitiniaz	+	+	+	+	+	+	+	+

Çizelge 4.3. Karbon kaynakları test sonuçları

Testler	<i>P. vir</i> 1685	<i>P. cic</i> 2097	<i>P. cor</i> 1224	Yum- öz1b1	TET-A	İk-İd 2-1a	Adu-4d1	Mt-4a2
Sukroz	-	-	+	+	+	+	+	+
Xyloz	+	+	+	+	+	+	+	+
Laktoz	-	-	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-	+	-	-
L(+) Arobinoz	+	+	+	+	+	+	+	+
D(+) Arabinoz	-	-	-	-	-	-	+	+
Inulin	-	-	-	-	-	-	-	-
Melibioz	-	-	-	-	-	-	+	+
Raffinoz	-	-	-	-	-	-	-	-
Mannoz	+	+	+	+	+	+	+	+
Trehaloz	-	-	+	+	+	+	-	+
Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+

4.18. *Pseudomonas* spp. İzolatlarının ELISA Testi ile Tanısı

ELISA çalışmalarında Yum-öz1b-1, TET-A, İk-İd 2-1a, Adu-4d1, Mt-4a2 izolatlarına karşı Gebze TÜBİTAK-MAM/GMBA'da üretilmiş olan antiserumlar kullanılmış ve izolatlardan elde edilen absorbans değerleri negatif kontrol amacıyla kullanılan PBS tamponundan elde edilen değerinin (0,588) en az iki katı ve fazlası olmadığı için veya karşılaştırma kültürleri için elde edilen değerlere yakın değerler olmadıkları için sonuç negatif olarak değerlendirilmiştir. *P. cichorii* antiserumu ile yapılan çalışmada *P. cichorii* (GSPB 2907) izolatı 1,546 değerini verirken Yum-öz1b1 0.705, TET-A 0.857, İk-İd 2-1a 0.930, Adu-4d1 0.595, Mt-4a2 0.675 değerleri elde edildi; *P.corugata* antiserumu ile *P.corugata* (GSPB 1224) izolatı 1.207 iken Yum-öz1b1 0.556, TET-A 0.610, İk-İd 2-1a 0.779, Adu-4d1 0.677, Mt-4a2 0.555 değeri elde edilirken *P. viridiflava* antiserumu ile *P. viridiflava* (GSPB 1685) izolatı 2.298 değerini verirken Yum-öz1b1 0.815, TET-A 0.761, İk-İd 2-1a 1.245, Adu-4d1 0.573, Mt-4a2 0.563 değerleri elde edilmiştir ve karşılaştırma kültürlerine yakın değerler olmadığı gözlenmiştir (Çizelge 4.4., 4.5., 4.6.).

Çizelge 4.4. *P. cichorii* anti serumu ile yapılan ELISA sonucu

	<i>P. cichorii</i>				
	I	II	III	Ortalama	Sonuç
PBS	0.580	0.597	0.587	0.588	-
Yum-öz1b1	0.684	0.685	0.747	0.705	-
TET-A	0.848	0.804	0.920	0.857	-
İk-İd 2-1a	0.953	0.939	0.897	0.930	-
Adu-4d1	0.586	0.592	0.607	0.595	-
Mt-4a2	0.600	0.662	0.763	0.675	-
<i>P. cichorii</i> (GSPB 2907)	1.547	1.559	1.531	1.546	+

Çizelge 4.5. *P.corugata* anti serumu ile yapılan ELISA sonucu

	<i>P.corugata</i>				
	I	II	III	Ortalama	Sonuç
PBS	0.580	0.597	0.587	0.588	-
Yum-öz1b1	0.554	0.539	0.575	0.556	-
TET-A	0.628	0.610	0.593	0.610	-
İk-İd 2-1a	0.749	0.762	0.826	0.779	-
Adu-4d1	0.699	0.685	0.648	0.677	-
Mt-4a2	0.558	0.553	0.555	0.555	-
<i>P.corugata</i> (GSPB 1224)	1.158	1.202	1.235	1.207	+

Çizelge 4.6. *P. viridiflava* anti serumu ile yapılan ELISA sonucu

	<i>P. viridiflava</i>				
	I	II	III	Ortalama	Sonuç
PBS	0.580	0.597	0.587	0.588	-
Yum-öz1b1	0.811	0.820	0.813	0.815	-
TET-A	0.802	0.758	0.724	0.761	-
İk-İd 2-1a	1.202	1.213	1.320	1.245	-
Adu-4d1	0.580	0.564	0.574	0.573	-
Mt-4a2	0.606	0.545	0.537	0.563	-
<i>P. viridiflava</i> (GSPB 1685)	2.277	2.270	2.348	2.298	+

4.18. *Pseudomonas* spp İzolatlarının Yağ Asit Profillerinin Belirlenmesi

Çizelge 4.7.'da görüldüğü üzere 8 izolat ile yapılan çalışmada 22 farklı yağ asiti izole edilmiştir. izole edilen yağ asitleri 8:0 3OH (% 0.41), 10:0 (%0.36), 10:0 3OH(%4.84), 12:0 (%5.11), unknown 12.484 (%0.62), 11:0 ISO 3OH (%1.17), 12:0 2OH (%2.74), 12:1 3OH (%2.01), 12:0 3OH (%4.11), 14:0 (%0.32), 15:0 (%0.21), Sum In Feature 2 (%0.90), Sum In Feature 3 (%34.41), 16:0 ISO (%0.09), 16:0 (%25.30), 17:0 Cyclo (%3.01), 16:0 3OH (0.38), 18:1 w9c (%0.31), 18:1 w7c (%17.28), 18:0 (%0.84), 19:0 10 methyl (%0.54), 11 Methyl 18:1w7c (%0.63) olarak belirlenmiştir.

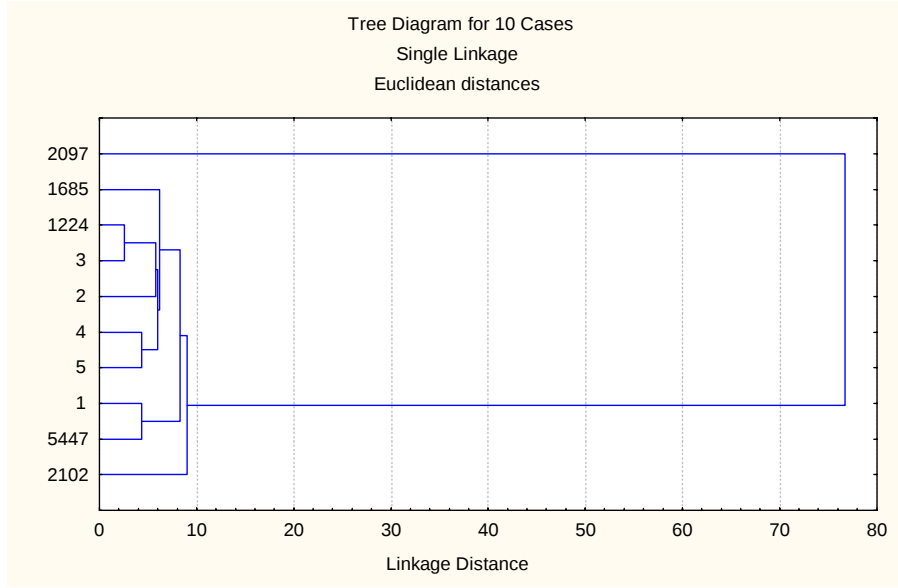
İzole edilen yağ asitleri doymuş (10:0, 12:0, 14:0, 15:0, 16:0, 18:0) doymamış (18:1 w9c, 18:1 w7c, 11 Methyl 18:1w7c), hidroksil (8:0 3OH, 10:0 3OH, 11:0 ISO 3OH, 12:0 2OH, 12:1 3OH, 12:0 3OH), cylopropane (17:0 Cyclo), sum in feauture (2,3), asit brached (19:0 10 methyl), bilinmeyen (unknown 12.484), methyl branced (16:0 ISO) olmak üzere 8 gurup olduğu saptanmıştır. Yağ asitlerinden 10:0 3OH, 12:0, 12:0 2OH, 12:0 3OH, sum in feauture 3, 16:0, 18:1 w7c yağ asitlerinin tüm izolatlarda bulunduğu belirlenmiştir.

Microbiyal Identifikasyon sistemin bilgisayar programının 3,60 (Microbial ID, NETwork, DE) ile yapılan analiz sonucu oluşan dendogramda 10 izolattan referans kültür olan *P. cichorii* bölge izolatlarından ve diğer referans kültürleri *P. viridiflava* *P. corrugata*, CFBP 5447 *P. mediterrane*, INRA 2102 *P. fluorescens*'den tamamen farklı olduğu görülmektedir. INRA 2102 *P. fluorescens* tek başına bir gurup oluşturmuştur. CFBP 5447 *P. mediterrane* ve Yum-öz1b1 izolatları bir gurup içerisinde yer almaktadır. Mt-4a2, Adu-4d1 farklı bir gurup oluşturmuştur. TET-A ve İk-İd 2-1a izolatları GSPB 1224 *P. corrugata* ile aynı gurup içerisinde yer almıştır. GSPB 1685 *P. viridiflava* tek başınabir gurup oluşturmaktadır. Elde edilen bölge izolatları da *P. viridiflava* ve *P. corrugata* akrabalık açısından birbirine yakın olurken *P. fluorescens* ve *P. mediterrane* daha uzak akraba olduğu görülmektedir. Bölge izolatları *P. corrugata*'ya yakın olurken bir tanesi *P. mediterrane*'ye daha yakın olduğu ortaya konulmuştur. İzolatlar ve referans kültürler %6 fark göz önüne alındığında 5 farklı küme oluşturmuştur (Şekil 4.14., Şekil 4.15.).

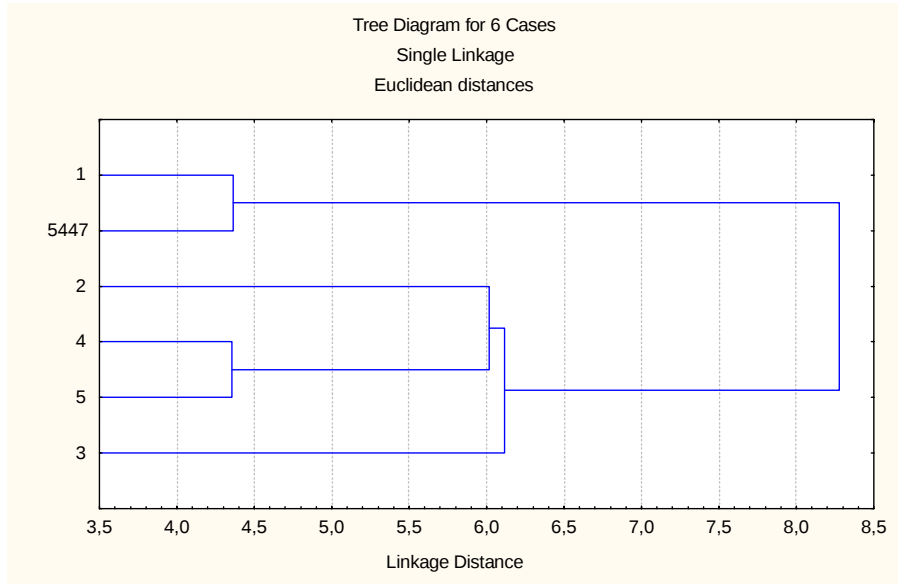
Çizelge 4.7. Yağ asit analizi sonucu izolatların yağ asitleri ve bulunma oranları (%)

Yağ Asitleri	İzolat Sayısı	Dağılım Aralığı
8:0 3OH	2	0.31-0.50
10:0	2	0.36-0.39
10:0 3OH	10	3.16-6.87
12:0	10	2.80-6.34
unknown12.484	2	0.20-1.04
11:0 ISO 3OH	1	1.17
12:0 2OH	10	2.07-4.49
12:1 3OH	4	0.42-2.72
12:0 3OH	10	3.91-4.46
14:0	3	0.26-0.42
15:0	2	0.21
Sum In Feature 2	3	0.39-1.14
16:0 ISO	1	0.09
Sum In Feature 3	10	26.33-39.18
16:0	10	23.70-32.14
17:0 Cyclo	6	0.33-8.32
16:0 3OH	2	0.38-0.39
18:1 w9c	1	0.31
18:1 w7c	10	13.77-23.34
18:0	5	0.56-1.14
19:0 10 methyl	2	0.54-0.55
11 Methyl 18;1w7c	1	0.63

Sum In Feature 2 (14:0 3OH veya 16:1 ISO I), Sum In Feature 3 (14:0 3 OH veya 15:0 ISO 2OH),



Şekil 4.14. Referans kültürler ve bölge izolatlarının yağ asit profillerine göre dendogramları (GSPB 1224 *P. corrugata*, GSPB 1685 *P. viridiflava*, GSPB 2907 *P. cichorii*, CFBP 5447 *P. mediterrane*, INRA 2102 *P. fluorescens*, 1: Yum-öz1b1, 2: TET-A, 3: İk-İd 2-1a, 4: Mt-4a2, 5: Adu-4d1)



Şekil 4.15. Referans kültür ve bölge izolatlarının yağ asit profillerine göre dendogramları (CFBP 5447 *P. mediterrane*, 1: Yum-öz1b1, 2: TET-A, 3: İk-İd 2-1a, 4: Mt-4a2, 5: Adu-4d1)

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Doğu Akdeniz Bölgesinde İçel Adana'nın örtü altı domates yetiştiriciliği yapılan seralardan gövde öz nekrozuna neden olan *Pseudomonas* türlerinin ve karşılaştırma kültürlerinin morfolojik, fizyolojik biyokimyasal, serolojik ve moleküler yöntemlerle tanınması ve karakterizasyonu üzerine yapılan çalışmada elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

İçel'in Tarsus, Erdemli ve Kocahasanlı ilçelerinden Adana'nın Ceyhan ve Yumurtalık ilçelerinde elde edilen 16 izolatın 5 tanesi değerlendirmeye alınmıştır. Yum-öz1b1 izolatına uygulanan testlerden levan, oksidaz, patetes pektolitik aktivitesi, arginin ve tütün HR testlerinde GSPB (1224) *P.corugata*' ya benzemektedir. Fakat diğer yapılan klasik testlerden nitratin nitrite indirgemesinde referans kültürden farklılık göstermiştir. Ayrıca yapılan ELISA testi farklı olduğu gözlenirken, yağ asit analizi sonucunda CFBP 5447 *P. mediterrane*'ye yakın olduğu gözlenmiştir.

İk-id2-1a izolatına uygulanan testlerden levan, oksidaz, patetes pektolitik aktivitesi, arginin ve tütün HR testlerinde GSPB (2907) *P. cichorii*'ye benzemektedir. Ancak jelatin eritme yeteneği ve karbon kaynaklarından sukroz, sorbitol ve trehaloz testlerinde farklılık gözlenmektedir. Ve ELISA ile yağ asit analizinde bölge izolatının referans kültürden farklı olduğu gözlenmiştir.

Diğer bölge izolatlarımız TET-A, Adu-4d1 ve Mt-4a2; GSPB (2907) *P. cichorii*, GSPB (1224) *P.corugata* ve GSPB (1685) *P. viridiflava*' ya benzemediği yapılan testlerle ortaya konulmuştur.

Yum-öz1b1, TET-A, İk-id2-1a, Adu-4d1 ve Mt-4a2 izolatları GSPB (2907) *P. cichorii*, GSPB (1224) *P.corugata* ve GSPB (1685) *P. viridiflava* referans kültürlerinden farklı olduğu yapılan testlerle tespit edilmiştir. Bu kullanılan referans kültürlerinden farklı referans kültürleriyle ve moleküler tanı teknikleri ile tanıya gidilebilir. Diğer referans kültürlerine de benzemiyorsa yeni bir tür olarak isimlendirilebilir.

KAYNAKLAR

- ALIPPI, A. M. and WOLCAN, S., 1999. First report of bacterial leaf spot of basil caused by *Pseudomonas viridiflava* in Argentina. Plant Disease 83(9): 876.
- ALIPPI, A. M., DAL BO, E., RONCA, L., B., LOPEZ, M. V., LOPEZ, A. C. and AGUILAR, OM. 2003. Pseudomonas populations causing pith necrosis of tomato and peper in Argentina are higly diverse. Pathology 52:287-302
- ALIVIZATOS, A. S., 1984. Aetiology of Tomato Pith Necrosis in Greece. Proceedings of the Second Working Group *Pseudomonas syringae* Patovars. Athens, Greece. Hellenic Phytopathological Society. 55-57.
- AYSAN, Y. ve ÇINAR, Ö. , 1995. Doğu Akdeniz Bölgesi Domates Seralarında Yumuşak Çürüklük *Erwinia* Türleri Tespiti VII. Türkiye Fitopatoloji Kongresi 26-29 Eylül Adana, 426-428.
- AYSAN, Y., 2001. Bacterial Stem Necrosis of Tomato in the Greenhouse in the Eastern Mediterranean Region of Turkey. 11th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union and 3rd congress of the Sociedade Portuguesa de Fitopatologia Evora-Portugal 301-303.
- AYSAN, Y. ve ÇINAR, Ö., 2001. Doğu Akdeniz Bölgesi Domates Seralarında Bakteriyel Gövde Nekrozu Hastalığının Yaygınlığı ve Bu seralarda Yapılan Gözlemler. Türkiye IX. Fitopatoloji Kongresi Bildiri Özetleri. Tekirdağ S:3
- AYSAN, Y., YILDIZ (YONUCU), N., ÜLKE, G., ÇINAR, Ö., YÜCEL, F. ve YILDIZ (ÇETİNKAYA), R., 2002. Doğu Akdeniz Bölgesi Domates Seralarında Gövde Nekrozuna Neden Olan Bakteriyel Hastalık Etmenlerinin Saptanması, Epidemiyolojileri ve Entegre Mücadelesi Üzerine Araştırmalara. TARP-2364 nolu Projenin Sonuç Raporu. 126 s.
- AYSAN, Y. ve ÇINAR, Ö., 2003. Domateslerde Gövde Nekrozu Hastalığı. Ç. Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi 18 (1) 73-80.
- AYSAN, Y., YILDIZ, N. ve YÜCEL, F., 2004. Idendication of *Pseudomonas viridiflava* on tomato by traditional methods and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. Phytoparasitica 32 (2) 146-153.

- BASIM, E. ve BASIM, H., 2004. Multiplex-Bio PCR ile domates bakteriyel patojenlerinin moleküler tanısı. Türkiye I Bitki Koruma Kongresi Bildirileri S:144.
- BASIM, H., BASIM, E., YILMAZ, S. ve ILKUCAN, M., 2005. First report of pith necrosis oftomato caused by *Pseudomonas mediterranea* in Turkey. Plant Pathology 54:240.
- BAŞ, B. ve ÇINAR, Ö., 1995. Domates Öz Nekrozu Etmeni *Pseudomonas corrugata* (Scarlett etol)'nın Tanısı. VII. Türkiye Fitopatoloji Kongresi 26-29 Eylül Adana, 392-421.
- BOGETZEVSKA, N., ILIEVA, E. and SOTIROVA, V., 1998. Pith necrosis greenhouse tomato caused by *Pseudomonas viridiflava* in Bulgaria. Maritza Institute for Vegetable Crobs 32 Brezovsko Shosse Str. Plovdiv 4003, Bulgaria.
- CATARA, V., SUTRA, L., MORINEAU, A., ACHOUAK, W., CHRISTEN, R. and GARDAN, L., 2002. Phenotypic and genomic evidence for the revision of *Pseudomonas corrugata* and proposal of *Pseudomonas mediterranea* sp. nov. Internatinal Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 52:1749-1758.
- CLARK, R. G. and WATSON, D. R. W., 1986. New Plant Disease Record in New Zealand : Tomato Pith Necrosis Caused by *Pseudomonas corrugata*. New Zeal. J. Agric. Res. 29:105-109.
- COLN, J. E., 1996. Identification and caracterization of *Pseudomonas viridiflava* (Burkholder) Dawson, isolated from greasy stem cankers of wilted tomato plants in Moracco. Parasitica 42 : 93-95.
- ÇINAR, Ö., 1977. Akdeniz Bölgesi Domateslerinde Bakteriyel Bir Hastalık. Bitki 4(2):282-288.
- ÇINAR, Ö ve AYSAN, Y., 1995. Doğu Akdeniz Bölgesi Domates Seralarında Yumuşak Çürüklük Etmeni *Erwinia Türlerinin* Tespiti. 426-428. 7. Türkiye Fitopatoloji Kongresi, 26-29 Eylül, Adana.

- DE BOER, S. H. and SASSER, M., 1986. Differentiation of *Erwinia caratovara* ssp *caratovara* and *Erwinia caratovara* ssp *atroceptica* on the Basis of Cellular Fatty Acid Composition. Canadian Journal of Microbiology 32: 796-800.
- DEMİR, G., 1990. The occurrence of *Pseudomonas corrugata* on tomatoes in Turkey. Journal of Turkish Phytopathology, 19: 63-70.
- DEMİR, G., and GÜNDOĞDU, M., 1988. The Bacterial disease of tomato caused by *Pseudomonas cichorii* in Turkey. 5th Turkish Phytopathological Congress, October 18-21, Antalya.
- DHANVANTARI, B. N., 1990. Stem necrosis of greenhouse tomato caused by novel *Pseudomonas* sp. Plant Disease 74 : 124-127.
- FAHY, P. C., and PERSLEY .G. J., 1983 Plant Bacterial Diseases a Diagnostic guide Academic Press. LONDON, 110-11.
- FIORI, di M., 1992. A New Bacterial Disease of Chrysanthemum : a Stem Rot by *Pseudomonas corrugata* Roberts et Scarlett. Phytopath. Mediterranean 31 . 110-114.
- FIORI, di M., CORDA, P. and CARTA, C., 1983 (a). *Pseudomonas corrugata* Roberts and Scarlett Agente Della 'Necrosi de Midollo' del Pomodoro (*Lycopersicon esculantum* Mill). Rivista de Patologica Vegetale 19:21-27.
- FIORI, di M., CARTA, C. and FRANCESCHINI, A., 1983 (b). II Saggio Immunoenzimatico (ELISA) per la Diagnosi Precoce e Rapida Della Necrosi del Midollo di Pomodoro da *Pseudomonas corrugata* Roberts et Scarlett. Phytopath. Medit. 22 : 22-26.
- FIORI, M., CARTA, C. and FRANCESCHINI, A., 1984. Soft rot of tomatoes due to *Pseudomonas viridiflava* (Burkholder) Dawson. Review of Plant Pathology. 63:2502
- JANKE, A. and DICKSHEIT, R., 1971. Handbuch Mikrobiologischer Laboratoriumstechnik Verlag Thedor Steinkopff Dresden, 391.
- JACOB, C. and MARTINS, J. M. S., 1990. Species Diversity and Pathological Specialization of Tomato Pith Necrosis Bacteria. 995-1000. Proceedings of

the 7th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria, 11-16 June 1989, Budapest, Hungary.

JACOB, C. 1991 On the aetiolojgy of pith necrosis of greenhouse grown tomato plants in Portugal. Seventh Congres of the Mediterran. Phytopat.Union. 119.

JONES, J.B., JONES, J.P., STALL, R.E., and MILLER, J.W., 1983.Occurence of stem necrosis on field grown tomatoes incited by *Pseudomonas corrugata* in Florida. Plant Disease 67, 425-426.

KÖŞKER, Ö., 1971 Genel Mikrobiyoloji. Ankara Üniversitesi yayınları, s. 43-62, 67-88

LAI, M., OPGENORTH, D. C. and WHITE, J. B., 1983. Occurence of *Pseudomonas corrugata* on tomato in California. Plant Disease 67:110-112.

LELLIOT, R. A., and STEAD, D. E., 1987. Media and Methods. In: Methods for the Diagnosis of Bacterial Diseases of Plants. Oxford London Edinburg. 216

LUKEZIC, F. L., LEVINE, R. G., MACNAB, A. A., 1983. *Pseudomonas viridiflava* associated with stem necrosis of mature tomato plants. Phytopathology 73 . 370. Martins, 1989;

NATSUAKI, K.T., and KAGIWATA, T., 1986. Occurence of *Pseudomonas corruagata* on field-grown tomatoes in Japan. Journal of Agricultural Science Tokyo Nogyo Daigaku (Japan). (Feb 1986). v. 30 (3) p. 196-203.

NETO, J. R., MALAVOLTA, V.A., RAMOS, R.S., and SİNİGAGLİA, C., 1990. Summa Phytopathologica, Vol. 16. 279-284.

SAYGILI, H., ŞAHİN, F., AYSAN, Y. and MIRİK, M., 2004. New symptoms of tomato soft rot diseases in Turkey. Proceedings of the 1st International Symposium on Tomato Diseases and 19th Annual Tomato Disease Workshop, Orlando, Florida,USA, June 21-24,2004.

SCARLETT, C. A., FLETCHER, J. T., ROBERTS P. and LELLIOTT, R. A., 1978. Tomato Pith Necrosis Caused by *Pseudomonas corrugata*. Annalls App. Biol. 88:105-114.

- SCORTICHINI, M., 1992. Consideration on the appearance of *Pseudomonas corrugata* as a new plant pathogen. Plant Pathogenic Bacteria, Versailles (France), June 9-12, Ed: INRA Paris 1994 (Les Colloques, no 66), 149-154.
- SKOUDRIDAKIS, M., 1986. Problemes des maladies bacteriennes en cultures maraicheres protees en Crete. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 16: 437-439.
- SOLAİMAN, D. K. Y., CATARA, V., GRECO, S., 2005. Poly(hydroxyalkanoate) synthase genotype and PHA production of *Pseudomonas corrugata* and *P. mediterranea*. Ind Microbiol Biotechnol 32:75-82
- SUTRA, L., SIVERIO, F., LOPEZ, M. M., HUNAULT, G., BOLLET, C. and GARDAN, L., 1997. Taxonomy of *Pseudomonas* strains isolated from tomato pith necrosis . emended description of *Pseudomonas corrugata* and proposal of three unmaned Fluorescent *Pseudomonas* Genomospecies. International Journal of Systematic Bacteriology. 47 : 1020-1033.
- ŞAHİN, F., SAYGILI, H., AYSAN, Y. and MIRİK, M., 2004. The first observation of pith necrosis on tomato caused by some *Pseudomonas* species in Turkey. Proceedings of the 1st International Symposium on Tomato Diseases and 19th Annual Tomato Disease Workshop, Orlando, Florida, USA, June 21-24, 2004.
- TOGNONI, F., 1990. Effects of stressful and unstressful low temperature on vegetable crops : morphological and physiological aspects. Acta Horticulture 287 . 67-76.
- TOKGÖNÜL, S., 1995. Akdeniz Bölgesinde örtü altında yetiştirilen domateslerde sorun olan bakteriyel hastalıklar. 402-406. 7. Türkiye Fitopatoloji Kongresi, 26-29 Eylül 1995, Adana.
- ÜSTÜN, N. 2000. Ege Bölgesi domates Seralarında Öz Nekrozu Hastalığına Neden Olan Bakteriyel Etmenler Üzerinde Araştırmalar. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi. Bornova, İZMİR. 151 sayfa.
- ÜSTÜN, N. ve SAYGILI, H., 2000. The effect of N, K, high relative humidity and low night temperature on tomato pith necrosis incited by *Pseudomonas*

cichorii, *Pseudomonas viridiflava* and *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. Phtopathology 90 (6) 79.

ÜSTÜN, N. and SAYGILI, H., 2001. Pith Necrosis on Greenhouse Tomatoes in Aegean Region of Turkey. 11th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union and 3rd Congress of the Sociedade Portuguesa de Fitopatologia Evora-Portugal 70-73.

VUNAKIS, H. V., 1980. Radioimmunassay: An overview. In : (Engvall, E.: Enzyme immunassay ELISA and EMIT Methods in Enzymology), Academic Press , New York, vol 70 , s.201-209, s.419-439.

WIELKE, J. P., DYE, D. W. and WATSON, D. R. W., 1973. Further host of *Pseudomonas viridiflava*. New Zealand Journal Agricultural Research 16 : 315-323.

WIELKE, J. P. and DYE D. W., 1974. *Pseudomonas cichorii* causing tomato and celery diseases in New Zealand. New Zealand Journal Agricultural Research 17 : 123-130.

ZUTRA, D. and KRITZMAN, G., 1983. New Bacterial Diseases in Israel. Phytoparasitica 11 : 3-4.

ÖZGEÇMİŞ

1978’de Kadirli\Osmaniye’de doğdu ilk ve orta öğretimini Kadirli’de tamamladıktan sonra 1997 yılında Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümünü kazandı. 2001 yılın da aynı bölümden mezun oldu ve aynı yıl Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü’nde yüksek lisansa başladı.