

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

**KASAVA (*Manihot esculenta* C.) BAKTERİYEL YANIKLIK HASTALIK
ETMENİ *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*' İN REAL-TIME PCR İLE
TANISI, TESPİTİ VE PULSED-FIELD JEL ELEKTROFOREZİS İLE
MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONUNUN YAPILMASI**

Muntala ABDULAI

**DOKTORA TEZİ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI**

2017

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

**KASAVA (*Manihot esculenta* C.) BAKTERİYEL YANIKLIK HASTALIK
ETMENİ *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*' İN REAL-TIME PCR İLE
TANISI, TESPİTİ VE PULSED-FIELD JEL ELEKTROFOREZİS İLE
MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONUNUN YAPILMASI**

Muntala ABDULAI

**DOKTORA TEZİ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI**

**Bu Tez Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Tarafından
FDK-2016-1891 No'lu Projeye Desteklenmiştir**

2017

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KASAVA (*Manihot esculenta* C.) BAKTERİYEL YANIKLIK HASTALIK
ETMENİ *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*' İN REAL-TIME PCR İLE
TANISI, TESPİTİ VE PULSED-FIELD JEL ELEKTROFOREZİS İLE
MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU**

Muntala ABDULAI

**DOKTORA TEZİ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI**

Bu tez ../../2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.

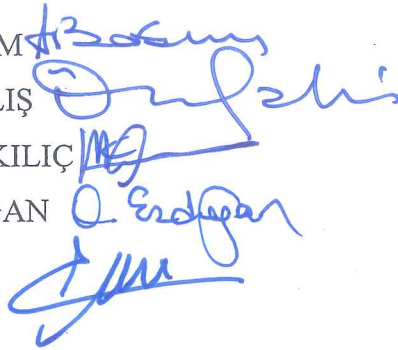
Prof. Dr. Hüseyin BASIM

Yrd. Doç. Dr. Özer ÇALIŞ

Doç. Dr. Mehmet Akif KILIÇ

Doç. Dr. Oktay ERDOĞAN

Doç. Dr. Evrim ARICI



ÖZET

KASAVA (*Manihot esculenta* C.) BAKTERİYEL YANIKLIK HASTALIK ETMENİ *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*' İN REAL-TIME PCR İLE TANISI, TESPİTİ VE PULSED-FIELD JEL ELEKTROFOREZİS İLE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

Muntala ABDULAI

Doktora Tezi, Bitki Koruma Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Hüseyin BASIM

Haziran 2017, 75 Sayfa

Kasava (*Manihot esculenta* Crantz) Gana' da önemli bir kültür bitkisidir. Bu çalışmada, Gana'nın 8 farklı bölgesinden toplanan, Kasava Yanıklık Hastalığı belirtileri gösteren örnekler izole edilmiş ve besi ortamında- Nutrient Agar (NA, Acumedia, USA) ve *X. axonopodis* pv. *manihotis* (*Xam*) yarı seçici ortam, Cefazolin Trehalose Agar (CTA) üzerinde geliştirilmiştir.

İzolatların duyarlı kasava Esam çeşidindeki patojenisite test sonucunda, izolatların (toplam 32 adet) hepsi *Xam* belirtileri göstermiş ve inoküle edilen kasava bitkilerinden izole edilerek Koch postulatları tamamlanmıştır.

Klasik PCR' da, *Xanthomonas* spesifik primer, RST2/RST3 ve *Xam* spesifik Değişken Numara Tandem Tekrarlama (VNTRs) lokus primeri, XaG1_67F/R, farklı bitki patojeni bakterilerin genomlarından hiçbir amplifikasyon tespit edilmemesine rağmen, test edilen tüm Gana ve referans *Xam* strainlerinden 840 ve 446 ba'lık amplifikasyonlar elde edilmiştir. Ortaya çıkan PCR ürünleri, GenBank nükleotit veri tabanından alınan *Xam* strainleri ile %93 ile %100 arasında homoloji gösterdiği BLASTn programı kullanılarak ortaya çıkarılmıştır.

Kasava yetiştiriciliğinde önemli ürün kayıplarına sebep olan Kasava Bakteriyel Yanıklık etmeni *Xam*' in Real-Time PCR yöntemi ile kısa sürede, hassas bir şekilde tanısını yapmak amacıyla primer ve prob (LNA, Locked Nucleic Acid) setleri geliştirilmiştir. Geliştirilen primer ve prob setlerinin spesifikliği; farklı *Xam* strainleri, farklı bitki patojeni bakteriler ve kasava genomik DNA'sı kullanılarak test edilmiştir. *Xam* izolatların LNA probu kullanılarak Real-Time PCR yöntemi ile hassas ve seçici olarak tanıları ve tespitleri yapılmıştır.

PCR analiz sonuçlarına göre, Kasava Bakteriyel Yanıklığı Hastalığının Gana'daki yaygınlığı en yüksek Ashanti (%70) bölgesinde olup, Volta (%60), Brong-Ahafo (%40), Eastern (%40) ve Greater Accra (%20) şekilde sıralanmıştır.

Bu çalışmada geliştirilen yöntemin bakteriyel hücre hassasiyet sınırı *X. a.* pv. *manihotis* 1 hücre olarak tespit edilmiştir. Geliştirilen yöntemin DNA düzeyindeki hassasiyet sınırı ise, 13 pg olarak tespit edilmiştir.

Sonuç olarak, Real-Time PCR yöntemini kullanarak her birine özel primer ve prob setleri geliştirilen Kasava Bakteriyel Yanıklık Hastalığına sebep olan *X. a* pv. *manihotis*'nin hem bakteriyel hücreden hem de hastalıklı bitki dokularından hızlı (20-25 dk) ve hassas bir düzeyde tanı ve tespitlerinin yapılabileceği ortaya çıkarılmıştır.

Pulsed-Field Gel Elektroforezis (PFGE) yöntemi ile Gana'da yaygın kasava üretimi yapılan beş farklı bölgeden izole edilen *Xam* izolatları arasındaki genotipik farklılıkları az sıklıkla kesen restriksiyon enzimleri kullanılarak ortaya çıkarılmıştır.

Gana'dan toplanan 32 izolat arasındaki genetik farklılıklar PFGE tarafından *SpeI* enzimi kullanılarak belirlenmiştir. PFGE sonuçlarına göre tüm izolatların iki farklı haplotip oluşturmuştur.

ANAHTAR KELİMELER: Kasava, Kasava Bakteriyel Yanıklık Hastalığı, *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*, Real-Time PCR, Pulsed-Field Gel Elektroforezis, Tanı, Tespit

JÜRİ: Prof. Dr. Hüseyin BASIM (Danışman)
Yrd. Doç. Dr. Özer ÇALIŞ
Doç. Dr. Mehmet Akif KILIÇ
Doç. Dr. Oktay ERDOĞAN
Doç. Dr. Evrim ARICI

ABSTRACT

MOLECULAR CHARACTERIZATION, IDENTIFICATION AND DETECTION OF *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*, THE CAUSAL AGENT OF CASSAVA BACTERIAL BLIGHT DISEASE IN CASSAVA (*Manihot esculenta* C.) BY REAL - TIME PCR AND PULSED-FIELD GEL ELECTROPHORESIS

Muntala ABDULAI

PhD Dissertation in Plant Protection
Supervisor: Prof. Dr. Hüseyin BASIM
May 2017, 75 pages

Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) is one of the most important plant cultivar in Ghana. In this study, cassava samples showing symptoms of Cassava Bacterial Blight diseases were collected from eight different regions of Ghana. The putative pathogen was isolated and cultured on the *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (*Xam*) semi-selective, Cefazolin Trehalose Agar (CTA) and Nutrient Agar (NA) media.

The pathogenicity test of all the 32 isolates on the susceptible Esam cassava variety produced symptoms typical of *Xam* and was consistently re-isolated from the inoculated cassava plants and thereby satisfying the Koch's postulates.

The classical PCR was conducted using *Xanthomonas* genus specific primer RST2/RST3 and *Xam* specific Variable Number Tandem Repeat (VNTRs) locus primer, XaG1_67F/R, which yielded 840 and 446 bp amplification products, respectively. The resulting PCR products were sequenced and analyzed using a BLASTn program, which revealed homology between 93 to 100% with several other *Xam* strains retrieved from the GenBank nucleotide database.

Xanthomonas axonopodis pv. *manihotis* causing serious yield loss on cassava cultivation has been detected in a short time with a Real-Time PCR method, using the developed probe (LNA, Locked Nucleic Acid) and primer sets. The specificity of the developed probe and primer sets in this study were tested against different *Xam* strains, various other plant pathogenic bacteria from different genus and species and cassava genomic DNA. The *Xam* isolates were sensitively and selectively detected by Real-Time PCR using LNA probes.

The results of the PCR analysis showed that Ashanti region had the highest incidence of CBB, which recorded 70%, followed by Volta region (60%); Brong Ahafo region (40%); Eastern region (40%) and Greater Accra region (20%).

The developed method in this study was used for the detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* from cell suspension, which showed sensitivity limit of 1 cells, whereas, the sensitivity of the detection limit of the genomic DNA in picogram (pg) of the bacterial was also found to be 13 pg.

In conclusion, Real-Time PCR method using specific primer and probe sets detected *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* causing Cassava Bacterial Blight disease from both bacterial cell and diseased cassava plant tissue. The developed method was very quick and sensitive for the identification and detection of this pathogen within relatively short time (20-25 min).

The genotypic differences between the *Xam* isolates isolated from the five most cassava producing regions of Ghana were examined by Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) after digesting the genome with the rare-cutting restriction enzymes.

The genetic differences between the 32 isolates collected from Ghana were determined by PFGE using *SpeI* enzyme. All the isolates were grouped into two different haplotypes by the PFGE.

KEYWORDS: Cassava, Cassava Bacterial Blight Disease, Tomato, *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*, Real-Time PCR, Pulsed-Field Gel Electrophoresis, Identification, Detection

COMMITTEE: Prof. Dr. Hüseyin BASIM (Supervisor)
Assoc. Prof. Dr. Mehmet Akif KILIÇ
Assist. Prof. Dr. Özer ÇALIŞ
Assoc. Prof. Dr. Oktay ERDOĞAN
Assoc. Prof. Dr. Evrim ARICI

ÖNSÖZ

Bu çalışmada, kasava yetiştiriciliğinde önemli ürün kayıplarına sebep olan Kasava Bakteriyel Yanıklık etmeni, *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*'in Real-Time PCR yöntemi ile kısa sürede ve hassas bir şekilde tanısını yapmak amacıyla primer ve prob LNA (Locked Nucleic Acid) setleri geliştirilerek patojen tespit edilmiştir. Pulsed-Field Gel Elektroforezis yöntemi ile, Gana'daki farklı izolatlar arasındaki genotipik farklılıkların ortaya konmasıyla farklı *Xam* strainleri elde edilmiştir.

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

Doktora çalışmamı Türkiye'de yapmamı sağlayan Yurtdışı Türkler ve Akraba Topluluklar Başkanlığına desteklerinden dolayı, çalışmayı mali olarak destekleyen Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Proje Birimi'ne (BAPB), Akdeniz Üniversitesi Bitki Koruma Bölümü'ne, çalışmalarım boyunca bana her yönden destek olan aileme ve çalışma arkadaşlarıma tüm fedakarlıklardan dolayı teşekkürlerimi bir borç biliyorum.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
ÖNSÖZ	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL BİLGİLER ve KAYNAK TARAMALARI	6
2.1. Kasava Bitkisi Hakkında Genel Bilgi	6
2.2. <i>Xanthomonas</i> İle İlgili Kuramsal Bilgiler	8
2.3. <i>X. a. pv. manihotis</i> 'e Ait Kuramsal Bilgiler	9
2.3.1. Kasava bakteriyel yanıklığı hastalık belirtileri	10
2.3.2. <i>Xanthomonas axonopodis pv. manihotis</i> 'in yaygınlığı	12
2.3.3. <i>Xanthomonas axonopodis pv. manihotis</i> 'in konukçuları	13
2.3.4. <i>Xanthomonas axonopodis pv. manihotis</i> 'in biyolojisi ve ekolojisi	13
2.3.5. Enfeksiyon ve hastalık gelişimi	14
2.3.6. <i>Xanthomonas axonopodis pv. manihotis</i> 'in ekonomik önemi	15
2.3.7. <i>Xanthomonas axonopodis pv. manihotis</i> için tanı ve tespit teknikleri ...	16
3. MATERYAL ve METOT	20
3.1. Çalışmada Kullanılan Bakteriyel İzolatlar	20
3.2. Kasava Bitkilerinden <i>Xam</i> 'ın İzolasyonu	21
3.3. Patojenisite Testi	21
3.4. Elektron Mikroskop Analizi	22
3.5. <i>Xanthomonas axonopodis pv. manihotis</i> 'in Klasik PCR İle Tanısı	24
3.6. DNA Dizilemesi ve Filogenetik Analiz	25
3.7. Primerler ve Probların Tasarlanması	25
3.8. Real-Time PCR Optimizasyonu	26
3.9. Primerler ve Prob <i>Xanthomonas axonopodis pv. manihotis</i> Strainlerine Özgüllüğünün Belirlenmesi	26
3.10. Primerler ve Probların Saf DNA'dan Hassasiyetinin Belirlenmesi	27
3.11. Direkt Bakteriyel Hücreden Primerler ve Probların Hassasiyetinin Belirlenmesi	27
3.12. Primerler ve Probların Seçiciliğinin Belirlenmesi	27
3.13. <i>Xanthomonas axonopodis pv. manihotis</i> 'in Hastalıklı Bitki Dokularından Tespiti	28
3.14. Pulsed-Field Jel Elektroforezis	29
3.14.1. Agaroz bloklarda genomik DNA'nın hazırlanması	29
3.14.2. Restriksiyon endonükleaz kesimleri	29
3.14.3. Genomik parmak izlerinin analizi	30

4. BULGULAR.....	31
4.1. Bakterinin Kasava Bitkilerinden İzole Edilmesi.....	32
4.2. Esam Kasava Bitkilerinde <i>Xam</i> İzolatlarının Patojenisite Sonuçları.....	32
4.3. Elektron Mikroskop Analizi.....	34
4.4. <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i> 'in Klasik PCR İle Tanısı.....	34
4.5. DNA Dizilemesi ve Filogenetik Analiz	36
4.6. Real-Time PCR İle <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i> İzolatlarının Tanısı.....	38
4.7. Primerler ve Probların Saf DNA Hassasiyeti.....	41
4.8. Direkt Bakteriden Primerler ve Probların Hassasiyeti.....	42
4.9. Primerler ve Probun Seçiciliği	44
4.10. Real-Time PCR İle Hastalıklı Bitki Dokularından <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i> 'in Tespiti	46
4.11. Pulsed-Field Jel Elektrophoresis Analizi	47
5. TARTIŞMA	51
6. SONUÇ	59
7. KAYNAKLAR	61
ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

h	saat
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
°C	Santigrat Derece
cm	Santimetre
dk	dakika
g	Gram
l	Litre
m	metre
mg	Miligram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
ng	Nanogram
rpm	Dakikadaki devir sayısı
pH	Potenz Hidrojen
pg	Pikogram
s	Saniye
v	Volt

Kısaltmalar

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
AFLP	Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizimi
bç (bp)	Baz Çifti
C	Sitozin
KBYH (CBB)	Kasava Bakteriyel Yanıklık Hastalığı
CTA	Cefazolin Trehalose Agar
Ct	Eşik Döngüsü
cfu	Koloni Oluşturan Birim
cfu/ml	Mililitredeki canlı hücre sayısı
CHEF-DR.III	Sıkıştırılmış Homojen Elektrik Alanlar (Clamped Homogeneous Electric Fields)
D	<i>Dickeya</i>
ddH ₂ O	İki Kere Distile Edilmiş Saf Su
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dNTP	Deoksi Nükleotid Trifosfat
EDTA	Etilendiamintetraasetik Asit
ELISA Enzim	Bağlı İmmünosorbent Deneyi
EtBr	Etidiyum Bromür
FAO	Birleşmiş Milletler Beslenme ve Tarım Örgütü
FAM	Fluorescein Amidit
G	Guanin
GC	Guanin/Sitozin
HS	Hücre Süspansiyonu

Kb	Kilobaz
GSYİH	Kişi başına Gayri Safi Yurt İçi Hasıla
LNA	Kilitli Nükleik Asit (Locked Nucleic Acid)
LMP	Düşük Erime Noktası (Agar) (Low-Melting-Point)
NA	Nutrient Agar
NaCl	Sodyum Klorür
NBY	Nutrient Broth Yeast
NB	Nutrient Broth
NCBI	Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi
NCPPB	Ulusal Bitki Patojenik Bakteri Koleksiyonu
OD	Optik Yoğunluk
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PFGE	Pulsed-Field Jel Elektroforezis
PthB	Plasmid probu
pv.	Patovar
rep-PCR	Tekrarlı Dizi Bazlı PCR
RFLP	Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi
RNA	Ribonükleik Asit
RT-PCR	Real-Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu
subsp.	Alt Tür
SYBR	Synergy Brands
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
TAMRA	Karboksitetramethylrodamin
TAE	Tris Asetik Asit EDTA
TBE	Tris Borat EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
UV	Ultra Viyole
VNTR	Değişken sayı tandem tekrar (variable number tandem repeat)
<i>Xav</i>	<i>Xanthomonas axonopodis vesicatoria</i>
<i>Xam</i>	<i>Xanthomonas axonopodis manihotis</i>
YDCA	Yeast Dextrose Carbonate Agar
3'	DNA molekülünün 3' terminal hidroksil ucu 3'
5'	DNA molekülünün 5' terminal fosfat ucu of 5'

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.	Gana'da kasava üretim bölgeleri.....	3
Şekil 2.1.	Hasat edilmiş kasava yumruları.....	8
Şekil 2.2.	Kasava bitkilerinde tipik <i>Xam</i> belirtileri (a) Başlangıç belirtisi; (b) Köşeli yaprak lekeleri; (c) Yaprak solması (d) Yaprak yanıklığı ve eksüdat.....	12
Şekil 3.1.	Gana'nın büyük Agro-ekolojik bölgelerindeki Kasava Bakteri Yanıklık hastalıklarının coğrafik dağılımı.....	20
Şekil 3.2.	Real-Time PCR'da <i>X. a. pv. manihotis</i> 'in tanısı için kullanılan HBXamL ve HBXamR primerlerinin ve probun lokus dizisi üzerindeki bağlanma yerleri (Yeşil renk: Real-Time PCR primerlerini, Kırmızı renk: Probu temsil etmektedir).....	26
Şekil 4.1.	Kasava bitkisinde tipik CBB belirtileri (a) Başlangıç belirtisi; (b) Açılı yaprak lekeleri; (c) Yaprak yanıklığı; (d) Geriye doğru ölüm; (e) Patojenin vektörü <i>Zonocerus variegatus</i> (çekirge) zararlısı.....	32
Şekil 4.2.	(a) Nutrient Agar (NA) ve (b) Cefazolin Trehalose Agar (CTA) besiy ortamında <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i> 'in koloni gelişimi.....	33
Şekil 4.3.	Kasava Bakteriyel Yanıklık hastalığı etmeninin <i>X. a. pv. manihotis</i> 'in kasava bitkilerine inokulasyonundan bir 1 sonra yaprakta ve gövdede meydana gelen belirtiler: (a) Sağlıklı bitki (Negatif kontrol); (b) Düzensiz suya batmış açıl yaprak lekeleri (püskürtme yöntemi); (c) Köşeli noktalar ve yanıklık yaprakları (püskürtme yöntemi) (d) Düzensiz suya batmış açıl yaprak lekeleri (Enjeksiyon yöntemi); (e) Yaprak yanıklığı ve solma (Enjeksiyon yöntemi); (f) Yaprak solması ve gövdede bakteriyel eksüdatlar (Enjeksiyon yöntemi).....	33
Şekil 4.4.	<i>X. a. pv. manihotis</i> 'in SEM analiz sonuçları.....	34
Şekil 4.5. a.	<i>X. a. pv. manihotis</i> izolatlarının PCR amplifikasyonunun agaroz jeli (a) <i>Xanthomonas</i> 'a özgü primer (840 bp). 1: 100 bp marker; 2: <i>Xam</i> referans strain NCPPB 2965 3-5: Ashanti bölgesi izolatları 6-7: Volta bölgesi izolatları 8-9: Brong Ahafo bölgesi izolatları 10: Doğu bölgesi izolatları 11: Greater Accra izolatları 12: Negatif kontrol.....	35
Şekil 4.5. b.	VNTR lokus primeri (446 bp). M = 100 bp marker; 1: <i>Xam</i> referans strain, 2-16: Ashanti Bölgesi izolatları 17-21: Volta Bölgesi izolatları 22-25: Brong Ahafo Bölgesi izolatları 26-30:	

	Doğu Bölgesi izolatları 31-32: Greater Accra izolatları, Nk-Negatif kontrol.....	36
Şekil 4.6.	<i>X. a. pv. manihotis</i> filogenetik analizi.....	38
Şekil 4.7.	<i>X. a. pv. manihotis</i> izolatlarının Real-Time PCR ile tanısı.....	39
Şekil 4.8.	<i>X. a. pv. manihotis</i> izolatlarının Real-Time PCR ile tanısı.....	40
Şekil 4.9.	<i>X. a. pv. manihotis</i> izolatlarının Real-Time PCR ile tanısı.....	41
Şekil 4.10.	<i>X. a. pv. manihotis</i> 'nin tespitinde kullanılan primer ve prob setinin saf DNA'dan hassasiyeti	42
Şekil 4.11.	<i>X. a. pv. manihotis</i> bakteri hassasiyet çalışmasında NA besi ortamında stok 10^{-10} seyreltmedeki bakteri sayıları (cfu/ml).....	43
Şekil 4.12.	<i>X. a. pv. manihotis</i> 'in bakteri hassasiyet tespiti.....	44
Şekil 4.13.	<i>X. a. pv. manihotis</i> izolatlarının tespiti için tasarlanan primer ve prob setinin diğer bitki patojeni bakteri türlerine karşı spesifikliğin belirlenmesi.....	45
Şekil 4. 14.	Kasava Bakteriyel Yanıklık hastalığı etmenin <i>X. a. pv. manihotis</i> 'in kasava bitkilerine inokulasyonundan 1 ay sonra yaprakta ve gövdede meydana getirdiği belirtiler (a) Yaprak solması (b) Gövdede bakteriyel eksudatlar.....	46
Şekil 4. 15.	Tasarlanan primer ve prob seti ile <i>X. a. pv. manihotis</i> straininin enfekteli kasava bitki dokusundan tespiti.....	47
Şekil 4. 16. a.	Pulsed- Field Gel Elektroforezi ve <i>SpeI</i> ile Elde Edilen <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i> 'in farklı haplotiplerinin Genomik Profilleri. M= Chromosomal Yeast Marker, <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , 1: Ashanti Region 2/1, 2: Ashanti Region 3/1, 3: Ashanti Region 4/3, 4: Ashanti Region 5/2, 5: Ashanti Region 6/1, 6: Ashanti Region 7/2, 7: Ashanti Region 8/1, 8: Ashanti Region 10/1, 9: Ashanti Region 11/1, 10: Ashanti Region 12/1, 11: Ashanti Region 13/1, 12: Ashanti Region 14/1, 13: Ashanti Region 15/1, 14: Ashanti Region 16/1.....	49
Şekil 4. 16. b.	Pulsed- Field Gel Elektroforezi ve <i>SpeI</i> ile Elde Edilen <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i> 'in farklı haplotiplerinin Genomik Profilleri. M= Chromosomal Yeast Marker (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) 23: Eastern Region 23, 25: Greater Accra Region 13, 26: Greater Accra Region 24, 27: Volta Region 8, 28: Volta Region 13, 29: Volta Region 14, 30: Volta Region 31, 32: Referans strain (NCPB2965).....	50

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1.	Dünya’da en çok kasava üretimi yapan ülkeler.....	2
Çizelge 2.1.	<i>X. a. pv. manihotis</i> ’in bilimsel sınıflandırılması.....	10
Çizelge 3.1	Real-Time PCR’da kontrol edilen <i>X. a. pv. manihotis</i> Gana izolatları ve yabancı izolat.....	23
Çizelge 3.2.	Klasik PCR yöntemi ile <i>X. a. pv. manihotis</i> etmenin tanısı için kullanılan primerler.....	24
Çizelge 3.3.	<i>X. a. pv. manihotis</i> strainlerinin klasik PCR ile tanı ve tespitinin gerçekleştirilmesi amacıyla hazırlanan PCR programı.....	24
Çizelge 3.4.	Real-Time PCR yöntemi ile <i>X. a. pv. manihotis</i> ’in tanısı için geliştirilmiş primer seti ve prob dizileri.....	25
Çizelge 3.5.	Real-Time PCR optimizasyonu sonucunda <i>X. a. pv. manihotis</i> strainleri için oluşturulan Real-Time PCR programı.....	26
Çizelge 3.6.	Real-Time PCR’da kullanılan farklı <i>Xanthomonas</i> türleri ve diğer bitki patojeni bakteri türleri.....	28
Çizelge 4.1.	<i>Xam</i> ’ in GenBank nükleotid benzerliği.....	37
Çizelge 4.2.	Real -Time PCR ile <i>X. a. pv. manihotis</i> ’in direkt bakteriyel hücreden tespiti ve hassasiyet limitlerinin belirlenmesi.....	43
Çizelge 4.3.	Pulsed- Field Gel Elektroforezi ve <i>SpeI</i> ile elde edilen <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i> ’in farklı haplotipleri (Strain grupları).....	48

1. GİRİŞ

Kasava'nın anavatanı Brezilya'dır. Kasava *Manihot esculenta* Crantz Euphorbiaceae familyası, Crotonoideae alt familyası ve Manihotae sınıfında yer almaktadır. Manihot cinsi 100 şifalı bitki, çalı ve ağacı içermektedir (Rogers ve Fleming 1973; Bailey 1976). Kasava, anavatanı olan Brezilya'dan Afrika'nın Uzak Doğu ve Karayip Adaları gibi tropikal alanlarına 16. ve 17. yüzyıllarda Portekizliler tarafından getirilmiştir (Jones 1959).

Kasava bitkisinin yenilebilen kısmı tebeşir-beyazdan, sarımtırak renge değişen renklere olmaktadır. Bitkinin kökleri nişasta bakımından zengindir ve az miktarda C vitamini, fosfor ve kalsiyum içermektedir. Proteinler ve diğer besin maddeleri yok sayılabilecek kadar az miktarlarda mevcuttur. Bununla birlikte, kasavanın yaprakları zengin bir protein kaynağıdır, ancak bazı amino asitlece yetersizdir. Kasava, ana besin maddesi olarak mısırın tercih edildiği ve kuraklığın bir problem olduğu Doğu ve Güney Afrika'da tarihsel olarak önemli bir açlığı önlemede rolü oynamaktadır.

Kasava birçok tropik ülkede çiftlik hayvanlarının beslenmesinde ve balık yemi olarak kullanılmaktadır (Lam 2012; Anonim 2013). Örneğin Latin Amerika'da kasava tabanlı hayvan beslenmesi çok yaygındır ve Avrupa Birliği'nde yem için kullanılan tahılların fiyatı yüksek olduğu zaman çiftlik hayvanlarının beslenmesinde yüksek miktarlarda kuru kasava kullanılmaktadır (Lam 2012; Anonim 2013).

Kasava, tropik ülkelerde şu anda en çok kültürü yapılan bitkidir. Yumrulu kökü Afrika, Latin Amerika ve Asya'da 500 milyondan fazla insanın ana besin kaynağını oluşturmaktadır. Yaprakları da aynı zamanda Afrika ve Asya'nın bazı bölümlerinde insanlar tarafından tüketilmektedir (Reichel-Dolmatoff 1965; Lathrap 1973). Kasava yetiştiriciliği şeker kamışından sonra ikinci sırada yer almakta ve optimum yetiştirme şartlarında hem mısır hem de sorgumdan daha fazla karbonhidrat içermektedir (Loomis ve Gerakis 1975; El-Sharkawy 1993).

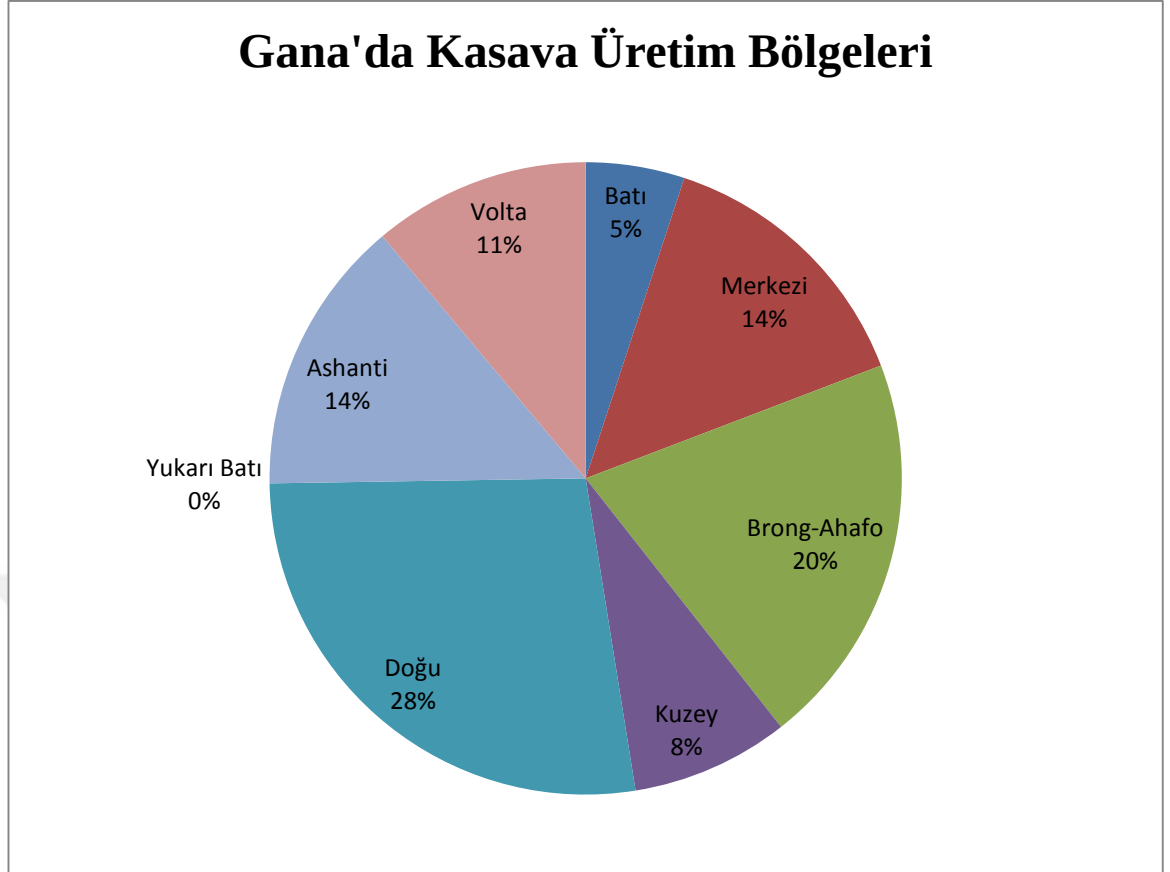
Dünya'da 2014 yılında 268 milyon ton kasava üretimi gerçekleşirken, 2013 yılında en büyük kasava üreticisi 47 milyon ton ile Nijerya'dır. Tayland, en büyük ikinci üretici olup (30 milyon ton), Endonezya (23 milyon ton) ve Brezilya (21 milyon ton), kasava üretiminde Dünya'da üçüncü ve dördüncü sıralarda yer almaktadır (Anonim 2015; Anonim 2016). Gana, kasava üretiminde Dünya'nın en büyük altıncı üreticisidir ve Afrika'da üçüncü sırada yer almaktadır (Çizelge 1.1). Yerel çiftçilerin yaklaşık tahminen %70'i, her yıl 14 milyon tondan fazla kasava üretimi yapmaktadırlar. (Anonim 2015) Gana'nın kasava üretimi 2011 yılında 14,270,000 milyon ton iken, 2012'de 14,547,000 milyon tona yükselmiş ve 2013'te 14,990,000 milyon tona çıkmıştır. Dünya'daki en büyük kasava üreten ülkeler Çizelge 1.1'de gösterilmektedir.

Çizelge 1.1. Dünya’da en çok kasava üretimi yapan ülkeler (Anonim 2016)

Sıralama	Ülke	Kasavanın Üretim Miktarı
1	Nijerya	47,406,770
2	Tayland	30.227,542
3	Endonezya	23,936,920
4	Brezilya	21,484,218
5	Angora	16,411,674
6	Gana	15,989,940
7	Kongo Demokratik Cumhuriyeti	14,611,911
8	Viet Nam	9,757,681
9	Kamboçya	7,572,344
10	Hindistan	7,236,600

Kasava, Gana'nın tüm bölgelerinde yetiştirilmekle birlikte özellikle Orta, Doğu, Brong Ahafo, Volta ve Ashanti bölgelerinde bol miktarda bulunmaktadır (Şekil 1.1). Gana, Gıda ve Tarım Bakanlığı istatistiklerine göre, kasava üretimi 2007 yılından 2011 yılına kadar tüm tarım üretiminin %40'ına yükselmiştir (MOFA 2012). Bunun nedeni, söz konusu dönemler arasında hektar başına ortalama verimin %26 artış göstererek hektar başına 12,66 den 16,17 tona çıkmasıdır. Ayrıca, o dönemde, tarımı yapılan arazi miktarı da %11 artış göstermiştir (Şekil 1.1).

Kasava'nın ana dikim sezonu Mayıs ile Eylül ayları arasındaki yağışlı sezon süresince. Kasava, dikimden yaklaşık 12 ay sonra hasat edilir, böylece ilk hasat Mart-Ekim ayları arasında herhangi bir zamanda gerçekleşebilir. Hasat edilen kasavanın büyük oranı, dikim başlamadan önceki yağışlı sezonun başlangıcında (Mayıs ile Temmuz ayları arasında) piyasaya sürülür. Kurak sezon boyunca hasat (Kasım - Mart) yaygın olmayıp, küçük miktarlardadır. Gana'nın kuzeydoğu ve kuzeybatı bölgeleri hariç, kasava, sekiz bölgenin tamamında doğu ve orta bölgelerde yüksek oranı ile üretilmektedir.



Şekil 1.1. Gana'da kasava üretim bölgeleri (MOFA 2012)

Kasava Bakteriyel Yanıklık Hastalığı (CBB) etmeni ilk kez 1912 yılında Brezilya da tanımlanmış (Bondar 1912). 1970' yıllarda en çok Orta ve Güney Amerika, Karayipler, Afrika ve Asya'da bulunmuştur (Bradbury 1986). CBB Afrika'da kasava'nın en önemli bakteriyel hastalığı olup, ikinci sırada Kasava Mozaik Virüsü gelmektedir (CIAT 1996). CBB'ye sebep olan etmen *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*'dir (Berthet ve Bondar 1915). CBB belirtileri kurak sezon sonunda ilk yağmurlarla birlikte ortaya çıkmakta ve yağmurlu sezonda maksimum seviyeye ulaşmaktadır. Hastalıklı bitkilerde tipik olarak ıslak köşeli yaprak lekeleri, yaprak yanıklığı ve yaprak kayıpları görülmekte ve sistemik belirtiler gövde üzerinde kanser oluşumuyla sonlanmaktadır. Ciddi salgınlarda CBB geriye doğru ölümlere de neden olmaktadır. Patojen, bitkiyi sistemik olarak ele geçirmekte gövdeye ve tohumlara girmekte, fakat genellikle başlangıçta belirtiler görülmemektedir. Bakteri, daha sonra tohum içinde belirli süre canlı kalabilmektedir (Lozano ve Nolt 1989). Bu nedenle de hastalığın tanı ve tespiti büyük önem taşımaktadır.

Bakteriyel patojenlerin tanı ve tespitinde geçmişten günümüze kadar geliştirilen birçok yöntem bulunmaktadır. Bunlar; hastalıklı bitki materyallerinden besiy ortamlarına izolasyonu, fiderde belirti izleme yöntemi, test bitkilerine inokulasyon yöntemi, bakteriyofaj yöntemi, serolojik yöntemler, biyokimyasal yöntemler, mikroorganizmaların yağ asidi kompozisyonunun belirlenmesi ve genetik farklılıkların esas alındığı modern biyoteknolojik yöntemlerinden olan klasik PCR (Polimeraz Zincir

Reaksiyonu) ve Real-Time PCR (Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu) yöntemleridir.

Real-Time PCR ürünlerini kalitatif ve kantitatif analizlerinde, diziye özgün olmayan floresan boyalardan ya da diziye özgün problemlerden yararlanılmaktadır. Gelişen teknoloji ile Real-Time PCR farklı prob sistemleri de geliştirilmiş ve kullanılmaya başlanmıştır. Günümüzde kullanılan en gelişmiş en ileri prob sistemlerinden biri LNA (Locked Nucleic Acid) adı verilen sistemdir. Bu sistemde prob üzerinde yer alan DNA analogu monomerlerde bulunan şeker halkaları metilen bir köprü ile bağlanmıştır. Bu sayede monomerlerin her biri spesifik bağlanma için en uygun konformasyon olan N konformasyonunda sabit kalabilmektedirler. Bu durum spesifik olmayan bağlanmalara izin vermemekte, problemlerin spesifik bölgelere olan bağlanma eğilimini arttırmakta ve gerçekleşen spesifik bağlanmaların daha kararlı olmasını sağlamaktadır. Bu tip problemlere ait diziler, diğer çalışmalarda kullanılan Real-Time PCR problemlerin dizilerinden uzunluk olarak daha kısadır. Bu sayede prob dizisinin kendi içinde bağlanması olasılığını ortadan kaldırmakta ve amplifikasyon işleminin daha kısa sürede gerçekleşmesine imkan sağlamaktadır. LNA (Locked Nucleic Acid) probun kimyasal yapısı Real-Time PCR yönteminin daha spesifik olarak çalışmasını ve alınan sonuçların daha hızlı ve güvenilir olmasını sağlamaktadır (Anonim 2014a).

PFGE moleküler markırlar tarafından tespit edilememiş çeşitliliğin ortaya çıkarılmasına imkân sağlamaktadır. PFGE *SpeI*, *NotI*, *AscI* ve/veya *ApaI* gibi az sıklıkla kesen (Rare-Cutting) enzimler kullanır, bu enzimler 30-600 kb arasında değişen genomik DNA'yı 6-25 kb lik parçalar halinde keser. PFGE kesim bölgesindeki nokta mutasyonları, eklenmeleri, delesyonları ve DNA bant paternlerindeki varyasyonlarla sonuçlanan yeniden düzenleme gibi genetik değişimleri tespit etmeye imkân sağlar ve farklı strainleri ayırmada kullanılabilir. Her ne kadar PFGE etkili bir ayırma tekniği olsa da, özel ekipmanlara gereksinim duymakta olup hızlı bir metod değildir (Murphy vd 2007). Ancak bakteriyel popülasyonların ayrılmasına izin veren etkili bir metottur. PFGE tekniği, birçok bakteriyel genom organizasyonunun çoklu kromozomunu açığa çıkarmak veya farklı konukçulardaki büyük plazmidlerin varlığının ayırımında kullanılmaktadır. PFGE içerisinde az sıklıkla kesim yapan (Rare-Cutting) enzimleri kullanarak tür teşhisinde ve aynı tür içerisinde strain sınıflandırmasına izin vermektedir. Ayrıca bu yöntem, genom büyüklüğünün tahmininde ve genom haritalaması için kullanışlı data sağlamaktadır (Smith ve Condemine 1990). Her ne kadar PFGE metodu, bakteriyel genom büyüklüğünü belirlemede ve bütün kromozom değişimlerini tespit etmekte kullanılsa da (Lucier ve Brubaker 1992, Romalde vd 1991), bu yöntem *X. a. pv. manihotis*' in strainlerinin genetik ilişkisini ve çeşitliliğini belirlemede kullanılmamıştır. Bu yöntem aynı zamanda tür içi genetik varyasyonun kantitatif değerlendirilmesi ve verilen türün bireysel izolatlarının restriksiyon enzimi ile elde edilen büyük fragmentlerinin karşılaştırılması ile belirlenmesine imkan sağlamaktadır (Arbeit vd 1990).

PFGE ve az sıklıkla kesen restriksiyon endonükleaz enzimleri DNA düzeyinde çeşitli bakteriyel strainleri karakterize etmede (Grothues ve Tümmler 1991), genom büyüklüğü hakkında önemli bilgilerin elde edilmesini ve bakteriyel kromozomların fiziksel haritalarının oluşturulmasını (Kohara vd 1987, Bancroft vd 1989, Chang ve Taylor 1990, Chen ve Widger 1993) sağlamaktadır. Fiziksel haritalar, klonlanmış

genlerin lokalizasyonunda, evrimsel çalışmalarda küçük çaplı haritalama çalışmalarında (MacDougall ve Giron 1995), virulens faktörleri kodlayan lokusların genomik dağılımlarını analiz etmede faydalı olup genomik çeşitliliği ve strainlerin karşılaştırmalı haritalanması (Holloway vd 1994) hakkında bilgi vermektedir. PFGE yöntemi kullanılarak *X. a. pv. vesicatoria*, *Erwinia amylovora* ve *Pseudomonas syringae* patojenlerinin genom analizleri yapılabilmektedir (Basım 1998), fakat bu çalışmada kullanılan *X. a. pv. manihotis* (*Xam*) ile ilgili herhangi bir PFGE çalışması bulunmamaktadır.

Bu çalışmanın ana amaçlarından birisi, kasava bitkisinde önemli kayıplara sebep olan *X. a. pv. manihotis*'in patojenini Real-Time PCR ile kısa sürede ve kesin olarak elde etmek, primer-probe geliştirmek, izolatların genotipik farklılıklarını ortaya koymak, tanısını yapabilecek primer ve prob setleri geliştirmektir. Geliştirilen bu yöntem ile *Xam* izolatlarının coğrafik dağılımı ve bu türe ait çok sayıda izolatın elde edilebilmesi sağlanabilecektir. Bu çalışmanın amaçlarından bir diğeri de *Xam*'in PFGE yöntemi kullanılarak izolatlar arasındaki farklılıklarını ortaya çıkarmak ve farklı *Xam* strainleri elde etmektir. Çalışma kapsamında elde edilecek farklı strainler ile Kasava Bakteriyel Yanıklık hastalığına karşı yapılacak dayanıklılık çalışmalarına katkı sağlanacaktır.

2. KURAMSAL BİLGİLER ve KAYNAK TARAMALARI

2.1. Kasava Bitkisi Hakkında Genel Bilgi

Kasavanın anavatanı Brezilya'dır. Kasava *Manihot esculenta* Crantz Euphorbiaceae familyası, Crotonoideae alt familyası ve Manihotae sınıfında yer almaktadır. Manihot cinsi 100 şifalı bitki, çalı ve ağacı içermektedir (Rogers ve Fleming 1973; Bailey 1976). Kasava, anavatanı olan Brezilya'dan Afrika'nın Uzak Doğu ve Karayip Adaları gibi tropikal alanlarına 16. ve 17. yüzyıllarda Portekizliler tarafından getirilmiştir (Jones 1959). Gold Coast (günümüzde Gana) 'da, Portekizliler, ticaret limanları, askeri birlikler ve kaleleri etrafında bu bitkiyi yetiştirmişler ve hem Portekizliler hem de köleler tarafından tüketilen temel bir besin kaynağı olmuştur. Kasava, 18. yüzyılın ikinci yarısında, Gana'nın kıyı ovaları halk tarafından yaygın olarak yetiştirilen ve kullanılan ana ürün olmuştur. (Adams 1957). Akan kabilesi, kasava'yı Kaleden hediye anlamına gelen "Aban Kye"'nin muhtemelen kısaltması olan 'Bankye' olarak isimlendirmişlerdir. Kasava'nın sahilden iç bölgelere doğru yayılması çok yavaş olmuştur. Ashanti bölgesine ve Kuzey Gana'ya, özellikle Tamale civarına 1930'da ulaşmıştır. 1980'li yılların başına kadar, orman kuşağının Akan kabilesi, kuzeyde muz, kokoyama, sorgum ve akdarı'yı tercih etmişlerdir. Kasava, 1982-1983 yıllarında ciddi kuraklığın ardından diğer ürünlerin tamamının yok olduğu pek çok alanlara yerleşmiş oldu (Korangamoakoh vd 1987). Fufu, gari ve konkote de dahil olmak üzere kasava ve kasava ürünleri 20 yıl önce olduğu gibi artık sadece kıyı bölgelerinde değil, Gana'nın tamamında çok popüler yiyecek haline gelmiştir.

Kasava, Alt-Sahra Afrika'da (Çöl olmayan Afrika Ülkeleri) yaygın yetiştiriciliği yapılan ürünlerden biridir. Pirinç, buğday ve mısırdan sonra tüketimde dördüncü sırada yer alan önemli bir global üründür. Afrika'da yaklaşık bir milyar insanın beslenmesinde kullanılan ana yiyecektir. Dünya' da yıllık yaklaşık 250 milyon ton kasava üretilirken, bir insanın günlük enerji ihtiyacının üçte birini karşılamaktadır (FAO 2001; FAO 2011).

Hindistan'da, ülkenin Kerala ve Andhra Pradesh bölgelerinde kasava, temel bir besindir. Ayrıca Assam bölgesinde önemli bir karbonhidrat kaynağı olarak tüketilmektedir. Tayland ve Vietnam'da üretilen kasava, Çin'de en büyük ihracat pazarını bulmaktadır.

Çin'de, Guangxi bölgesi ülkenin kasava üretiminin yaklaşık %60'ını karşılamaktadır Kasavadan birkaç çeşit alkollü içki de yapılmaktadır. Kasava aynı zamanda dünya çapındaki bir çok mutfakın önemli bir parçasıdır. Ayrıca kasava tüketmeden önce, işleme tabi tutulması gereken bazı toksik özelliklere sahiptir. Kasava'nın biyoyakıt kaynağı olarak kullanımının değerlendirilmesi için önemli araştırmalar yapılmaktadır. Kasavadan üretilmiş, çamaşır deterjanı ve çamaşır yıkama ürünleri bulunmaktadır.

Brezilya'daki kasava üretiminin yaklaşık %70'i, fakir bölgelerde, ülkenin kuzey ve kuzeydoğusunda gerçekleşmektedir. Bununla birlikte, yetiştiriciliği, un (karbonhidrat)

ve nişasta'ya yönelik artan kullanım talebinin ve daha yoğun üretim yöntemlerinin uygulandığı güney ülkelerinde önem kazanmaktadır.

Kolombiya'da, üretimin yaklaşık %50'si şu anda Atlantik Kuzey sahillerinde toplam gelirlerinin yaklaşık %40'ının kasava üretiminden karşılayan küçük ölçekli çiftçiler tarafından geleneksel üretim yöntemlerinin kullanıldığı alanlardan hasat edilmektedir. Kolombiya'da, "Sour" olarak adlandırılan kasavadan elde edilen bir fermente nişasta, "pan de yuca" ve "pan de bono" olarak adlandırılan atıştırmalıklar ve geleneksel glutensiz peynir ekmegini hazırlamak için kullanılır. Karayip havzasındaki ülkelerde, "nemli" olarak adlandırılan kalın bir kek hazırlamak için nemli kasava hamuru kullanılır. "Casabe" olarak bilinen mayasız ekmek, o bölgede de popülerdir. Brezilya'da, geleneksel kasava unu ürünlerinden, "farinha de mandioca" ve önceden pişirilmiş bir un "farinha de mesa" Kuzey Brezilya'da ve komşu bölgelerde de popülerdir. Birkaç yeni kasava unu ve nişastası, gıda endüstrisi ve fast-food satış mağazaları tarafından kullanılmaktadır. Örneğin, ekmek üretiminde "polvilho azedo" olarak bilinen doğal olarak mayalanmış kasava nişastası kullanılmaktadır. Güney, Orta ve Batı bölgelerinde, tatlı ve ekşi kasava nişastası, peynir ve yumurtadan yapılan bir tür ekmek "pão de queijo" neredeyse tüm aileler tarafından tüketilmektedir. Toplam kullanımın %48'inde, beslenme, kasava üretiminin bölgedeki en önemli amacı olduğu tahmin edilmektedir. Kasava Bakteriyel Yanıklık (CBB) Afrika'da kasava'nın en önemli bakteriyel hastalığıdır, ikinci sırada Kasava Mozaik Virüsü gelmektedir (CIAT 1996).

Kasava bitkisi zayıf topraklarda ve az yağışlı alanlarda iyi yetişmektedir; Sahra altı Afrika ülkelerinde popüler bir bitkidir. Kasava, asidik ile alkalilik pH değerinde, yıllık yağışların 5 mm 50 mm arasında deniz seviyesi ile 2200 metre arasında, hatta ekvatorial sıcaklıklara kadar çok çeşitli büyüme koşullarına tolerans göstermektedir. Çok yıllık bir bitki olması, ihtiyaç olduğunda ürünün hasat edilmesini kolaylaştırmakta ve bu durum kuraklık ve açlık dönemlerinde besin kaynağı olmasını sağlamaktadır. Kasava, hem ihracata yönelik ürün olarak hem de geçim kaynağı olarak hizmet etmektedir. Afrika halkı, kasava, fıstık ve tatlı patates gibi kök ve yumru köklü bitkilere aşırı şekilde bağımlıdır. Sahra altı Afrika ülkelerinin bazılarında, kasava ana besin kaynağı ya da ikincil besin kaynağıdır. Gana'da, ülkenin GSYİH'sının (Kişi başına Gayri Safi Yurt İçi Hasıla) %46'sını, kasava ticareti karşılamaktadır (Anonim 2015). Ülkede neredeyse her çiftçi ailesi kasava yetiştirmekte ve insanların günlük kalori alımının en az %30'unu oluşturmaktadır.



Şekil 2.1. Hasat edilmiş kasava yumruları

2.2. *Xanthomonas* İle İlgili Kuramsal Bilgiler

Xanthomonas cinsine ait bakteriler, kozmopolit dağılım gösteren ve bitki patojeni olarak bilinmeyen *Xanthomonas maltophilia* haricinde, bitki ile ilişkili bakterilerdir ve genellikle diğer ortamlarda görülmez. Her zaman bitki patojenleri değildir (Swings vd 1983).

Xanthomonas campestris pv. *campestris* izolatları, bitki dokusu veya epifitler ile asimptomatik olarak ilişkili bulunmuştur (Maas vd 1985; Angeles-Ramos vd 1991) ve birincil bakteri patojeni tarafından enfeksiyon sonrası bitki dokusunun ikincil istilasıyla sınırlanmış gibi görünen diğer *Xanthomonas*'lar bulunmaktadır (Gitaitis vd 1987).

Xanthomonas enfeksiyonlarının, *Xanthomonas*'ın konukçularında, en az 124 monokotiledon ve 268 dikotiledon bitki türünde meydana geldiğini göstermiştir. Monokotiledonlar arasında konukçu serisi, en az 70 cinsi bulunan 11 familyaya yayılmıştır ve 170 cinsin bulunduğu 57 familyadan fazla ait dikotiledon konakçı bulunmaktadır. Angiosperm familyalarının herhangi birinin alt sınıflarıyla güçlü bir birliktelik bulunmamıştır (Leyns vd 1984).

Her *Xanthomonas* türünün veya patovaryasının konukçu aralığı çoğu durumda aynı bitki familyasının birkaç türüne ya da bazen birkaç cinsi ile sınırlıdır, genellikle patojenin adı konukçu bitkinin cins ya da tür adından türetilmektedir. Bazı *Xanthomonas* geniş konukçu aralığına sahiptirler ve diğerleri de bir veya daha fazla gibi dar konukçu aralığı göstermektedir (Leyns vd 1984).

Örneğin, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, Brassicaceae'ye ait bitkilerin genel bir patojendir ve *Xanthomonas campestris* pv. *graminis*, Poaceae'nin birkaç cinsini infekte etmek iken, *Xanthomonas campestris* pv. *phlei*, *Xanthomonas campestris* pv. *poae* ve *Xanthomonas campestris* pv. *arrhenatheri* bir konukçuyla sınırlıdır (Egli ve

Schmidt 1982). Bununla birlikte, pek çok durumda, *Xanthomonas* spp.'nin konukçu dağılımı henüz tamamlanmamıştır, çünkü hiçbir ekonomik öneme sahip olmayan yabancı bitki türleri çok nadir incelenmiştir.

Xanthomonas Dowson, çubuksu, tek hücreli, tek kamçılı ve Gram negatif (-) olan bir bakteri cinsidir. Koloniler genellikle sarıdırlar. Çünkü, hücreler Xanthomonadin pigmenti içerirler. *Xanthomonas*'a ait türlerin büyük çoğunluğu bitki patojenidirler fakat küçük bir grubu saprofitik ve epifitiktir (Goto 1992). En az 124 monokotiledon ve 268 dikotiledon bitki türleri *Xanthomonas*' ın bir veya daha fazla türüne karşı hassastır (Hayward 1993).

Xanthomonas doğada büyük bir genetik çeşitliğe sahiptir. 20 DNA homoloji grubu bu cins içinde tanımlanmış ve tüm gruplar genomik türler olarak dikkate alınmıştır (Vauterin vd 1995). Aynı türlerde, ortalama DNA homolojisi düzeyi, strainler arasında % 77' dir. Bununla birlikte, farklı *Xanthomonas campestris* patovaryları arasında ayrılabilir. Bununla birlikte, farklı *Xanthomonas* DNA homoloji gruplarına sahip olan strain ortalama DNA bağlanma düzeyleri %40' dan daha azdır. İki önemli DNA homoloji grubu *Xanthomonas campestris* patovaryları arasında ayrılabilir. Bunlardan birincisi genomik olarak ilgili strainlerin oluşturduğu bir sınıf, diğeri ise %80 den fazla DNA homoloji düzeyi gösteren ilgili ırkların bulunduğu genomik sınıftır (Vauterin vd 1995).

2.3. *X. a. pv. manihotis*'e Ait Kuramsal Bilgiler

Xanthomonas axonopodis pv. *manihotis*, çoğunlukla teker teker veya çift olan bir 1.3 x 0.4 µm (1.01.75 x 0.280.6 µm) Gram negatif çubuk bakteridir. %0.5 glukoz çözeltisi içindeki hareketli hücreler ve bir polar flagellum bulunur (Maraite vd 1981).

Saflaştırılmış izolatlardan nutrient agar plakaları üzerine çizilmiş bakteri kolonileri, 28 °C'de 24 saat inkübasyondan sonra görünür hale gelir. 48 saat sonra koloniler yaklaşık 1 mm çapına ulaşır. Koloniler beyazımsı griden krem renk, kabarık, konveks, pürüzsüz, parlak, tüm kenarları ile ilk önce hiyalin, sonra opak ve bulanık ve viskoz tutarlılık gösterir.

Patates Dekstroz Agar ve Tripton Soya Agar'ında bakterilerin gelişmesi, Nutrient Agardan daha hızlıdır. Tetrazolyum ortamındaki koloniler (Kelman 1954) 6 gün sonra 8 mm çapa ulaşır ve yuvarlak, pürüzsüz parlak kırmızı merkezleri ile dar kenarlıdırlar. *Pseudomonas solanacearum* [*Ralstonia solanacearum*] mutantlarının zayıf patojenik koloni tipine benzerler (Maraite ve Meyer 1975).

Glikoz mayası salin (Glikoz 5 g, maya özütü 5 g, amonyum dihidrojen fosfat 0,5 g, dipotasyum hidrojen fosfat 1.5 g, magnezyum sülfat heptahidrat 0,2 g, sodyum klorür 5 g, agar 20 g, su 1L) üzerindeki büyümede, koloniler açıkça dışbükey ve parlaktır (Maraite vd 1981).

Kasava Bakteriyel Yanıklık (CBB) ilk kez Brezilya'da Bondar (1912) tarafından tanımlanmış ve *Bacillus manihotis* adı verilmiş ancak bakteriyolojik tanımlama yapılmamıştır. CBB kasavanın en önemli bakteriyel hastalıklarından biridir ve

Afrika’da önemli ürün kayıplarına neden olmaktadır (CIAT 1996). CBB etmeni *X. a. pv. manihotis* (Xam)’dır. Fitopatogenik bakterilerin gelişmesi üzerine yapılan araştırmada, Starr vd (1946) bu bakteriyi *Xanthomonas manihotis* olarak belirtmiştir. Bitki patojeni bakterinin revizyonu ve patovar sistemin benimsenmesi ile birlikte, Dye (1978) *X. manihotis*’i *X. campestris* pv. *manihotis* olarak yeniden isimlendirmiştir. Vauterin vd (1995) bunların fenotip ve genomik özelliklerine dayanarak bitki patojen bakterilerinin son listesinde referans isim olarak kullanılan *X. a. pv. manihotis* (Çizelge 2.1) adını önermişlerdir (Young vd 1996). Bouriquet (1939)’in Madagaskar’da kasava üzerinde yaprak lekeleri ve yanıklığı ile ilişkili bir bakteri için kullandığı *Bacterium robici* ismi muhtemelen CBB’nin sinonimidir.

Çizelge 2.1. *X. a. pv. manihotis*’in bilimsel sınıflandırılması

Alem	Bacteria
Filum	Proteobacteria
Sınıf	Gammaproteobacteria
Takım	Enterobacteriales
Order	Xanthomonadales
Familya	Xanthomonadaceae
Cins	<i>Xanthomonas</i>
Tür	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i> (Bondar 1912); Dye 1978; Vauterin vd 1995

2.3.1. Kasava bakteriyel yanıklık hastalığı belirtileri

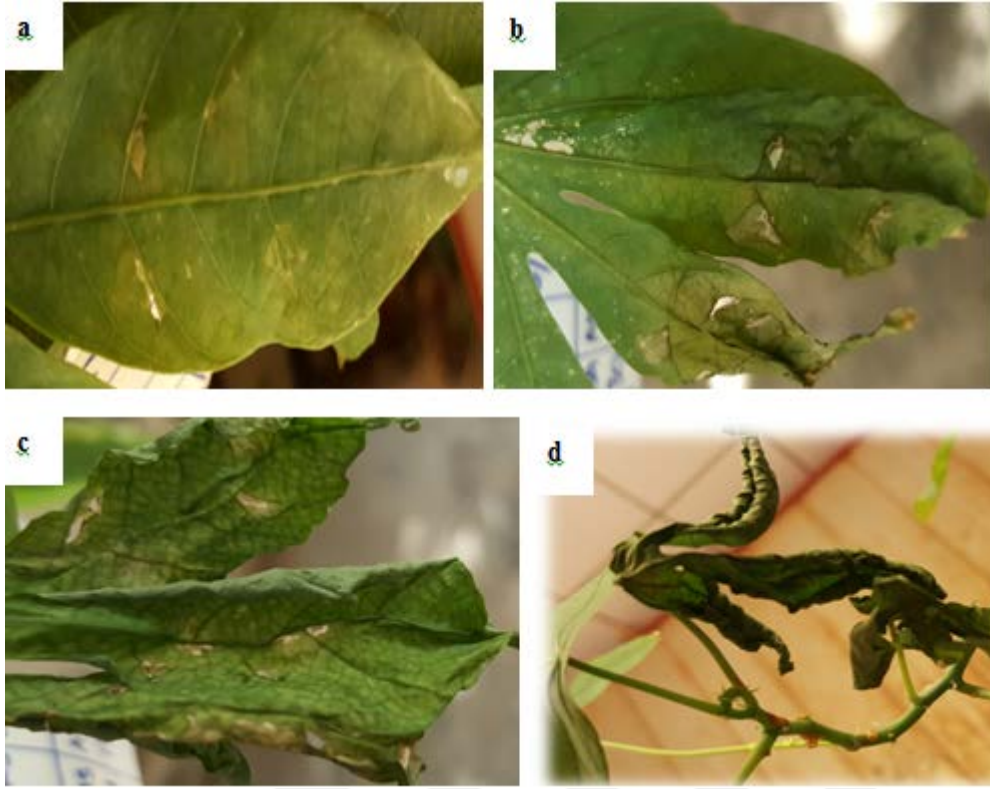
Yapraklar, damarcıklar tarafından sınırlanan ve yaprak ayası üzerinde düzensizce dağılan koyu yeşilden maviye, ıslak köşeli lekeler (çapı 14 mm) göstermektedir. Zamanla yaprağın damarları veya kenarları boyunca çoğu kez genişler ve birleşirler; orta bölüm kahverengiye döner ve ıslak gibi görünen bölüm genellikle sararmış hale ile çevrili olur. Işığa doğru bakıldığında, lezyonlar yarı saydam lekeler olarak görünür. Büyüteç altında, lezyonun orta bölümünden sızan küçük irin akıntı damlacıkları yaprakların alt yüzeyinde görünür bir şekildedir. İlk başta kremi beyaz, sonra sarı olarak parlayan damlacıklar yağmur ya da çiğde kolayca çözünmektedir; kurduğunda ise ince bir tortu oluştururlar. Uygun koşullar altında (yeni yapraklar, yüksek toprak ve hava nemi), ıslak gibi görünen iğne ucu lekeleri yeni köşeli lekeler etrafında dağılmış bir şekilde gelişirler. Yaprak ayasını çevreleyen kısım açık kahverengiye döner ve 23 gün içinde yaprakçıkların geniş alanları sadece yaprakçığın ucuna ya da kenarına doğru değil ayrıca köke doğru da solar. Etkilenmiş bölümler sanki yüzeysel olarak yakılmışçasına açık kahverengi ve yeşil alanlar gösterirler. Bu nekroz alanları yarı saydam değildir, hiç bakteriyel akıntı gözlemlenmemiştir ve bakteriler genişleyen yanık lezyonların kenarlarında sadece çok sınırlı miktarlarda bulunmaktadır ya da yoktur. Şiddetli bir enfeksiyonda, zamanından önce kurumaya ve yaprakların dökülmesine yol açmaktadır.

Yüksek nem koşullarında, enfeksiyon, vasküler iletim demetleri yoluyla yaprakçıklardan yaprak sapına ve sürgünlere ya da saplara kadar, ilerler ve akıntı damlalarının yanı sıra siyah ve koyu kahverengi damarlar şeklinde de yayılabilir. Bu

bölümler, aynı zamanda yaprakların tüketim için koparılmasına ya da böcek zararına bağlı olarak oluşabilen yaralar aracılığıyla doğrudan enfekte olabilirler.

Odunlaşmamış sürgünde veya sapta, enfeksiyon noktası çevresinde koyu yeşilden siyaha doğru ıslak gibi görünen alan gelişir. Odunlaşmamış sürgünde veya sapta, enfeksiyon noktası çevresinde koyu yeşilden siyaha doğru ıslak gibi görünen alan gelişir. Büyük yapışkan irin-akıntı damlaları, enfeksiyon noktasından biraz uzakta, vasküler demetler ekseninde görünür ve aynı tarafta bulunan bir ya da birkaç yaprak ani bir şişkinlik kaybı, ardından hızlı bir solma ve buruşma gösterir. Sonrasında yaprak sapı tabanı çöker ancak kurumuş yapraklar genellikle bir süreliğine bağlı kalırlar. Yukarıda yer alan bütün yapraklar solgunluğun ilk belirtilerini artan bir şekilde göstermektedir. Son olarak, sapın altından yeni filizler çıkarken, ‘mum’ belirtisi göstererek solmuş sapın ucunda bir fitil gibi görünen odunlaşmamış uç ölür. Enfeksiyon sapın tabanına doğru ilerlerken, bu filizler de sık sık bitkinin ucundan itibaren tepe kurumasına yol açarak solarlar. Enfekte olmuş filizlerde, ksilem damarları kahverengimsidir.

Mikroskop altında, damarlar bakteri, tylose ve zamlı maddeler tarafından tıkanmış görünürler. Protoksilem etrafında erimiş oyuklar gelişir. Bu oyukların yayılması ksilem halkasının kopmasına, floemde litik (erimiş) oyukların gelişimine ve sonra kabuksu pekdokuda (kollenkima) lif halkasının kopmasına yol açar. Bunun dışında, en son bahsedilen oyuklar değiştirilmiş sakızimsıya karşılık gelen koyu yeşil ıslak lekeler ve küçük siyah damarlar olarak görünür hale gelirler. Bu lekeler şişer, yırtılır ve yapışkan beyaz sarı renkte bir zamlı çıkarırlar. Tam olarak odunlaşmış saplarda ya da dallarda, sadece iç vasküler kahverengileşme görünür. Enfeksiyon, herhangi bir harici görsel belirtinin altında 50 cm’den daha fazla yayılabilir. Şişmiş ve kökleri kurumuş, ölü vasküler doku etrafında çürümüş lekeler gösterebilen enfeksiyon, bazı çok hassas çeşitlerde köklere nadiren ulaşabilmektedir (Lozano, 1986). Yeşil kapsüllerde, ıslak genişleyen ıslak lekeler de gözlemlenebilmektedir. Böyle meyvenin ağır bir şekilde enfekte olmuş tohumları, tohum zarfı ve kotiledonlarda ve endospermdeki nekroz alanlarının buruşması ile birlikte deforme olabilir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Kasava bitkilerinde tipik *Xam* belirtileri (a) Başlangıç belirtisi; (b) Köşeli yaprak lekeleri; (c) Yaprak solması (d) Yaprak yanıklığı ve eksüdat

2.3.2. *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*'in yaygınlığı

Kasava Bakteriyel Yanıklığı ilk kez 1912' de Brezilya'da (Bondar 1912) tanımlanmıştır. 1970'lerde Orta ve Güney Amerika, Karayipler, Afrika ve Asya'da kasavanın yetiştiği alanların çoğunda bulunmuştur (Bradbury 1986).

Yakın zamandaki raporların bazıları, kasava'nın başlıca bir temel gıda ürünü olduğu dikkate alındığında artan ilgiden kaynaklanmaktadır. Gerçekten de, çeşitli ülkelerdeki detaylı arazi sürveyleri, ilk tespitinden kısa süre sonra Kasava Bakteriyel Yanıklığı'nın yaygın görüldüğünü ortaya çıkarmıştır ve epidemik gelişmeden çok önce yerleştiğini göstermiştir (Maraite ve Meyer 1975; Persley 1979). Bazı bölgelerde, Kasava Bakteriyel Yanıklığının son zamanlardaki girişi ve hızlı yayılımının nedeni karantina önlemlerinin yeterince alınmamasıdır (Kwaje 1982; Joseph ve Elango 1991).

Virulenslilik ve coğrafi köken arasındaki farklılıklar arasında hiçbir ilişki belirlenmemiştir. Afrika'dan elde edilen izolatlar, bakteriyofaj yöntemi ile *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*'in diğer orijinlerinden ayırt edilebilir (Persley 1980), Ayrıca Afrika strainlerinin Güney değişken amilaz üretimi gözlemlenen Amerika strainleri ile karşılaştırıldığında düşük amilaz aktivitesi vardır (Maraite vd 1981; Alves ve Takatsu 1984).

2.3.3. *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*'in konukçuları

Bu patojen, Kasava (*Manihot esculenta*) konukçuna ek olarak, *Manihot aipi*, *M. glaziovii* ve *M. palmata* gibi yabancı türlere de saldırır (Dedal vd 1980). *Euphorbia pulcherrima* (Poinsettia) ve *Pedilanthus tithymaloides*'in *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* ile yapay enfeksiyonu sonucunda, kasava'da görülen benzer simptomlar görülmüştür. Mooter vd (1987), *E. pulcherrima* üzerinde *X. axonopodis* pv. *manihotis*'in izolatlarının geniş bir aralığı aşılanmış ve hiçbir lezyon görülmemiş veya çok sınırlı lezyon gözlenmiştir.

Amaranthus spp., *Panicum fasciculatum*, *Sida* spp., *Sorghum halepense* ve Euphorbiaceae'ye ait birkaç tür Venezuela'da olası alternatif konukçular olarak tanımlanmıştır (Marcano ve Trujillo 1982).

Epifitik canlılık, yüksek bağıl nem, şiddetli yağış ve kalın bulut örtüsü altında ancak kuru olmayan koşullar altında birkaç bitki türü üzerinde gösterilmiştir (Marcano ve Trujillo 1984).

Bununla birlikte, Ikotun (1981) Nijerya ve Kolombiya'daki çalışmalarında *X. axonopodis* pv. *manihotis*'in, kasava bitkileri içindeki ve çevresindeki alternatif konukçularda doğal olarak hayatta kalmadığı sonucuna varmıştır. Bu bilim adamı, sadece *E. repanda*'nın inokülasyonu ile aşırı hassas bir reaksiyon gözlemlemiştir.

Kasava çiçeklerinde simptomsuz epifitik gelişim, Daniel vd (1981) tarafından sürekli olarak bulunmuştur.

2.3.4. *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*'in biyolojisi ve ekolojisi

X. axonopodis pv. *manihotis* yeni alanlara, enfekteli, simptomsuz bitki çelikleri ve tohumlarıyla yayılır. Tarla içerisinde yayılma çoğunlukla yağmur sıçraması ile olmaktadır (Persley 1979) ve salgınlar yağışlı mevsim sırasında oluşmaktadır. Özellikle yağmur sırasında veya yağmurdan sonra ürün arasında insan ve hayvanların hareketi patojenin yayılımına katkıda bulunabilir (Lozano 1986).

Xanthomonas axonopodis pv. *manihotis*'in tohumla bulaşma olasılığı Persley (1979) tarafından 30 °C'de 24 saat boyunca steril suda ısıtılan tohumlardan elde edilen süpernatantın aşısı olarak kullanılması yoluyla ve bir yaprak filtrasyon tekniği ile olmaktadır.

Elango ve Lozano (1980), zenginleştirilmiş embriyonik ekstraktlar üzerinde immünfloresans (IF) ve enzim bağılı bağışıklık emici test (ELISA) ile tohum iletimini örnekleme süresine bağılı olarak %40 embriyo enfeksiyonu ile teyit etmiştir. IF'de 100.000 hücre/ml ve ELISA'da 10.000 hücre/ml ile berrak pozitif reaksiyonlar elde edilmiştir.

IF ile birlikte yapılan histolojik araştırmalarda, Daniel ve Boher (1981), (testa, karunkül, endosperm, kotiledon ve embriyo) tohum üzerinde ve içinde tohum başına 1 milyon bakteri bulunan patojen popülasyonlarının seviyelerini belirlemiştir.

Bununla birlikte, hastalıklı tarlalardan enfekte bitki yetiştirme materyalinin yayılımı, *X. axonopodis* pv. *manihotis*'nin Afrika ve Asya'da uzak mesafelere yayılmasının başlıca aracı olmuştur.

Yeni kurulan plantasyonlarda birincil enfeksiyonların kaynağı da budur. Bunun nedeni, çoğunlukla, lignali damarlarda görünür semptomların olmaması ve patojenin işgal edilen dokuda uzun süre hayatta kalma yeteneğine bağlıdır (Lozano ve Nolt 1989).

Bulaşık alet ve ekipmanlar aynı zamanda önemli bir yayılım aracıdır. Özellikle yağmur sırasında veya yağmurdan sonra ekim yoluyla insan ve hayvanların hareketi patojen yayılımına katkıda bulunabilir (Lozano 1986).

2.3.5. Enfeksiyon ve hastalık gelişimi

Bitkiler içine giriş stoma veya epidermal yaralar yoluyla olmaktadır. Orta ve Batı Afrika'da kök enfeksiyonları sıklıkla, *Pseudotheraptus devastans* tarafından açılan yaralardan kaynaklandığı keşfedilmiştir, nadiren de bakteri vektörüdür (Maraite ve Meyer 1975). Benzer bir rol *Anoplectnemis madagascariensis* ve çekirge *Zonocerus variegatus* için de tespit edilmiştir (Bouriquet 1939).

Enfeksiyon için, 22-26 °C sıcaklıkta 12 saatlik %90-100 nispi nem gerekmektedir. (Lozano, 1986). Büyüme odasında hastalık gelişimi için optimum sıcaklık yaklaşık 30 °C'dir (Maraite ve Perreaux 1979).

Güney Amerika'da sıcaklığın, Kasava Bakteriyel Yanıklığının şiddetini etkileyen önemli bir faktör olduğu düşünülmektedir. Amazon gibi bölgelerde ortalama minimum ve maksimum sıcaklıklar sırasıyla 20 ve 30 °C'nin üzerindedir, Kasava Bakteriyel Yanıklığı, yüksek yağışlara rağmen önemli bir hastalık değildir (Takatsu vd 1978).

Yağışlı mevsim boyunca 10 °C' yi aşan tamponlu sıcaklık varyasyonları olan orman bölgelerinde gündüz/gece sıcaklıklarının düşmesinin hastalık ciddiyetini arttırdığı bulunmuştur (Lozano 1986; Joseph ve Elango 1991).

Afrika'da, Kasava Bakteriyel Yanıklığı, savannah ve orman savan geçiş bölgelerinde orman bölgelerinden veya hatta savannahlardaki orman galerilerinden daha yaygın olarak görülmektedir (Maraite ve Meyer 1975; Persley 1980).

Yaprakların potasyum içeriğini artırmak için potasyum gübrelemesi, hastalığın ciddiyetini azaltmaya ve verimi arttırmaya eğilim göstermektedir (Odurukwe ve Arene 1980).

Parenkim yaprak veya kök dokularının hücrelerarası boşluklarındaki bakteri çoğalması muhtemelen pektinazların ve selülozların üretilmesinden (Maraite ve Weyns 1979; Dianese 1985; Boher vd 1995) müskin maddelerle doldurulmuş litik cepler, hücre duvarının bozunması ile birlikte ortaya çıkar ve bakteriyel hücre dışı polisakarit oluşumuna neden olurlar (Ikotun 1984).

Doğrudan ya da parçalanma sonrasında, litik cepler, bakterilere, bitkide sistemik yayılma ile sonuçlanan ksileme erişim sağlar. Küf semptomlarının görünümü ve kapsamı, 3 metiltiopropionik asit toksini (Perreaux vd 1986) ve bakteriler tarafından

üretilen diğer fitotoksik karboksilik asitler (Ewbank 1992) artmış olan yaprak konsantrasyonu ile ilişkilidir.

Bu toksinler, metiyonin (Ewbank ve Maraite 1990) veya bakterilerdeki diğer amino asitlerin transaminasyon ve dekarboksilasyon katabolizmasının indüklenmesinden kaynaklanmaktadır (Ewbank 1992).

Bakteriler, aylarca sap ve sakız içinde canlı kalır. Bakterilerin hayatta kalma oranı kuru koşullarda nemli koşullardan daha yüksektir (Persley, 1979; Thaveechai vd 1993).

Daniel ve Boher (1985), hastalığın yayılmasının meydana geldiği yağışlı mevsimlerde Kongo'da çiftlik bitkileri ve çeşit koleksiyonlarında semptomsuz kasava yapraklarında çok sayıda patojen bulmuşlardır.

Xanthomonas axonopodis pv. *manihotis*'in *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* ve *Penicillium purpureescens* gibi doğal düşmanları da içerir.

2.3.6. *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*'in ekonomik önemi

Kasava Bakteriyel Yanıklığı, kasava yetiştiriciliğinde önemli bir tehdittir ve oldukça duyarlı çeşitlerin yetiştirildiği bir bölgede, patojenin veya muhtemelen daha agresif strainlerin girişinden sonra son derece ciddi kayıplara neden olabilmektedir.

1973 yılında, Nijerya'da Kasava Bakteriyel Yanıklığının ilk raporundan 1 yıl sonra, tahmini verim kaybı %75 (Ezelio 1977) olmuştur. Uganda'nın bazı bölgelerinde hastalığın ilk raporundan 2 yıl sonra ürün kayıpları %90-100 gibi yüksek oranlarda gözlenmiştir (OtimNape 1980).

Zahire'de, 1971 ve 1973 yılları arasında Kasai ve Bandundu bölgelerindeki epidemiler, kasava kökleri ve yapraklarının ana besin kaynağı olarak önemi nedeniyle bu alanlarda ciddi açlığa neden olmuştur (Maraite ve Meyer 1975).

Xanthomonas axonopodis pv. *manihotis*'den arı ve *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* ile enfekteli gövde çelikleri deneylerinde, OtimNape (1983), taze yumru veriminde 40.1'den 26.6 ton/hektara varan bir azalma gözlenmiştir.

Umemura ve Kawano (1983), 1974 ve 1982 yıllarında kasava'nın duyarlı klonlarının veriminde Kolombiya'daki doğal enfeksiyon altında dirençli olanlara kıyasla %18-92 oranında bir verim azalması gözlenmiştir.

Kolombiya'da beş büyük kasava üretim bölgesinde yapılan CIAT araştırmasına dayanarak, ulusal üretimdeki tahmini azalma, yine de, 1973'te hala %6.64'tür (Lourido 1974).

Xanthomonas axonopodis pv. *manihotis* enfeksiyonu aynı zamanda tohum kalitesinde azalmaya neden olabilmektedir (Lozano 1986; Frison ve Feliu 1991). Enfeksiyonlu meyvelerden yoğun bulaşık tohumlar, kotiledonlar ve endosperm üzerinde nekrotik lekeler göstererek deforme olurlar. Bu tohumların çok azı çimlenir (Lozano 1986).

2.3.7. *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* için tanı ve tespit teknikleri

Kasava Bakteriyel Yanıklık etmeni üzerine birçok morfolojik çalışma bulunmaktadır. Mamba-Mbayi vd (2014), *Xam* strainlerinin belirlenmesinde morfolojik, fizyolojik karakterizasyon ve mikroskopik teknikleri kullanmıştır.

Xanthomonas axonopodis pv. *manihotis*'in tohumla bulaşma olasılığı Persley (1979) tarafından, 30 °C'de 24 saat boyunca steril suda ısıtılan tohumlardan süpernatantı aşısı olarak kullanan bir yaprak filtrasyon tekniği ile gösterilmiştir.

Sefazolin trehaloz agar (CTA) ortamı ve (+) glikozdan seçilen yarı seçici agar ortamı, kasava bitkilerinden *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*'in izolasyonu ve tanımlanması için geliştirilmiştir (Fessehaie vd 1999).

Xam patojeni tohumlarda ELISA ve immunofloresans (IF) teknikleri kullanılarak tespit edilmiştir. Zenginleştirilmiş embriyonik ekstraktlar üzerinde immünfloresans (IF) ve enzim bağlı bağışıklık emici test (ELISA) gibi teknikleri kullanarak embriyo enfeksiyonu %40 olduğunu teyit etmiştir. IF'de 100.000 hücre/ml ve ELISA'da 10.000 hücre/ml ile berrak pozitif reaksiyonlar elde edilmiştir (Elango ve Lozano 1980).

IF ile birlikte yapılan histolojik araştırmalarda, Daniel vd (1981), testa, karunkül, endosperm, kotiledon ve embriyo tohum üzerinde ve içinde tohum başına 1 milyon bakteri bulunan patojen popülasyonlarının seviyelerini belirlemişlerdir.

Kasava Bakteriyel Yanıklığının nedeni olan *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*'in saptanması için bir Dot Blot testi geliştirilmiştir (Verdier ve Mosquera 1999). Kök ve yaprak örneklerinde *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*'in saptanması için Dot Blot yönteminin genel hassasiyeti reaksiyon başına yaklaşık 10^3 /cfu bulunmuştur.

Tür düzeyinde *Xanthomonas* sınıflandırması esas olarak DNA-DNA hibridizasyonu, yağ asidi profili oluşturma, Rep-PCR ve 16S rRNA gen dizilimi üzerine kurulmuştur (Stead 1989; Vauterin vd 1990). Bununla birlikte, *Xanthomonas*'ın tür seviyesinde tanımlanması hala teşhis laboratuvarları için önemli sorunlar ortaya koymaktadır.

GyrB sekansları, aynı *gyrB* sekansları ile bir tür kompleksi oluşturan *Xanthomonas euvesicatoria*, *Xanthomonas perforans* ve *Xanthomonas alfalfae* hariç tüm *Xanthomonas* strainleri ayırt edilebilir (Parkinson vd 2007).

Ojeda ve Verdier (2000), kasava gerçek tohumlarında *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* patojeni tespit etmek için bir PCR yöntemi geliştirilmiştir. Bu teknik özgül, hassas ve hızlıdır.

Kolombiya'nın farklı coğrafik bölgelerinde *Xam*'nin strain çeşitliliğini belirlemek üzere *Xam*'in fiziksel karakterizasyonu çalışılmıştır (Restrepo ve Verdier 1997). Bu amaçla, farklı moleküler markerlar *Xam* popülasyon çalışmalarında kullanılmıştır. Bunlar; sınırlandırılmış parça uzunluğu polimorfizmi (RFLPs), Enterobakterial Tekrarlanan Kalıtlar arası Konsensüs PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic

Consensus-PCR - ERIC-PCR), Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi (AFLP) olarak karşımıza çıkmaktadır (Verdier vd 1993; Restrepo ve Verdier 1997; Restrepo vd 1999). Bu tekniklerden bir tanesi de ilgili genomdaki bitişik tekrarlardaki polimorfizmi belirlemek olan, lokus sekansına dayanan değişken sayılı bitişik tekrarlar (VNTR)'dir ve bilgi verici markırların elde edilmesi için önemlidir.

Hastalıklı kasava bitkisinden *Xam* patojeninin tanı ve tespitini yapmak amacıyla spesifik klasik PCR primerleri araştırmacılar tarafından kullanılmıştır (Garcia vd 2007; Van-Belkum 2007; Verdier vd 1998). *X. a. pv. manihotis* strainlerinin spesifik tanısını yapmak amacıyla 898 bp'lik DNA fragmenti klonlanmış ve klonlanan DNA dizisine ait primerler geliştirilmiştir (Verdier vd 1998).

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

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

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

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

Real-Time PCR yöntemini kullanılarak yapılan çalışmalarda araştırmacılar fitopatojen bakteriyel, fungal ve viral etmenlerin tanısında bu yöntemin kullanılabileceğini belirterek yöntemin avantaj ve dezavantajlarını tartışmışlardır. Real-Time PCR yöntemini klasik PCR yöntemine göre 10^7 kat daha hassas olması, kontaminasyon olasılığının daha düşük olması, elektroforezis işlemine gerek duyulmaması, hızlı sonuç vermesi gibi avantajları vardır (Freeman vd 1999, Raeymaekers 2000). Real-Time PCR yöntemi ile günümüze kadar farklı bitki patojeni bakterilerin tanı ve tespitleri yapılmıştır (Basım ve Basım 2004; Basım ve Yılmaz 2005; Basım ve Basım 2007; Benlioğlu ve Özyılmaz 2007; Basım ve Basım 2009; Basım ve Çaplık 2009; Basım ve Bozan 2011; Basım ve Öztürk 2011; Basım ve Baki 2014).

Wang vd (2014), turuncgillerde ciddi kayıplara sebep olan Stubborn hastalık etmeni *Spiroplasma citri*'nin kısa sürede tanı ve tespitini yapmak amacıyla Real-Time PCR yöntemini kullanmışlardır. Real-Time PCR yönteminde çalışmalarında geliştirdikleri *Spiroplasma citri*'nin profage gen bölgesinden Php-orf1 ve Php-orf3 primerleri ile SYBR Green 1 kullanmışlardır. Real-Time PCR yönteminde yalnızca çift sarmallı DNA'ya bağlandıklarında floresan ışığa veren bir boya olan SYBR Green tekniği kullanmışlardır. Real-Time-PCR yöntemleriyle patojen bakterin moleküler tanıları, hem direkt *Xam* hücrelerinden hem de hastalıklı bitki dokularından çok kısa sürede (20-25 dk) sağlanmıştır. Optimizasyon çalışmaları sonucunda elde edilen ve SYBR Green 1 kullanılarak yapılan Real-Time PCR yöntemiyle *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*'nin moleküler düzeyde tespitleri yüksek hassasiyette yapılabileceğini ortaya koymuşlardır.

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

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

Xanthomonas kromozomunun %G+C içeriği %63-71 arasındadır (Goto 1992). Standart elektroforezde 50 ile 100 kilobaz (kb)' dan büyük DNA moleküllerinin görülmesi oldukça zordur. Normal jel elektroforezin ayırma gücü 10-50 kb DNA fragmenti ile sınırlıdır.

PFGE, agaroz jel içerisindeki büyük DNA moleküllerinin değişik şekillerde hareket etmesini sağlayan bir avantaja sahiptir (Cantor vd 1988). 50 kb' dan büyük DNA moleküllerinin ayırımı iki değişik elektrik alanı kullanılarak (Schwartz vd 1982) yapılmıştır ve daha sonra değişik PFGE sistemleri geliştirilmiştir. PFGE, genom karakterizasyon için güçlü bir araçtır ve 80' den fazla bakteriyel kromozomun fiziksel haritasının oluşturulmasını sağlamıştır (Le Bourgeois vd 1995). Pulsed-Field Jel Elektroforez (PFGE) yönetimi kullanılarak *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*, *Erwinia amylovora* ve *Pseudomonas syringae* patojenlerinin genom analizleri yapılabilmektedir fakat bu çalışmada kullanılan *X. axonopodis* pv. *manihotis* (*Xam*) ile ilgili herhangi bir PFGE çalışması bulunmamaktadır.

Basım (1998) *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*'nın genom büyüklüğü ve fiziksel haritalanmasını PFGE ile çalışmıştır. Bu çalışmada, PFGE kullanılarak ve az sıklıkla kesen restriksiyon enzimleri ile *X. a. vesicatoria*'nın genome büyüklüğünü ve bakteriye ait genomun başlangıç fiziksel haritasını tanımlamıştır. Farklı az sıklıkla kesen restriksiyon enzimlerini farklı kesim koşulları altında *X. a. vesicatoria*'nın kromozomundan büyük DNA fragmentleri oluşturmak amacıyla test etmiş ve PFGE ile bu fragmentlerin ayrılması amacıyla farklı yürütme programları kullanılmıştır. *SpeI*, *PacI*, *SwaI* ve *AseI* enzimleri 6 ile 30 adet DNA fragmentleri oluşturmuş ve optimum koşullar altında ayrımı sağlamıştır. Her bir strainin genomik büyüklüğü PFGE ile ayrılan DNA fragmentlerinin büyüklükleri toplanarak tespit edilmiş ve ırka bağlı olarak büyüklükleri 4000 kb' den 5000 kb'a kadar değiştiği belirlenmiştir. XvP26 strainin genom büyüklüğünü 5055 kb olarak tespit etmiştir. *Hrp*, *avrBs2*, *pig* ve *avrRxv* gen lokuslarını *SpeI*, *PacI* ve *SwaI* ile kesilen ve PFGE ile ayrılan DNA fragmentleri üzerine Southern hibridizasyon tekniği ile bu genlerin yerlerini belirlemiştir.

Flávia vd (2005) Turunçgillerde hastalığa neden olan *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*) strainleri PFGE ve plazmid profilini analizi ile incelenmiştir. Genomik DNA *XbaI* ve *VspI* az sıklıkla kesen enzimleri ile kesilmiştir. Arjantin, Bolivya ve Uruguay gibi farklı coğrafik bölgelerdeki *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* strainleri arasındaki genetik değişkenlikleri ve benzerlikleri belirlenmiştir. PFGE kullanarak değerlendirilen *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* strainleri ekstra kromozomal genetik elementine bağlı olarak önemli derecede çeşitlilik göstermiştir.

Yongxiang ve Klaus (1997) çalışmalarında, farklı coğrafi bölgelerden farklı yıllarda çeşitli konukçu bitkiler üzerinden izole edilen *Erwinia amylovora* strainlerini, agar hücrelerindeki DNA'ların az sıklıkla kesen restriksiyon enzimleri ile kesilmelerinden sonra PFGE ile analiz etmişlerdir. Enzim *XbaI* kesimleri ile elde edilen bantlar farklı bölgelerdeki strainler arasında önemli farklılıklar olduğunu ortaya çıkarmıştır. Kuzey Amerikada strainleri E9 ve bir *Rubus* straini Ea-Rb'nin diğer *E. amylovora* strainlerinden çok farklı olduğunu belirtmişlerdir. Fransa strainlerinin, Orta Avrupa ve İngiltere strainlerinden farklı olduklarını bildirmişlerdir. Orta Avrupa ve Yeni Zelanda *E. amylovora* strainleri Mısır, Yunanistan ve Türkiye strainleri ile aynı PFGE profili gösterdiğini bildirmişlerdir. Amerika ve İngiltere strainlerinin genomik DNA'larının farklı PFGE profili gösterdiğini belirtmişlerdir.

Žarko vd (2012) Sırbistan'nın farklı bölgelerinde, ahududu, erik, kiraz, vişne, şeftali ve armut gibi meyve ağaçlarını enfekte eden *Pseudomonas syringae* strainlerinin genetik çeşitliliğini genomik DNA'ların *SpeI* makrorestriksiyon analizini Pulsed-Field Jel Elektrofrezisi (PFGE) ile tespit etmişlerdir. Erik ve kiraz izolatlarının birbirleri ile aynı profili ve *P. syringae* pv. *morsprunorum* ile benzer profiller göstermeleri hariç, analizler sonucunda izolatların çoğunluğun tek profil gösterdiğini belirtmişlerdir.

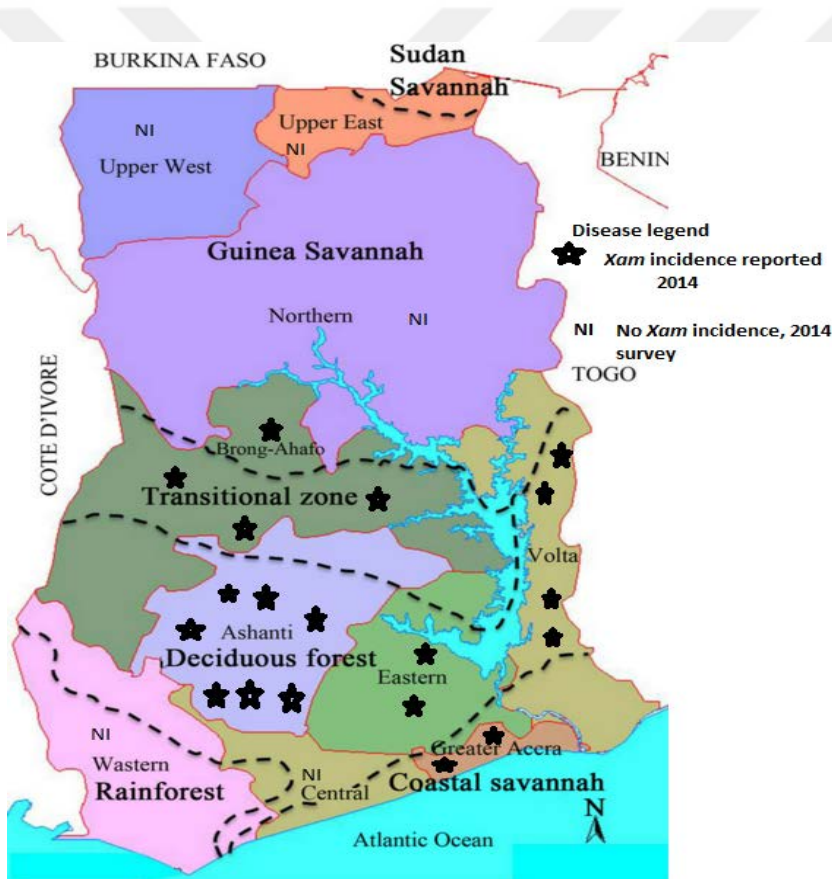
3. MATERYAL ve METOT

3.1. Çalışmada Kullanılan Bakteriyel İzolatlar

CBB semptomlarını gösteren kasava yaprak örnekleri, 2014 yılında Haziran, Temmuz ve Ağustos aylarında Gana'nın büyük (Ana) tarımsal-ekolojik alanlarından toplanmıştır. Gana'dan toplanan örnekler: yoğun yağmurlu ormanları, yarı yaprak döken ormanları, iklimsel geçiş bölgesi, Kıyı Sudan ve Gine Savannah bölgelerini kapsamaktadır (Şekil 3.1). Her bir bölge için toplanan kasava örneklerinin sayısı o bölgedeki hastalık şiddetinin derecesine dayanmaktadır. Örneklem yapılan kasava tarlalarının her birinde zikzak şeklinde rastgele örneklem yöntemi benimsenmiştir.

Hastalığın görüldüğü alanlarda hastalığın yaygınlığı (%) Bansal vd (1994) skalasına göre, aşağıdaki formül kullanılarak belirlenmiştir:

Hastalık yaygınlığı (%) (DI) = (Hastalıklı bitki sayısı / Toplam bitki sayısı) × 100



Şekil 3.1. Gana'nın büyük Agro-ekolojik bölgelerindeki Kasava Bakteri Yanıklık hastalığının coğrafik dağılımı

Örneklerin toplandığı yerlerin koordinatları GPS ile belirlenmiş ve aşağıdaki şekilde verilmiştir: Brong Ahafo- iklimsel geçiş bölgesi, Ashanti-Yarı yaprak döken ormanı, Greater Accra- Kıyı Savannası, Volta ve Gananın Doğusu (Doğu Gana)- Yarı-

yaprak dökken ormanı (Çizelge 3.1). Örnekler etiketlenerek, zarfların içerisine konulmuş ve patojen izolasyonu için laboratuvara getirilmiştir.

3.2. Kasava Bitkilerinden *Xam*'ın İzolasyonu

Gana'nın farklı tarımsal-ekolojik bölgelerinden toplanan semptomlu yapraklardan bakteriler izole edilmiştir (Çizelge 3.1). İzolasyon, Akdeniz Üniversitesi Bitki Koruma Bölümü Moleküler Bakterioloji Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Simptomatolojik dokular patojenin izolasyonu için kullanılmış ve izolasyon yöntemi (Bradbury 1970)'e göre yapılmıştır. Patojenin kolonisi, bakteri popülasyonları karışımı arasından seçilmiş ve *Xam* yarı seçici Cefazolin Trehalose Agar (CTA) (3,0 g K_2HPO_4 , 1,0 g NaH_2PO_4 , 0,3 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1,0 g NH_4Cl , 9,0 g D (+) - trehalose, 1,0 D (+) - glucose, 1,0 g maya özütü ve 14,0 g agar) ve Nutrient Agar (NA) ortamına inoküle edilmiştir. Petri kaplarının etrafı parafilm ile sarılarak 27 °C'de 3 gün inkübe edilmiştir. İzole edilen bakteri kolonileri daha önce Maraite (1993)'de belirtildiği gibi *Xam* olarak tanımlanmış, saf kültürler, çalışmalarda kullanılmak üzere -80 °C'de (%30'luk gliserol, 4,8 g Nutrient Broth) depolama ortamında saklanmıştır.

3.3. Patojenisite Testi

Patojenisite testi püskürtme ve enjeksiyon tekniklerini içeren iki inokülasyon yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiş ve patojenite testi için kullanılan bakteri süspansiyonu, CTA ortamında 24 saat taze bakteri hazırlanmıştır. Bakteri koloni süspansiyonu, petri plakalarından steril su kullanarak 10 ml'lik tüplere dökülmesi suretiyle elde edilmiş ve konsantrasyonlar, spektrofotometre (Eppendorf Biophotometer 6131, Almanya) ile OD_{600} değerinde ($OD_{600} = 0.3$) yaklaşık 1×10^8 cfu/ml'ye ayarlanmıştır. Su ıslatma (Water soaking) yöntemi, Gana'nın Ashanti Bölgesi, Adidwan köyü kasava üretim çiftliğinden elde edilen 1 yaşındaki sağlıklı ve duyarlı Esam kasava çeşitleri üzerinde yürütülmüştür. Bitkilerin yaprakları ve gövdelerine steril iğne yardımı ile delikler açılarak, yapraklara steril su yaprakları kaplayacak şekilde küçük püskürtme aleti ile püskürtülmüştür.

Bitkiler inokülasyondan sonra 24 saat süre ile sisleme odasında (%80-90 nemli ortamda) bekletilmiştir. Bu yöntem, bitkilerde iğne yardımı ile açılan deliklerin su ile dolmasına ve bakterinin kolay hareket etmesini sağlayarak bitki dokusuna daha çabuk yerleşmesini sağlamıştır. Daha sonra bitkiler, konsantrasyonu 1×10^8 cfu/ml'ye ayarlanmış bakteri süspansiyonu ile inoküle edilmiştir. İkinci yöntemde, kasava bitkilerinin yaprakları, 1 ml'lik bir plastik şırınga (26 G-0.45×13 mm-iğne) ile yaprakların mezofil boşluklarına konsantrasyonu 1×10^8 cfu/ml'ye ayarlanmış bakteri süspansiyonları enjekte edilmiştir. Pozitif kontrol patojen olarak kullanılan referans izolat (NCPPB 2965) da dahil olmak üzere izolatların her biri, enjeksiyon yöntemi ile ayrı ayrı her bir yaprağın üç farklı bölgesine inoküle edilmiştir. Sonra Koch postulatları uygulanmıştır. Kontrol olarak kullanılan Esam kasava bitkilerine bakteri süspansiyonu yerine destile su inoküle edilmiştir. Denemelerde kullanılan kasava bitkileri iklim odasında 30 °C'de hastalık gelişiminin izlenmesi için (16 saat, 8 saat aydınlık:karanlık koşullarda) bitkiler ölene kadar (6 hafta) olarak tutulmuşlardır.

Patojenisite testindeki izolatların şiddeti ve virülensliği, Wydra ve Verdier (2002); Wydra vd (1995); Wydra ve Msikita (1998)'in 1-5 skalası yardımıyla belirlenmiştir. Mevcut skala ya göre; 1= Simptom yok; 2 = Sadece köşeli lekeleri; 3 = Köşeli yaprak lekeleri, solgunluk, yanıklık, yaprak dökülmesi ve bazen gövdede/petiollerde irin akıntı 4 = Yapraklarda yanıklık, solgunluk, yaprak dökülmesi, irin akıntı ve gövde geriye ölüm; 5 = Yapraklarda yanıklık, solgunluk, yaprak dökülmesi, akıntı, geriye ölüm ve bitkide bodurluk (cücelik) şeklinde değerlendirilmiştir.

3.4. Elektron Mikroskop Analizi

Gana'dan toplanan *X. a. pv. manihotis* izolatlarının tespiti, berrak-saflaştırılmış örnek yüzey detay bilgisini ortaya çıkarabilen, tescilli, son derece hassas, düşük vakumlu ikincil elektron dedektörü ile donatılmış Hitachi TM3030 Plus masa üstü taramalı elektron mikroskopu (SEM) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.1. Real-Time PCR’da kontrol edilen *X. a. pv. manihotis* Gana izolatları ve yabancı izolat

İzolat Numarası	Konukçu	Bölge	Koordinatlar	Ülke ve İzolasyon yılı
AS 2/1	Kasava	Ashanti	N 7°14'7.4616", W 1°24'12.492"	Gana-2014
ASR3/1	"	"	"	"
ASR4/3	"	"	"	"
AS5/2	"	"	"	"
AS6/1	"	"	"	"
AS7/2	"	"	"	"
AS8/1	"	"	"	"
AS10/1	"	"	N 7°14'5.8056", W 1°24'10.854"	"
AS11/1	"	"	"	"
AS12/1	"	"	"	"
AS13/1	"	"	"	"
AS14/1	"	"	"	"
AS15/1	"	"	"	"
AS16/1	"	"	"	"
AS17/1	"	"	"	"
VR8	"	Volta	N 6°39'31.716", E 0°33'29.0232"	"
VR13	"	"	"	"
VR14	"	"	"	"
VR31	"	"	N 6°33'6.3108", E 0°39'39.9168"	"
BAR14	"	Brong Ahafo	N 7°44'49.56", W 2°5'45.5532"	"
BAR16	"	"	"	"
BAR29	"	"	N 8°4'45.6492", W 1°42'21.9168"	"
BAR30	"	"	"	"
ER15	"	Eastern	N 5°57'16.2216", W 0°6'54.4464"	"
ER 17	"	"	"	"
ER19	"	"	"	"
ER23	"	"	"	"
ER 26	"	"	"	"
GAR 13	"	G. Accra	N 5°56'43.9368", W 0°5'16.3464"	"
GAR 24	"	"	N 5°45'55.3212", W 0°19'35.472"	"
NCPPB 2965	"	Brazil		Brazil, 1973

3.5. *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*'in Klasik PCR İle Tanısı

Klasik PCR işleminde kullanılan bakteriyel süspansiyonların hazırlanması için -80 °C de stok kültürde bulunan *X. a* pv. *manihotis* strainleri Nutrient Agar (NA, Acumedia, USA) ve yarı seçici ortam, Cefazolin Trehalose Agar (CTA) (3,0 g of K₂HPO₄, 1,0 g of NaH₂PO₄, 0,3 g of MgSO₄·7H₂O, 1,0 g of NH₄Cl, 9,0 g D (+)-trehalose, 1,0 g D (+)-glucose, 1,0 g maya özütü , 14,0 g agar, 0,025 g cefazolin, 0,0012 g lincomycin, 0,0025 g phosphomycin ve 0,25 g cycloheximide) besi ortamı içeren petrilere inoküle edilmiş ve 27 °C'de 72 saat boyunca çoğaltılmıştır. Bu ortamda çoğaltılan bakteriler steril deiyonize su ile süspanse edilmiş ve bakteriyel konsantrasyonun 1×10⁸ cfu/ml olması sağlanmıştır. İnokulum konsantrasyonunun spektrofotometrik olarak saptanmasında Eppendorf Biophotometer 6131 kullanılmıştır. İnokulumun optik yoğunluğu 1×10⁸ cfu/ml'ye karşılık gelen OD₆₀₀ = 0,3 olacak şekilde ayarlanmıştır. *X. a.* pv. *manihotis* patojenlerinin Klasik PCR yöntemi ile tanısı kullanılan primerler, RST2/RST3 (*Xanthomonas* cinsi spesifik primer çifti) ve *Xam* variable number tandem repeat (VNTR)'lerin spesifik primer çifti (XaG1_67F/XaG1_67R) (Çizelge 3.2) de şekindedir.

Çizelge 3.2. Klasik PCR yöntemi ile *X. a.* pv. *manihotis* etmenin tanısı için kullanılan primerler

Bakteri	Primerler	Dizi	Referans
<i>X. a.</i> pv. <i>manihotis</i>	RST2,	5'- AGGCCCTGGAAGGTGCCCTGGA-3'	Schaad vd 2001
	RST3	5'-ATCGCACTGCGTACCGCGCGCGA-3'	
	XaG1_67F	5'- GTCGGCGCGATCGTCATG -3'	Arrieta-Ortiz vd 2013
	XaG1_67R	5'- GTTGC GG CACGCCAACCT -3'	

X. a. pv. *manihotis* patojenlerinin klasik PCR ile tanısı gerçekleştirilmesi amacıyla kullanılan PCR programı Çizelge 3.3'te gösterilmiştir.

Çizelge 3.3. *X. a.* pv. *manihotis* strainlerinin klasik PCR ile tanı ve tespitinin gerçekleştirilmesi amacıyla hazırlanan PCR programı

Aşama	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
Ön Denatürasyon	95	3dk	
Denatürasyon	95	20sn	
Bağlanma	65	30sn	35
Uzama	72	30sn	
Son Uzama	72	10sn	

Klasik PCR işleminde kullanılan PCR mastermix; toplam hacim 50 µL olacak şekilde 4 µL bakteriyel süspansiyon, primerlerin her birinden 1 µL, 8 µL dNTP karışımı, 5 µL 10× tampon çözelti, 3 µL MgCl₂, 0,25 µL *Taq* polimeraz ve 27,8 µL steril deiyonize saf su şeklindedir. Amplifikasyon için Techne TC-512 Gradient Thermal Cycler (Bibby Scientific Limited, Staffordshire, İngiltere) kullanılmıştır.

Elde edilen PCR ürünleri (10 µL), %2'lik agaroz jelde 70 voltta 130 dakika yürütülmüştür. Yürütme işleminde ve agaroz jelin hazırlanmasında TAE (Tris-Baz 4,84 g, Asetik Asit [Glasiyel] 1,02 ml, 0,5 M EDTA [pH: 8,0] 2 ml, ddH₂O 1000 ml) kullanılmıştır. Yürütme işlemi sonunda PCR ürünleri, etidyum bromür (0,5 µg/ml) ile 20 dakika boyanmış ve ultraviyole ışıktaki görüntülenmiştir. Görüntüleme için Vilber Lourmat SR 12575 transillüminatör ve BioCapt Version 11.02 programı kullanılmıştır.

3.6. DNA Dizilemesi ve Filogenetik Analiz

Amplifiye edilen klasik PCR ürünlerinin dizi analizleri RefGen (Gen Araştırma ve Biyoteknoloji Merkezi - Çankaya, Ankara- www.refgen.com) tarafından yapılmıştır. DNA dizileri Bioedit programı (versiyon 7.2.5) kullanılarak düzenlenmiş ve aligment (dizi doğrulama) yapılmıştır. Elde edilen diziler, BLASTn programı default parametreler kullanılarak GenBank veritabanındaki diğer *Xam* türleriyle benzerlik açısından analiz edilmiştir (Altschul vd 1990).

3.7. Primerler ve Probların Tasarlanması

Klasik PCR yöntemi ile amplifiye edilen dizilerden *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* patojenlerinin Real-Time PCR ile tanısı ve tespiti için özel primerler ve problar tasarlanmıştır (Çizelge 3.4; Şekil 3.2). Çalışmada kullanılan LNA prob (Çizelge 3.4; Şekil 3.2), bugün Real-Time PCR sistemleri için sıklıkla kullanılan 25-30 nükleotidlik uzun problardan farklılık göstermektedir. LNA problar 8-9 nükleotid uzunluğunda, fakat sahip olduğu son teknolojik özellikler nedeniyle uzun dizilere sahip problar kadar güvenilir ve hassas sonuçlar vermektedir. Bu çalışmada kullanılan problar için raportör boya fluorescein amidit (FAM), baskılayıcı boya ise karboksitetramethylrodamin (TAMRA) dır.

Çizelge 3.4. Real-Time PCR yöntemi ile *X. a. pv. manihotis*'in tanısı için geliştirilmiş primer seti ve prob dizileri

ETMEN	PRİMER DİZİSİ	PROB DİZİSİ
<i>X. a. pv. manihotis</i>	HBXamL 5'-CTTGCCTGTTGCCATAACG-3'	5' CCTGCTCG 3'
	HBXamR 5'-ACGTCGCTTTCGTGCAAT-3'	

ATCGGGGCGCGGCGTGTCTGGTATCGGTATCGGTATCGGTGTCGGTGTCGGCCTCGGCGTCTGGTGTCTGGTGTCT
GGTGTCTGGTGTCTGGTGTCTGGTGTCTGGTGTCTGGTGTCTGGTGTCTGGTGTCTGGTGTCTGGTGTCTGGTGTCTGGTGTCT
CGGGAAGCCTACCGCCGACGGACGGGTGATTGCTGGCAGGGCTGTCCACAGGCGGTGCGTGGGAAAGCGG
GGCGCGCGAGGCCGATGCGTGCCTCGGGAAGTGTGACGGCCGGCACATCGCCGCGGCGCTCTCCGCTT
GACCTGTTGCCATAACGCTTCTGCTCGCCACGCAACGCGTCCAACGACGTGCCGGCAGTACGCGCCTGC
GCCTCCATTGCACGAAAGCGACGTTCGAATTCAGG

Şekil 3.2. Real-Time PCR’da *X. a. pv. manihotis*’nin tanısı için kullanılan HBXamL ve HBXamR primerlerinin ve probun lokus dizisi üzerindeki bağlanma yerleri (Yeşil renk: Real-Time PCR primerlerini, Kırmızı renk: Probu temsil etmektedir)

3.8. Real-Time PCR Optimizasyonu

X. a. pv. manihotis'in Real-Time PCR ile kısa sürede tanılarının gerçekleştirilmesi amacıyla Real-Time PCR programı Çizelge 3.5'te verilmiştir. Her bir Real-Time PCR işleminde, toplam hacim 27,6 µL olacak şekilde 2 µL bakteriyel süspansiyon ya da kalıp DNA, 1,2 µl primer (herbirinden ayrı ayrı), 0,3 µL TaqMan prob, 4,8 µL dNTP karışımı, 3 µL 10x tampon çözelti, 7,2 µL MgCl₂, 0,36 µL Taq polimeraz ve 9,54 µL steril deiyonize su kullanılmıştır. Çalışmada Cepheid Smart Cycler II Real-Time PCR cihazı ve Cepheid Smart Cycler programı V.2.0c programı kullanılmıştır.

Çizelge 3.5. Real-Time PCR optimizasyonu sonucunda *X. a. pv. manihotis* strainleri için oluşturulan Real-Time PCR programı

Aşama	Sıcaklık (°C)	Süre (Saniye)	Döngü Sayısı
Ön Denatürasyon	94	120	1
Denatürasyon	94	10	
Bağlanma	61	10	35
Uzama	72	10	
Son Uzama	72	120	1

3.9. Primerler ve Probların *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* Strainlerine Özgüllüğünün Belirlenmesi

Xanthomonas axonopodis pv. *manihotis* patojenine özel tasarlanan primerler ve probalar kullanılarak kültür koleksiyonunda bulunan *X. a.* pv. *malvacearum*, *X. a.* pv. *vitians*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*, *Xylella fastidiosa*, *Erwinia amylovora* bakteriyel süspansiyonun hazırlanması için -80 °C de stoklanan *X. a* pv. *manihotis* patojenlerine özel tasarlanan primerler ve probalar kullanılarak kültür koleksiyonunda bulunan diğer bakteri strainlerinin (Çizelge 3.6), NA besi ortamı içeren petrilere inoküle edilmiş ve 27 °C’de 72 saat boyunca çoğaltılmıştır. NA besi ortamında çoğaltılan bakteriler steril deiyonize su ile süspanse edilmiş ve bakteriyel konsantrasyonun 1×10^8 cfu/ml olması sağlanmıştır. Süspansiyon konsantrasyonunun spektrofotometrik olarak saptanmasında Eppendorf Biophotometer 6131 (Eppendorf AG, Hamburg, Almanya) kullanılmıştır.

Süspansiyonun optik yoğunluğu 1×10^8 cfu/ml'ye karşılık gelen OD₆₀₀ = 0,3 olacak şekilde ayarlanmıştır. Her strainden elde edilen süspansiyondan 2 µL alınarak Real-Time PCR işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.10. Primerler ve Probların Saf DNA'dan Hassasiyetinin Belirlenmesi

Xanthomonas axonopodis pv. *manihotis* patojenin Real-Time PCR ile tespit edilecek en düşük DNA miktarının tespiti için saf DNA'dan hassasiyet çalışması yapılmıştır. Çalışma için Kanada yer alan *X. a.* pv. *manihotis* strainlerinden faydalanılmıştır. DNA izolasyonunda Thermo FastPrep FP120A-230 multi tüp homojenizatör (Thermo Scientific, MA, ABD) ve Qbiogene/BIO101 FastDNA moleküler izolasyon kitini (MP Biomedicals, Kaliforniya, ABD) içeren kombine sistem kullanılmıştır. *X. a.* pv. *manihotis* patojenlerinden izole edilen DNA'nın saflığı ve nanogram düzeyinde konsantrasyonun belirlenmesinde Thermo NanoDrop ND-1000 spektrofotometre (Thermo Scientific, Massachusetts, ABD), pikogram düzeyinde konsantrasyonun belirlenmesinde Invitrogen Qubit florometre (Invitrogen, Kaliforniya, USA) kullanılmıştır. Real-Time PCR yönteminin hassasiyetinin belirlenmesinde *X. a.* pv. *manihotis* için 51 pg, 40 pg, 34 pg, 20 pg ve 13 pg DNA seviyeleri test edilmiştir. Pikogram düzeyine kadar seyreltmeler için steril deiyonize su kullanılmıştır. Elde edilen her bir seviyedeki DNA'lardan 2 µL alınarak Real-Time PCR işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.11. Direkt Bakteriyel Hücreden Primerler ve Probların Hassasiyetinin Belirlenmesi

Xanthomonas axonopodis pv. *manihotis* Real-Time PCR ile tespit edilecek en düşük bakteri sayısının tespiti için, patojenler kültür koleksiyonundan alınıp CTA besi ortamında geliştirilmiş, kolonilerden yoğun bir stok çözelti hazırlanmıştır. Oluşturulan stok çözeltiden 10^{-1} 'den 10^{-10} 'a kadar 10'un katları şeklinde seyreltmeler 3 tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiş ve bunlar ayrı ayrı tüplere konulmuştur. Elde edilen her bir solüsyondan 2 µL alınıp Real-Time PCR işlemi için kullanılmıştır. Bu aşamada Real-Time PCR ile tespit edilecek en düşük bakteri sayısının tespiti hedeflendiğinden 10^{-1} 'den 10^{-10} 'a kadar seyreltilen ve ayrı tüplere alınan süspansiyonlardan 2 µL alınıp 48 µL steril deiyonize su içerisinde karıştırılmış ve CTA besi ortamlarına steril yayma çubuk ile inokule edilmiştir. İnokulasyondan sonra besi ortamlarında gelişen bakteri sayılarını tespit etmek için petrilere 4 gün boyunca 27 °C'de inkübasyona bırakılmıştır.

3.12. Primerler ve Probların Seçiciliğinin Belirlenmesi

Xanthomonas axonopodis pv. *manihotis* için geliştirilen primer ve problemlerin özgüllüğünü belirlemek için her primer prob seti ilk olarak diğer *Xanthomonas* patojenlerine karşı test edilmiş daha sonra farklı diğer bitki patojeni bakteri türleri kullanılmıştır (Çizelge 3.6). Real-Time PCR işleminde kullanılan bakteriyel süspansiyonların hazırlanması için -80 °C'deki stok kültürde bulunan izolatlar (Çizelge 3.6), NA besi ortamı içeren petrilere aktarılmış ve 27 °C'de 72 saat boyunca çoğaltılmıştır. Bu ortamlarda çoğaltılan kolonilerden biri seçilerek steril deiyonize su ile süspansiyon edilmiştir. Bakteriyel konsantrasyonun 1×10^8 cfu/ml olması sağlanmıştır. Süspansiyonun konsantrasyonunun spektrofotometrik olarak saptanmasında Eppendorf

Biophotometer 6131 kullanılmıştır. Süspansiyonun optik yoğunluğu 1×10^8 cfu/ml'ye karşılık gelen $OD_{600}=0,3$ olacak şekilde ayarlanmıştır. Her strainden elde edilen süspansiyondan 2 µL alınarak Real-Time PCR işlemi gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.6. Real-Time PCR'da kullanılan farklı *Xanthomonas* türleri ve diğer bitki patojeni bakteri türleri

Bakteri Türü	Orijin	Konukçu	Referans
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i>	Almanya	Pamuk	DSM 306
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	Türkiye	Biber	Basım 1999
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vitians</i>	Türkiye	Lahana	Basım 2008
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	Türkiye	Fasulye	Basım 2008
<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i>	Türkiye	Karpuz	Basım 2008
<i>C. michiganensis</i> subp. <i>michiganensis</i>	Türkiye	Domates	Basım 2008
<i>Dickeya chrysanthemi</i>	Almanya	Domates	Burkholder vd 2005
<i>Erwinia amylovora</i>	Türkiye	Armut	Basım 2011
<i>Pseudomonas tomato</i> pv. <i>tomato</i>	Türkiye	Domates	Basım 2004
<i>Rhizobium vitis</i>	Türkiye	Asma	Basım 2015
<i>Xylella fastidiosa</i>	Türkiye	Asma	Basım 2009

3.13. *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*'in Hastalıklı Bitki Dokularından Tespiti

Real-Time PCR ile hastalıklı bitki dokularından *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*'nin doğrudan tespiti için 3 yıllık duyarlı Esam kasava bitkisine patojenlerin inokulasyonu yapılmış ve çalışma 3 tekerrürlü olarak yürütülmüştür. Çalışmada -80 °C'deki stok kültürde yer alan *X. a.* pv. *manihotis* izolatları CTA besi ortamı içeren petrilere inoküle edilmiş ve 27 °C'de 72 saat boyunca inkübe edilmiştir. CTA'da geliştirilen bakteriler steril deiyonize su ile süspanse edilmiş ve bakteriyel konsantrasyonun 1×10^8 cfu/ml olması sağlanmıştır. İnokulum konsantrasyonunun spektrofotometrik olarak saptanmasında Eppendorf Biophotometer 6131 kullanılmıştır. İnokulum optik yoğunluğu 1×10^8 cfu/ml'ye karşılık gelen $OD_{600}=0,3$ olacak şekilde ayarlanmış ve sağlıklı Esam kasava bitki yapraklarına injekte edilmiştir. Bitkiler, hastalığın seyri için iklim odalarına (Bitki Koruma Bölümü kontrollü iklim odaları) aktarılmıştır. İnoküle edilen bitkiler, semptomların gelişmesi için ortam sıcaklığı 30 °C'sıcaklıkta %50-70 nisbi nemde inkübe edilmiştir. Bitkiler inkübasyon sürecinde, günde 12 saat boyunca aydınlatılmıştır.

Kasava Bakteriyel Yanıklık hastalığı belirtilerinin gözlenmesi etmenlere göre değişiklik göstermiştir. Kasava Bakteriyel Yanıklık hastalığının gözlenmesinin ardından, inokulasyondan 2 hafta sonra yanıklık belirtisi gösteren hastalıklı yapraklar %70' lik etanol ile yüzey sterilizasyonuna tabi tutulmuştur. Yanıklık belirtili hastalıklı yapraklar steril bir ortamda fosfat tampon çözeltisi eşliğinde ezilerek parçalanmış, patojenlerin fosfat tampona ($NaCl_2$ 7,2 g, Na_2HPO_4 1,48 g, K_2PO_4 0,43 g, ddH₂O 1000 ml) geçmesi sağlanarak hastalıklı bitki dokularından tespit için kullanılacak stok solüsyonlar hazırlanmıştır. Hazırlanan stok solüsyonlarda bitki kaynaklı PCR inhibitörü maddelerin konsantrasyonları uygulanacak PCR işlemlerinin başarılarını

etkileyebileceğinden stok solüsyonlar 3 kat seyreltilerek birer solüsyon daha hazırlanmıştır. Her solüsyondan 2 µL alınarak Real-Time PCR işlemleri yapılmıştır.

Kasava bitkisi total DNA'sı ile tasarlanan primer ve probaların herhangi bir amplifikasyon oluşturup oluşturmadıklarını kontrol etmek için sağlıklı bitkilerden örnek alınarak bitki total genomik DNA izolasyonu yapılmış ve çalışmada bitki total genomik DNA'sı da kontrol edilmiştir. Kasava bitkilerinden izole edilen DNA'nın saflığı ve nanogram düzeyinde konsantrasyonun belirlenmesinde Thermo NanoDrop ND-1000 spektrofotometre kullanılmış ve bitki DNA konsantrasyonu yaklaşık 100-150 ng/µL olacak şekilde seyreltilmiştir.

3.14. Pulsed-Field Jel Elektroforezis

3.14.1. Agaroz bloklarda genomic DNA'nın hazırlanması

Bu çalışmada kullanılan bakteriyel *Xam* NA'da geliştirilmiştir. Daha sonra kültürler NB'de 28 °C'de ve çalkalayıcıda (150 rpm) 24 h geliştirilmiştir. *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (*Xam*), oda sıcaklığında steril musluk suyunda ve -70 °C de %30 gliserol' de saklanmıştır.

Xam Gana izolatları 27 °C'de ve çalkalayıcıda 3 ml NB içeren tüplerde 24 h geliştirilmiştir. Süspansiyon 600 nm ışık dalga boyunda optik yoğunluğu bir spektrofotometre ile (Nanodrop Thermo ND-1000, Thermo Scientific, Massachusetts, USA) 100 ng/ µL (OD₆₀₀= 0,3) ayarlanmıştır. Hücreler 2 dakika (dk) 14.000 rpm (16000 x g)' de çöktürülerek, sonra 1 ml steril deiyonize suda yıkanmıştır ve 2 dk 14.000 rpm' de santrifüj edilerek tekrar bakteriyel hücrelerin çökmesi sağlanmıştır. 500 µL' lik TE buffer (10 mM Tris-HCl pH: 8.0, 1 mM EDTA pH: 8.0) süspansiyonunda çöktürülen bakteriyel hücreler tekrar süspansiyonu elde edildikten sonra 55 °C' de tutulan ve 1M Tris-HCl pH: 8.0, 1 M MgCl₂, 250 mM EDTA pH: 8.0 içeren steril deiyonize suda hazırlanan eşit hacimdeki %2' lik düşük erime noktasına sahip (LMP) agaroz ile karıştırılmıştır. Bu hücre süspansiyon-agaroz karışımı, PFGE taraklarına pipet ile aktarılmış ve blokların donmasını sağlamak amacıyla 4 °C'de 20 dk tutulmuştur. Agaroz blokları lizis solüsyonu (steril suda 250 nM EDTA pH; 9.5; %25 N-lauroylsarcosine ve 1 mg/ml Proteinase K) içinde 50 °C'de 20 h için lizis edilmiştir. Daha sonra agaroz blokları 40 °C'de 250 mM EDTA (pH 8.0) içinde saklanmıştır.

3.14.2. Restriksiyon endonükleaz kesimleri

Spesifik kesim bölgeleri için seçilen *SpeI* enzimi kullanılmıştır. Bakteriyel genomik DNA içeren agaroz bloğu 5 ml TE buffer içinde 30 dk yıkanmıştır. Daha sonra agaroz bloğu içeren tüpe 5 ml TE buffer eklenmiş ve 2 h iki kez daha yıkanmıştır. Bloğun yıkanmasından sonra alkol ile steril edilmiş olan kesici ile bloktan 2 mm' lik bir kesit alınmıştır. Bloklar, restriksiyon enzimlerine ait 200 µL 1x buffer içeren mikrofüj tüplerine aktarılmıştır. 15 dk sonra bu buffer taze buffer ile yer değiştirilmiş ve ilgili restriksiyon enzimleri ile uygun koşullarda (37 °C de gece boyunca) kesim yapılmıştır.

Agaroz jellerdeki DNA fragmentlerinin ayrımı Bio-Rad CHEF- DR III (Contour-Clamped Homogeneous Electric Field) kullanılarak (Chu vd 1986) yapılmış ve %1 Sea-

Kem agaroz 0.5x TBE buffer (45 mM Tris-HCl, 45 mM Borik asit, 1 mM EDTA pH: 8.0)'da hazırlanmıştır.

Kesimden sonra bloklar, 55 °C'de 2 h bekletilen 500 µL yıkama solüsyonu (steril deionize suda hazırlanan 250 mM EDTA pH: 9.5, %25 N- laurolysarcisine) ile yıkanmıştır. Bloklar %1'lik agaroz jele yerleştirilmeden önce 2 h 500 µL yıkama solüsyonu ile bir kez daha yıkanmıştır. Agaroz bloklar çukurlara yerleştirilmiştir ve bu çukurların üzeri 65 °C sıcaklıktaki %2 lik LMP agaroz ile kaplanmıştır. Jel daha sonra yürütme boyunca 14 °C sıcaklığa düşürülen ve 1.6 L 0.5 x TBE buffer içeren Bio-Rad CHEF-DR III ünitesine yerleştirilmiştir.

SpeI enzim tarafından kesilen DNA fragmentlerini içeren jeller 22 h ve 200 volt (V) da 5 saniyeden (s) 45 saniyeye kadar değişen pulse süreleri kullanılarak yürütülmüştür. Jellerde markır olarak yeast *Saccharomyces cerevisiae* PFGE marker (Bio- Rad) kullanılmıştır.

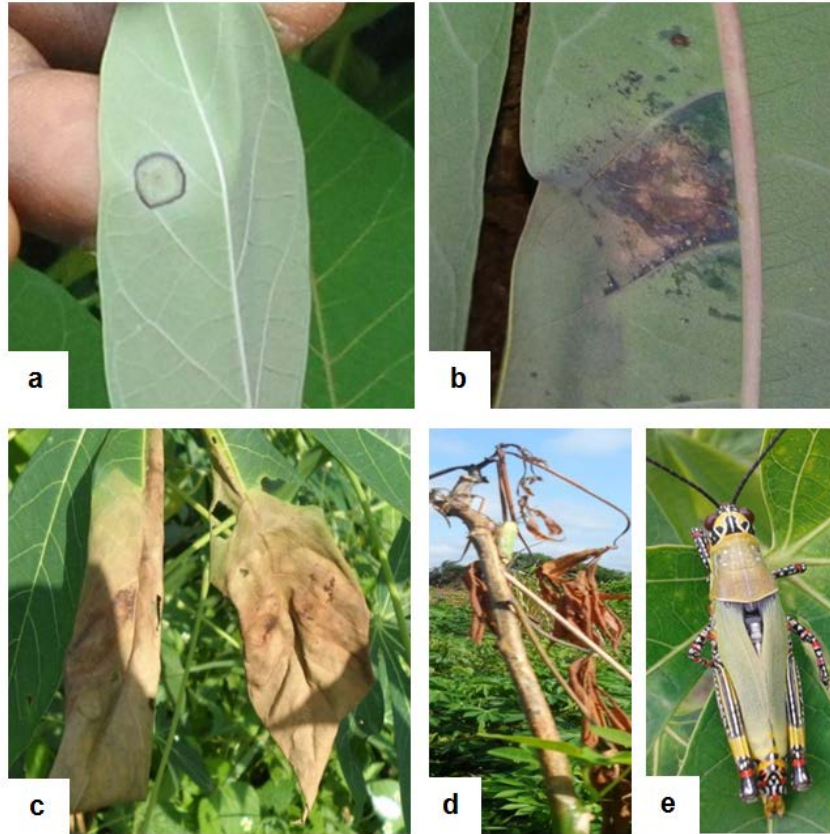
Jeller yürütüldükten sonra 30 dk 0.5 µg/ml Etidiyum Bromide (EtBr) içeren deionize su ile boyanıp UV altında görüntülenmiştir.

3.14.3. Genomik DNA parmak izlerinin analizi

DNA parmak izleri ve DNA parçası ölçüleri Vilber Lourma Biyo-Gen (11.04 versiyon) jel görüntüleyici yazılım (Marne-la-Vallee Cedex 1-Fransa) kullanılarak doğrudan jel görüntülerinden analiz edilmiştir. Moleküler Analizler, Parmak İzi Biyoprofil versiyon 10.03 yazılımı (Bio1D++, Bio1D ve Biyogen) kullanılmış DNA ve fragment ölçülerinin yokluğuna ya da varlığına dayanılarak değerlendirilmiştir. PFGE parmak izlerinin aritmetik ortalama (UPGMA) (Sneath ve Sokal 1973) analiziyle birlikte dendogram ağırlıksız çift-grup yöntemi dahil eşleşen bütün parmak izlerinin analizi, benzerlik matrislerinde ortaya çıkan profillerin kıyaslanması için %1,0 –1,5 arasında oynama payı penceresiyle Dice'nin katsayısı ($2a / (2a+b+c)$) (Dice 1945) kullanılarak yapılmıştır.

4. BULGULAR

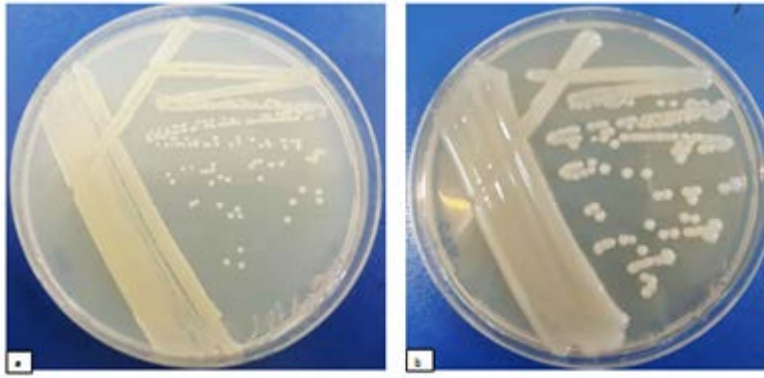
Araştırma sonuçları beş bölgede CBB'nin varlığını ve gelişimini doğrularken ve simptomlar ıslak köşeli yaprak lekelerini, yanma sapın damarsal nekrozu, solma yaprak dökümü ve sapın uçtan itibaren tepe kurumasını kapsamaktadır (Şekil 4.1 a, b, c, d). Aynı zamanda CBB patojeninin bir vektörü olan *Zonocerus variegatus*'un bir resmi de Şekil 4.1'de gösterilmiştir. Hastalık yayılımı, etkilenen simptomatik yaprakların oranı olarak belirlenmiştir. Ashanti ve Volta bölgelerinin (Gana'nın yarı yaprak döken ormanı) sırasıyla %70 ve %60 olmak üzere en yüksek CBB şiddetine sahip olduğu görülmüştür. Brong Ahafo bölgesi (derin denizle sığ deniz arasındaki bölge), Doğu bölgesi (Yarı yaprak döken ormanın bir bölümü) ve Büyük Accra bölgesi (kıyı savanası) sırasıyla %40 ve %20 şiddet göstermişlerdir. Gana'nın bütün bölgelerinde kasava yetiştirilmektedir, ancak üretimi Gana'nın Ashanti, Brong Ahafo, Orta, Doğu ve Volta bölgelerinde daha yüksektir. Bu nedenle, Yukarı Batı ve Doğu Bölgeleri araştırmaya dahil edilmemiştir. Belirti gösteren kasava yaprağı örneklerinden toplam 32 adet CBB izolatu elde edilmiştir.



Şekil 4.1. Kasava bitkisinde tipik CBB belirtileri (a) Başlangıç simptomsu; (b) Açılı yaprak lekeleri; (c) Yaprak yanıklığı; (d) Geriye doğru ölüm; (e) Patojenin vektörü *Zonocerus variegatus* (çekirge) zararlısı

4.1. Bakterinin Kasava Bitkilerinden İzole Edilmesi

Nutrient Agar (NA) ve Cefazolin Trehalose Agar (CTA) ortamında kolonilerin incelenmesi ile morfolojik analiz yapılmıştır. CTA ve NA ortamında varsayılan bakteriyel koloni büyümesi 27 °C’de 24 h inkübasyondan sonra saptanmıştır. İnkübasyonun ilk aşamasının büyüme özelliği, büyümenin sonraki aşamasında görülen bulanık ve vizkoz olan şeffaf görünümdür. Koloniler beyazımsı griden kremi renge doğru, dairesel, parlak, dış bükey, hafif kabarık ve pürüzsüzdür. Koloni çapı CTA ortamında yaklaşık 2 mm ve NA ortamında 1 mm olarak ölçülmüştür. CTA ortamındaki koloninin gelişme oranları, nispeten daha küçük, yavaş büyüyen ve saprofitler nedeniyle çoğu durumda aşırı büyümüş koloniler yüzünden ayırte dilmesinin çok zor olduğu NA ortamına kıyasla daha yüksek ve serbest olmuştur (Şekil 4.2).

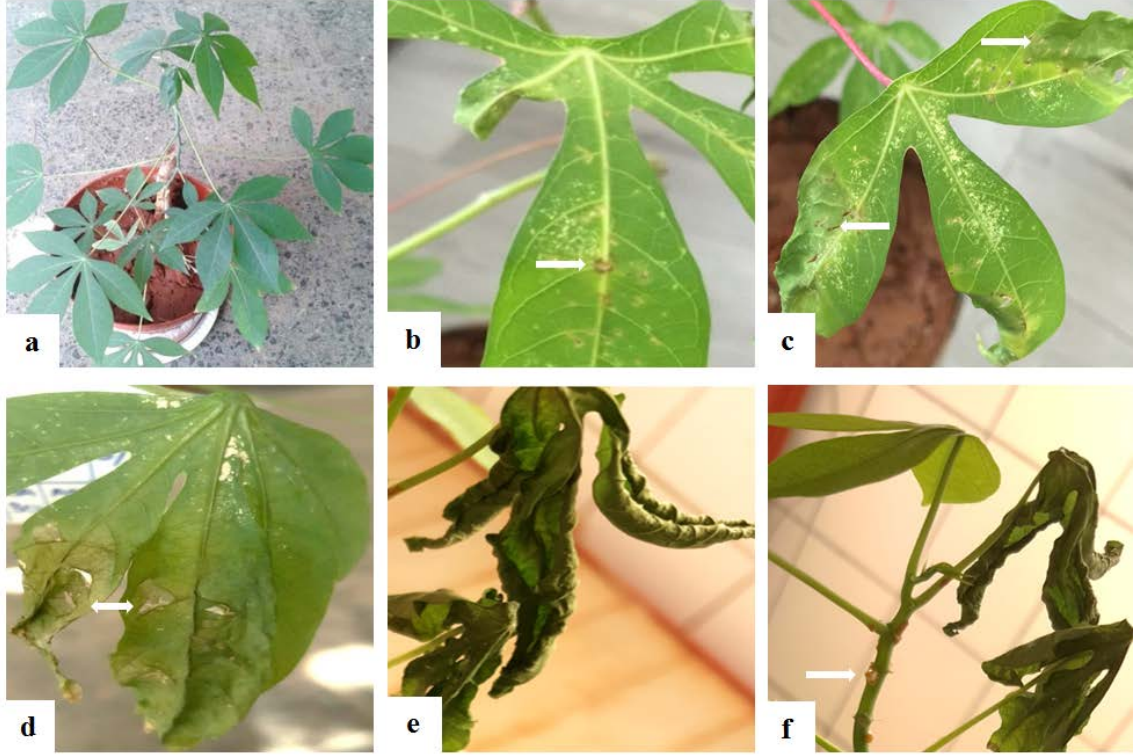


Şekil 4.2 (a) Nutrient Agar (NA) ve (b) Cefazolin Trehalose Agar (CTA) besi ortamında *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*’in koloni gelişimi

4.2. Esam Kasava Bitkilerinde *Xam* İzolatlarının Patojenisite Sonuçları

Esam kasava bitkilerine aşılaman 32 *Xam* izolatın patojenik olduğu tespit edilmiştir. CBB’nin ilk belirtilerinin, *Xam* aşılamasından sonra beşinci günde, küçük, düzensiz, suda haşlanmış gibi görünen, köşeli yaprak lekeleri şeklinde gözlemlenmiştir. Aşılama 2 hafta sonra lekeler birleşerek yaprak yanıkları oluşturmuş, yanıklıklar yaprak kenarından başlamış ve yaprak sapına doğru ilerlemiştir. Aşılama 2 hafta sonra iki veya 3 hafta içinde bakteriyel balçık irin akıntı gözlemlenmiş ve sonra bitkiler solmuştur. Çalışmada kullanılan iki aşılama yöntemi arasında farklılık olduğu belirlenmiştir. Enjeksiyon yönteminin sprey yönteminden daha etkili olduğu saptanmıştır. Çünkü sprey yöntemiyle belirtiler aşılama 2 hafta sonra gözlemlenirken, enjeksiyon yöntemiyle olan aşılama 2 hafta sonra suda haşlanmış gibi görünen belirtiler ortaya çıkmıştır. Bakteriyel süspansiyon enjekte edilmiş kasava bitkilerinin belirtiler şiddeti spreylenmiş bitkilerden daha belirgin olmuştur. Kullanılan şiddet ve virülans skalalarına göre, Esam kasava bitkilerine aşılaman bütün izolatlar arasında virülansta gözlemlenebilir farklılıklar olmamıştır. Negatif kontrol olarak steril suyla işlem görmüş kasava yaprakları gözle görülür herhangi bir belirtiler göstermemiştir (Şekil 4.3). Belirti gelişimi deneme sonlandırılmadan önce iki ay boyunca kayıt altına alınmıştır. *Xam* büyümesi ve gelişmesi için iklim odasında uygun sıcaklık 30 °C’dir (Maraite ve Perreux 1979). Çalışma sonlandırıldıktan sonra, belirtiler

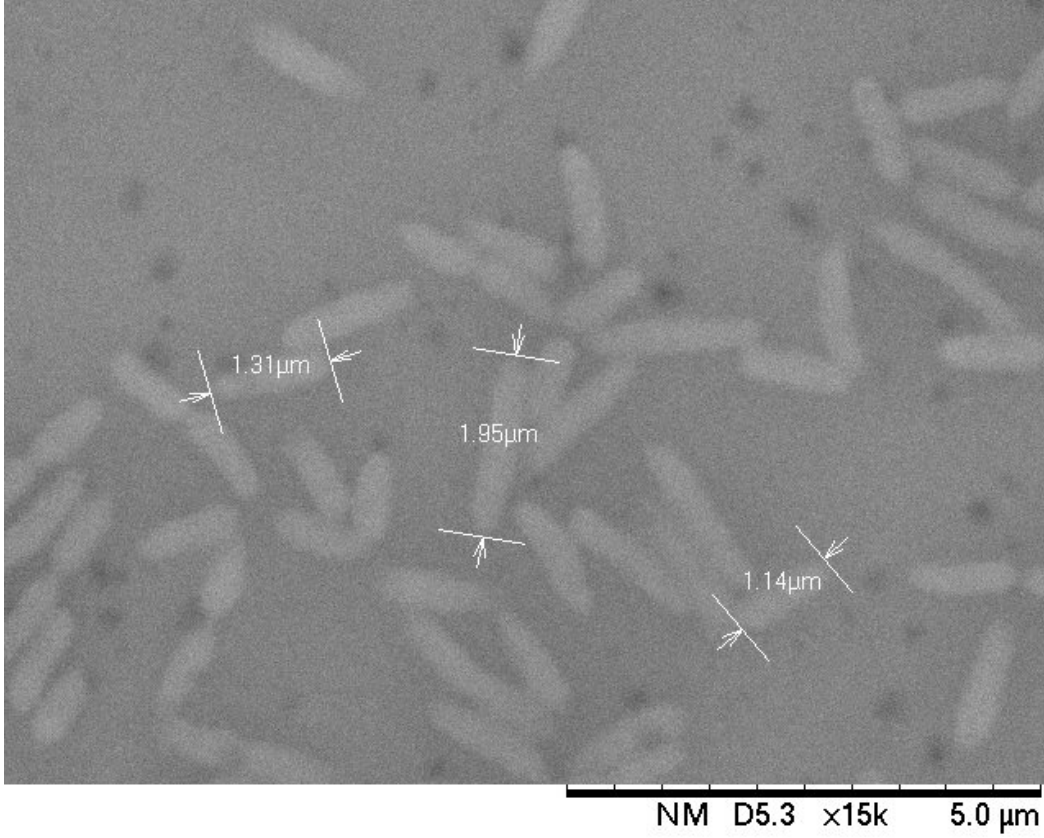
gösteren yapraklar toplanmış ve varsayılan bakteri devamlı olarak yeniden izole edilmiştir, böylece Koch postulatları yerine getirilmiştir.



Şekil 4.3. Kasava Bakteriyel Yanıklık hastalığı etmenin *X. a. pv. manihotis*'in kasava bitkilerine inokulasyonundan bir 6 hafta sonra yaprakta ve gövdede meydana gelen belirtiler: (a) Sağlıklı bitki (Negatif kontrol); (b) Düzensiz suya batmış açısallık yaprak lekeleri (püskürtme yöntemi); (c) Köşeli noktalar ve yanıklık yaprakları (püskürtme yöntemi) (d) Düzensiz suya batmış açısallık yaprak lekeleri (Enjeksiyon yöntemi); (e) Yaprak yanıklığı ve solma (Enjeksiyon yöntemi); (f) Yaprak solması ve gövdede bakteriyel eksudatlar (Enjeksiyon yöntemi)

4.3. Elektron Mikroskop Analizi

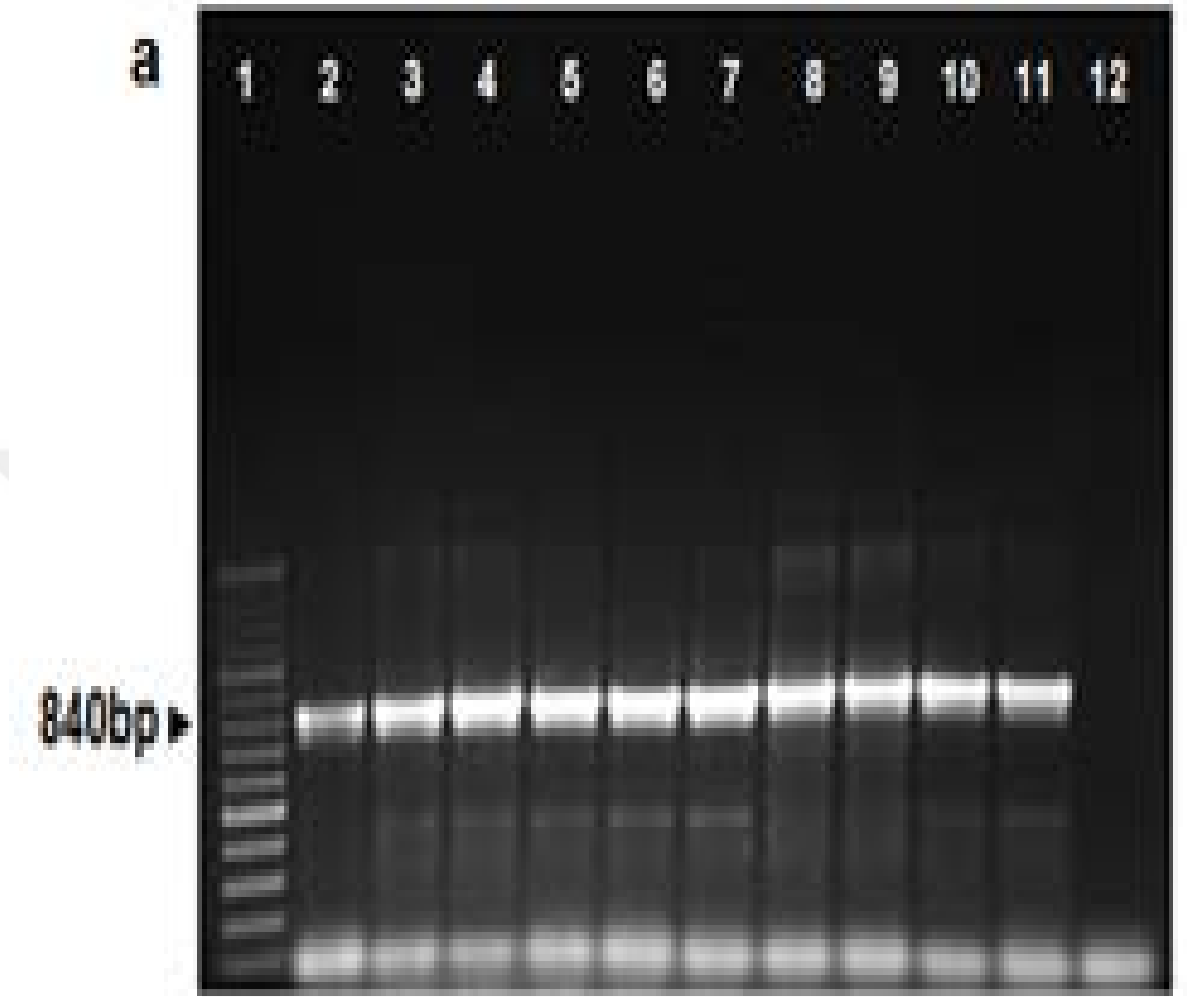
X. a. pv. manihotis'in SEM analiz sonuçları, patojenin ayrıntılı yapısını ortaya koymuştur ve bakterinin ortalama uzunluğu 1.49 μm ve çapı 367.3 nm olarak tespit edilmiştir. Analiz, Gram boyamadan sonra gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.4).



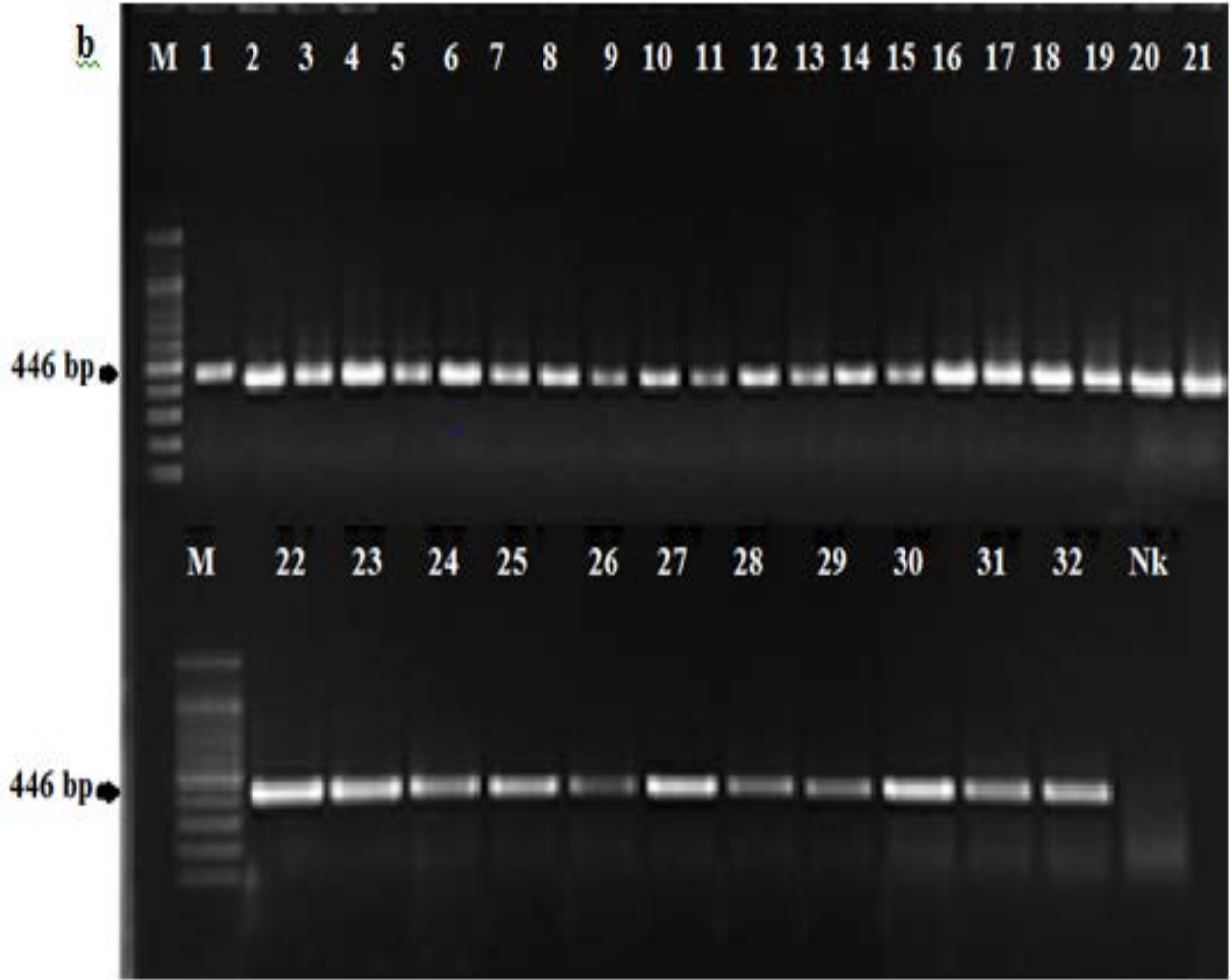
Şekil 4.4. *X. a. pv. manihotis*'in SEM analiz sonuçları

4.4. *X. a. pv. manihotis*'in Klasik PCR ile Tanısı

X. a. pv. manihotis'nin Klasik PCR ile tanısını gerçekleştirmek için *Xanthomonas* cinsi spesifik; RST2/RST3 (Schaad vd 2001) ve *X. a. pv. manihotis* variable number tandem repeat (VNTR); XaG1_67F/XaG1_67R (Arrieta-Ortiz vd 2013), primer setleri ile amplifiye edilmiştir (Şekil 4.5 a; 4.5 b).



Şekil 4.5 a. *X. a. pv. manihotis* izolatlarının PCR amplifikasyonunun agaroz jeli (a) *Xanthomonas*'a özgü primer (840 bp). 1: 100 bp marker; 2: *Xam* referans strain NCPPB 2965 3-5: Ashanti bölgesi izolatları 6-7: Volta bölgesi izolatları 8-9: Brong Ahafo bölgesi izolatları 10: Doğu bölgesi izolatları 11: Greater Accra izolatları 12: Negatif kontrol.



Şekil 4.5. b. VNTR lokus primeri (446 bp). M = 100 bp marker; 1: *Xam* referans strain, 2-16: Ashanti bölgesi izolatları 17-21: Volta bölgesi izolatları 22-25: Brong Ahafo bölgesi izolatları 26-30: Doğu bölgesi izolatları 31-32: Greater Accra izolatları, Nk-Negatif kontrol

4.5. DNA Dizilemesi ve Filogenetik Analiz

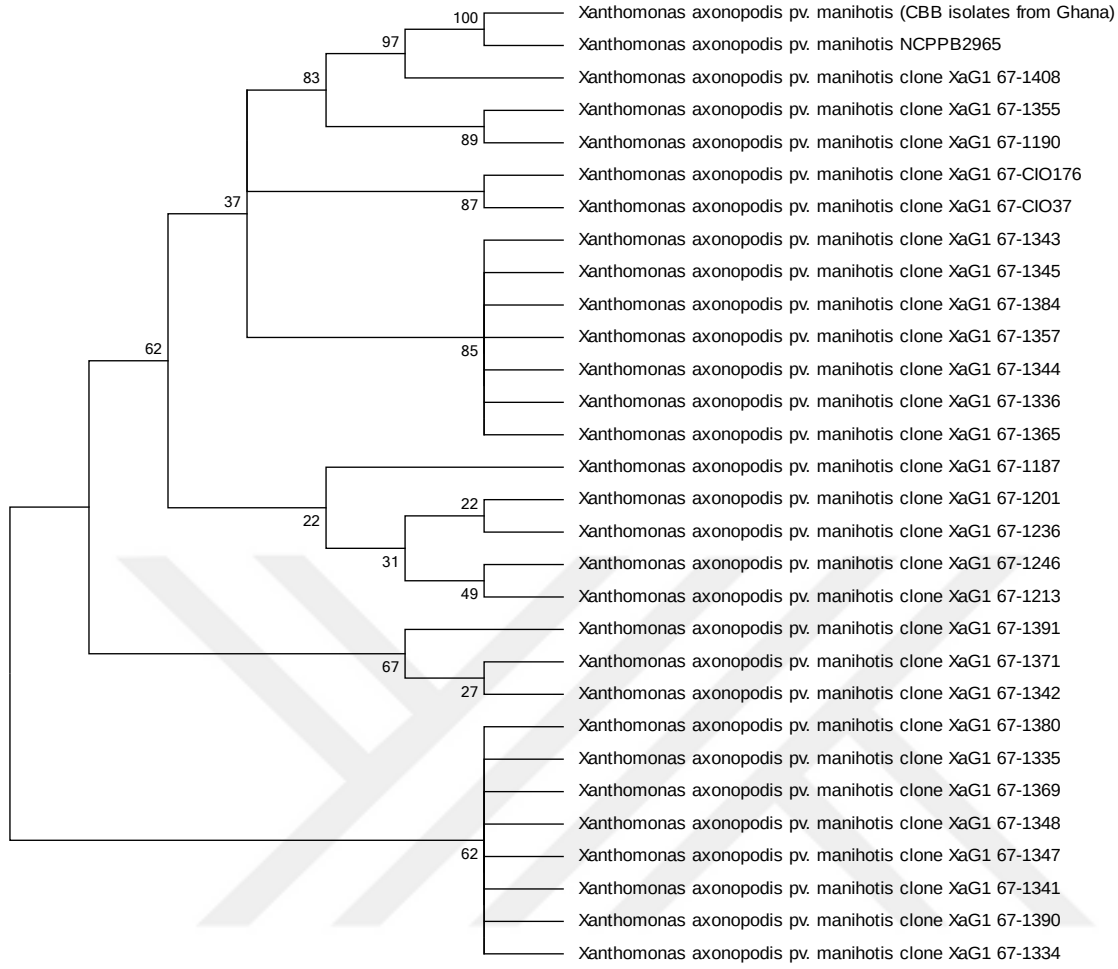
VNTR analizi sonucunda dizilenen amplikonun BLAST analizi, GenBank nükleotit veri tabanından elde edilen strainler ile %93 ile %100 arasında homoloji ortaya koymaktadır (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. *Xam*'in GenBank nükleotid benzerliği

<i>Xam</i> türleri	VNTR dizi	Erişim numarası	GenBank Benzerlik
<i>X. a. pv. manihotis</i>	Mikrosatellit	Bu çalışmada	100%
<i>X. a. pv. manihotis</i>	Mikrosatellit	KJ737369.1	99%
<i>X. a. pv. manihotis</i>	Mikrosatellit	KJ737331.1	94%
<i>X. a. pv. manihotis</i>	Mikrosatellit	KJ737283.1	93%
<i>X. a. pv. manihotis</i>	Mikrosatellit	KJ737292.1	99%
<i>X. a. pv. manihotis</i>	Mikrosatellit	KJ737325.1	97%
<i>X. a. pv. manihotis</i>	Mikrosatellit	KJ737339.1	97%
<i>X. a. pv. manihotis</i>	Mikrosatellit	KJ737320.1	97%
<i>X. a. pv. manihotis</i>	Mikrosatellit	KJ737334.1	97%
<i>X. a. pv. manihotis</i>	Mikrosatellit	KJ737329.1	97%
<i>X. a. pv. manihotis</i>	Mikrosatellit	KJ737328.1	97%
<i>X. a. pv. manihotis</i>	Mikrosatellit	KJ737327.1	97%
<i>X. a. pv. manihotis</i>	Mikrosatellit	KJ737308.1	99%
<i>X. a. pv. manihotis</i>	Mikrosatellit	KJ737298.1	99%
<i>X. a. pv. manihotis</i>	Mikrosatellit	KJ737280.1	99%
<i>X. a. pv. manihotis</i>	Mikrosatellit	KJ737343.1	97%
<i>X. a. pv. manihotis</i>	Mikrosatellit	KJ737335.1	97%
<i>X. a. pv. manihotis</i>	Mikrosatellit	KJ737324.1	97%
<i>X. a. pv. manihotis</i>	Mikrosatellit	KJ737341.1	97%
<i>X. a. pv. manihotis</i>	Mikrosatellit	KJ737332.1	97%
<i>X. a. pv. manihotis</i>	Mikrosatellit	KJ737323.1	97%
<i>X. a. pv. manihotis</i>	Mikrosatellit	KJ737342.1	97%
<i>X. a. pv. manihotis</i>	Mikrosatellit	KJ737326.1	97%
<i>X. a. pv. manihotis</i>	Mikrosatellit	KJ737321.1	97%
<i>X. a. pv. manihotis</i>	Mikrosatellit	KJ737319.1	97%
<i>X. a. pv. manihotis</i>	Mikrosatellit	KJ737333.1	96%
<i>X. a. pv. manihotis</i>	Mikrosatellit	KJ737302.1	98%
<i>X. a. pv. manihotis</i>	Mikrosatellit	KJ737353.1	98%
<i>X. a. pv. manihotis</i>	Mikrosatellit	KJ737368.1	99%

Filogenetik analiz oluşturmak için kullanılan 32 *Xam* straini 282 baz uzunluğunda homoloji göstermiştir. Daha sonra aligment yapılan ve indel kısımları silinen dizilere model uygulanmış ve VNTR değerleri tespit edilmiştir.

Xam izolatları arasındaki evrimsel bağlantının belirlenmesi çok önemlidir. Dendrogram, farklı benzerlikler gösteren farklı kademelerden oluşmaktadır. Gana izolatları ve referans strain, monofiletik bir grup oluşturmuş ve GenBank'dan toplanan diğer en yakın *Xam* izolatlarına çeşitli benzerlik dereceleri göstermiştir (Şekil 4.6). 1000 tekrarlı kullanılan bootstrap konsensüs ağacı, analiz edilen *Xam* taksonunun evrimsel bir bağlantısı olarak kabul edilmiştir (Felsenstein 1985).

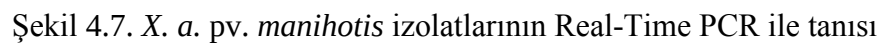


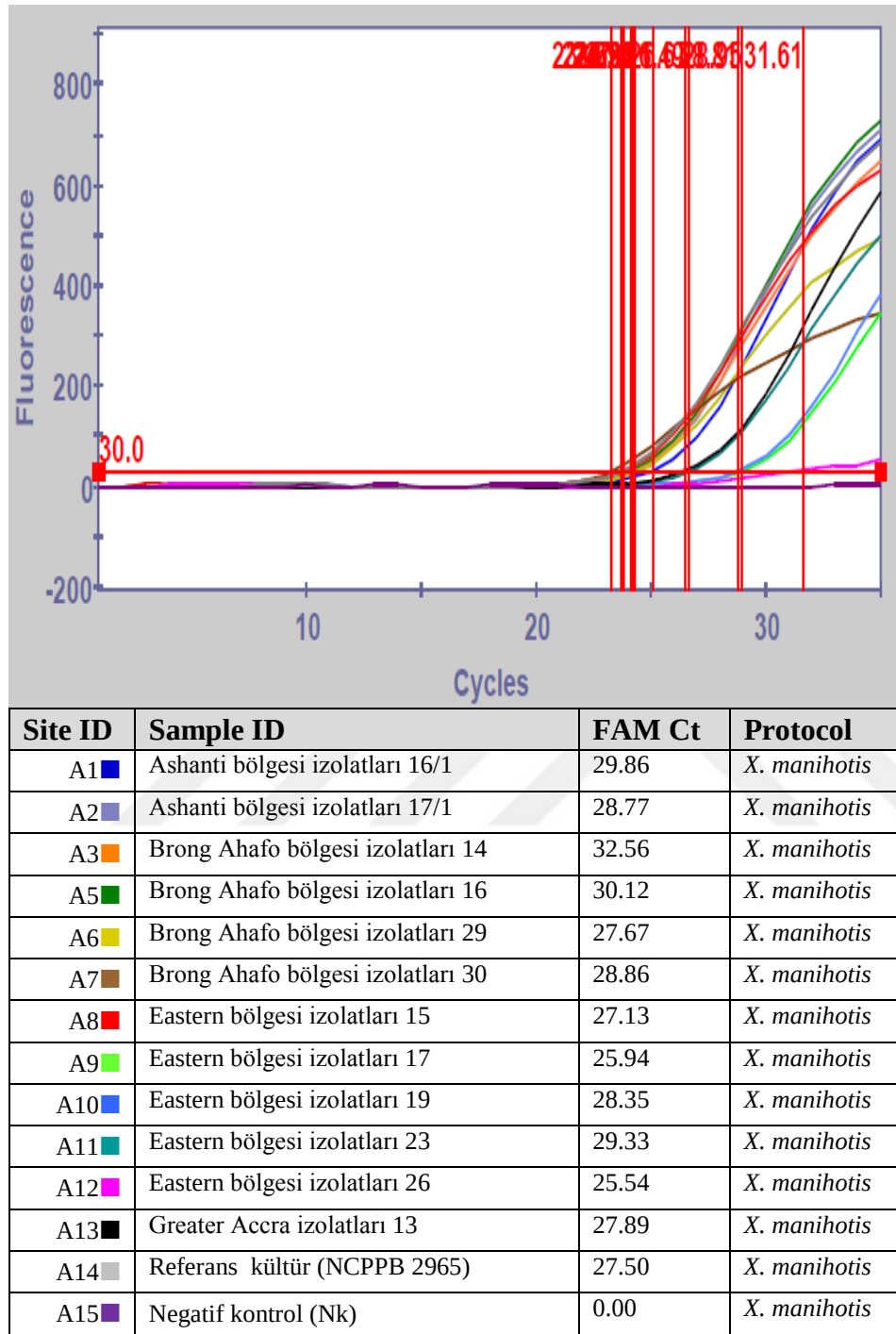
Şekil 4.6. *X. a. pv. manihotis* filogenetik analizi

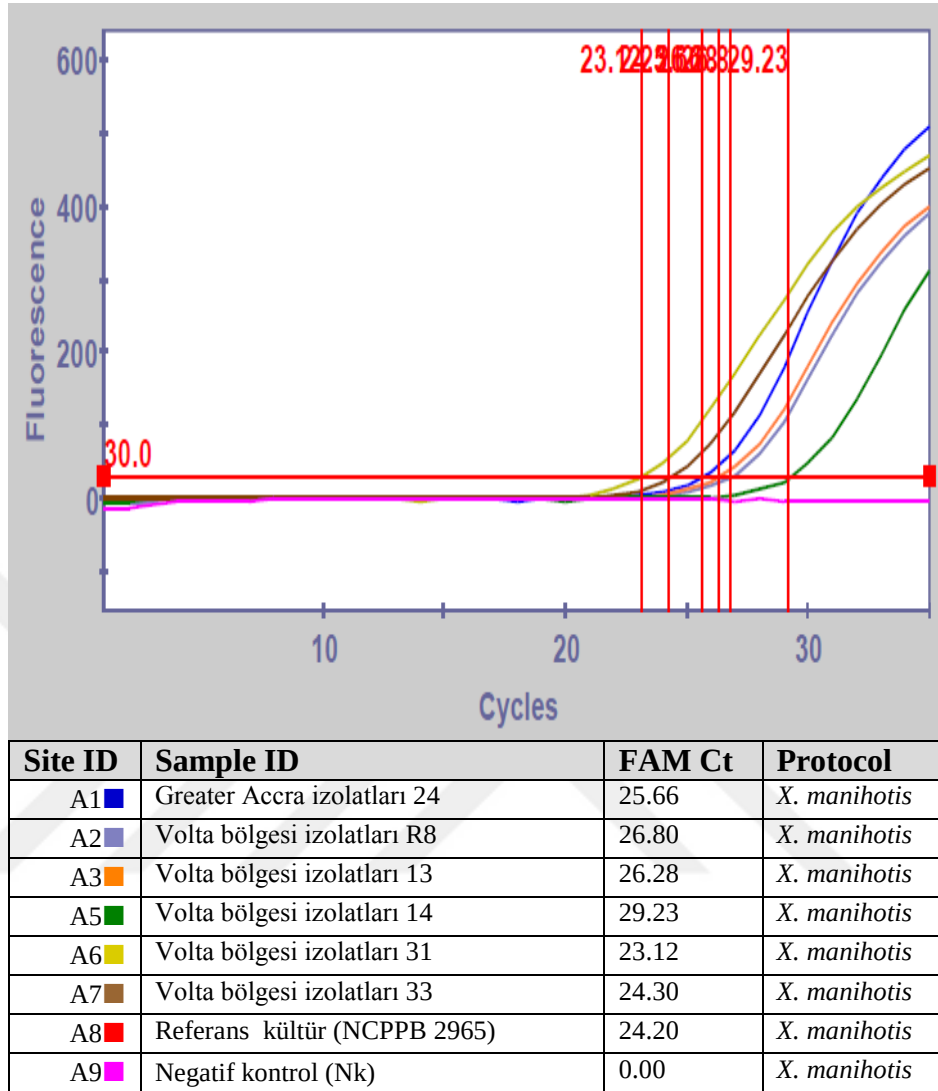
4.6. Real-Time PCR ile *X. a. pv. manihotis* İzolatlarının Tanısı

Real-Time PCR metoduyla patojenlerin tanı ve tespitleri iki şekilde yapılmaktadır. Bunlardan ilki patojenlerin DNA'sına spesifik olmayan ve DNA zincirleri arasına bağlanarak ışıma veren SYBR Green 1 adı verilen boyalarla yapılmaktadır. İkinci yöntem ise DNA'ya spesifik olan problarla (TaqMan, Moleküler Beacon, Scorpion vb) yapılmaktadır.

X. a. pv. manihotis'in Real-Time PCR ile tanısını gerçekleştirmek için Gana'nın beş bölgesinden toplanan *X. a. pv. manihotis* izolatları ve referans (NCPPB 2965) *Xam* izolatı kullanılarak primerler ve prob izolatları spesifikliği test edilmiştir. Tasarlanan primerler ve probun *X. a. pv. manihotis*' strainine spesifik olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.7, Şekil 4.8, Şekil 4.9).



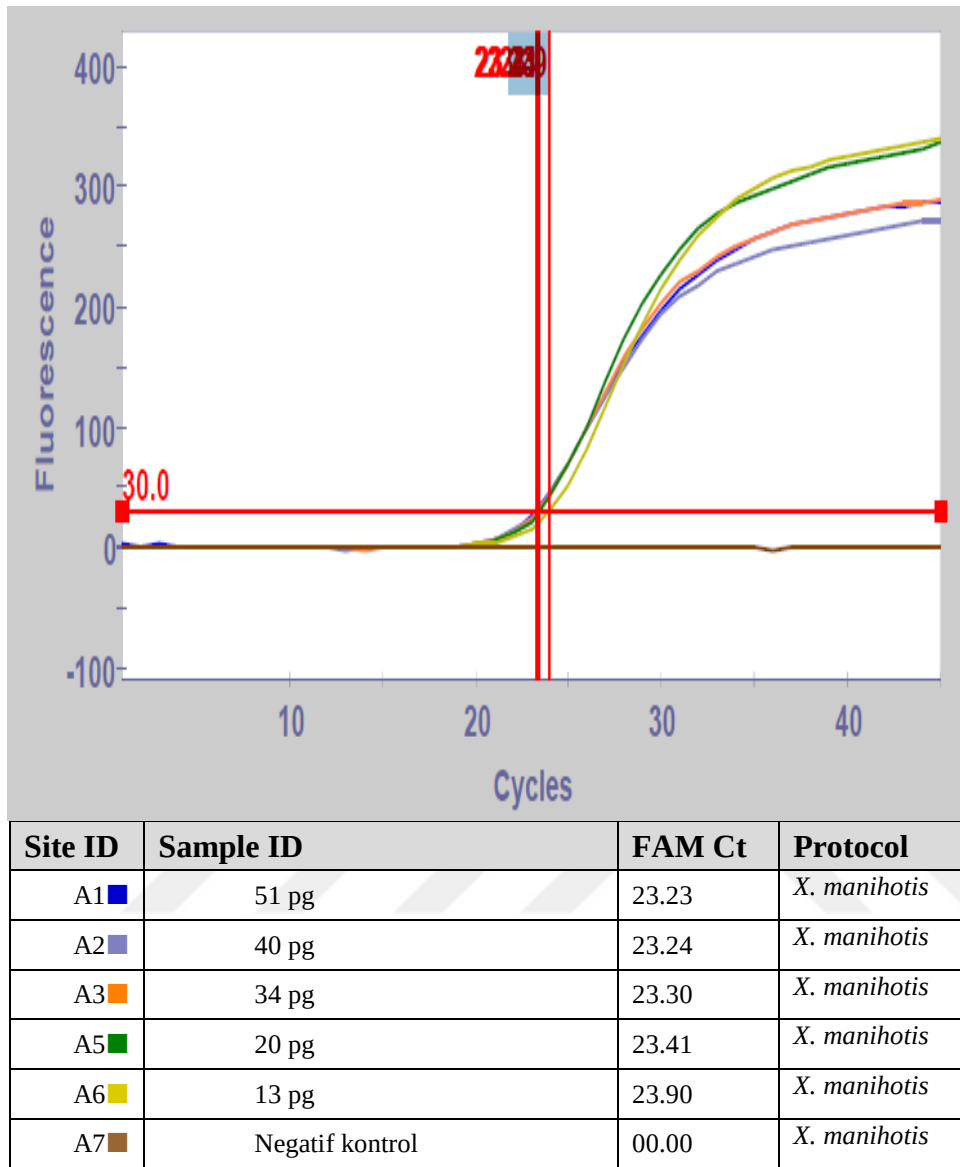
Şekil 4.8. *X. a. pv. manihotis* izolatlarının Real-Time PCR ile tanısı



Şekil 4.9. *X. a. pv. manihotis* izolatlarının Real-Time PCR ile tanısı

4.7. Primerler ve Probların Saf DNA Hassasiyeti

Real-Time PCR ile primerler ve probların genomik DNA hassasiyetini belirlemek için *X. a. pv. manihotis*'den izole edilen genomik DNA'nın önce nanogram düzeyinde, devamında pikogram düzeyinde ölçümleri yapılmıştır. Pikogram düzeyindeki ölçümlerinde yaklaşık 51 pg, 40 pg, 34 pg, 20 pg ve 13 pg olacak şekilde seyreltmeler yapılmıştır. Yapılan çalışma sonucunda *Xam* izolatları tespitinde kullanılan primer ve prob setlerinin genomik DNA'dan tespit limiti 13 pg olarak belirlenmiştir (Şekil 4.10). 13 pg'dan daha düşük düzeyde DNA tespit edilememiştir.



Şekil 4.10. *X. a. pv. manihotis*'nin tespitinde kullanılan primer ve prob setinin saf DNA'dan hassasiyeti

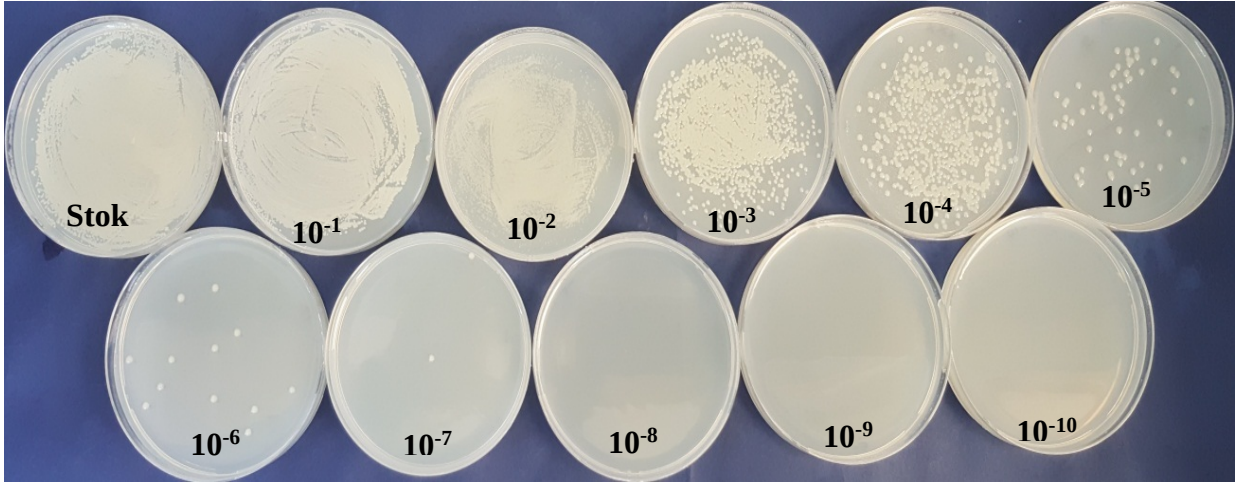
4.8. Direkt Bakteriden Primerler ve Probların Hassasiyeti

Direkt bakteriden yapılan hassasiyet çalışmasında çalışma sonucunda, Real-Time PCR ile *X. a. pv. manihotis*'nin direkt bakteriyel hücreden tespit limiti 1 hücre (Çizelge 4.2) olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.11; Şekil 4.12).

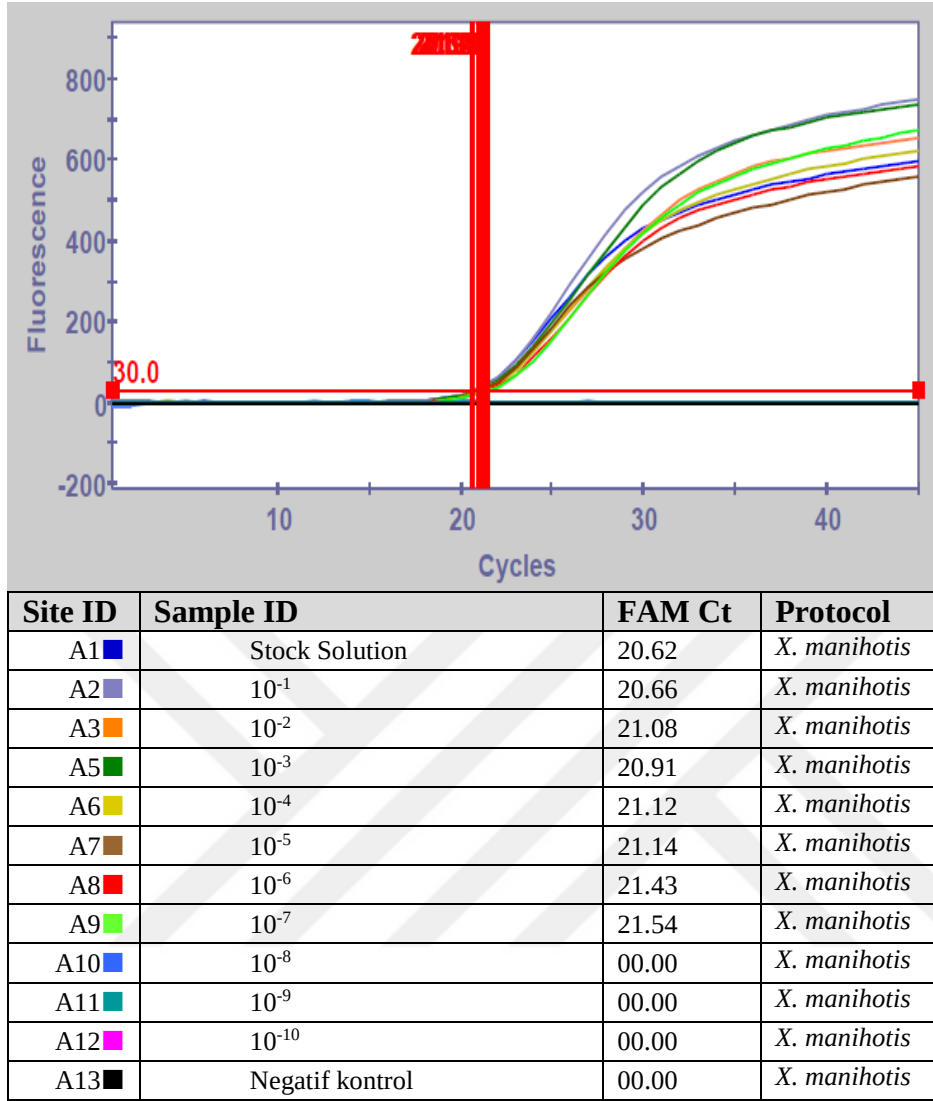
Çizelge 4.2. Real -Time PCR ile *X. a. pv. manihotis*'in direkt bakteriyel hücreden tespiti ve hassasiyet limitlerinin belirlenmesi

Konsantrasyon	RT-PCR Sonucu FAM (Ct)	Bakteri sayıları (cfu/ml)					
	<i>X. a. pv. manihotis</i>	<i>X. a. pv. manihotis</i>			$\bar{x}$	std	P/N
Stok	15.47	*	*	*	-	-	+
10⁻¹	17.71	*	*	*	-	-	+
10⁻²	20.25	*	*	*	-	-	+
10⁻³	19.93	*	*	*	-	-	+
10⁻⁴	20.36	600	314	668	527,3	±2.35	+
10⁻⁵	19.80	66	82	76	71,3	±2.13	+
10⁻⁶	20.16	11	11	12	11,3	±2.10	+
10⁻⁷	20.09	1	3	1	1.6	±0.43	+
10⁻⁸	00.00	0	0	0	0	0	-
10⁻⁹	00.00	0	0	0	0	0	-
10⁻¹⁰	00.00	0	0	0	0	0	-
Negatif kontrol	00.00	0	0	0	0	0	-

* Petride yoğun bakteri gelişimi nedeniyle sayılamadı
 std: Standart sapma
 P/N: Pozitif/Negatif
 $\bar{x}$: Aritmetik ortalama



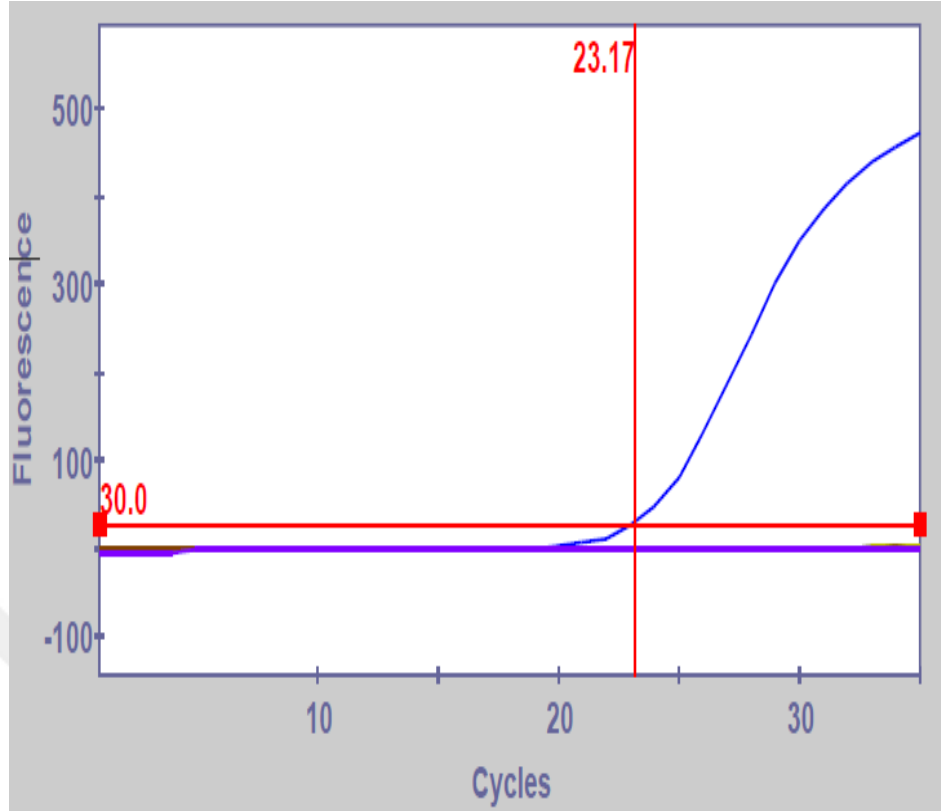
Şekil 4.11. *X. a. pv. manihotis* bakteri hassasiyet çalışmasında NA besi ortamında stok 10⁻¹⁰ seyreltmedeki bakteri sayıları (cfu/ml)



Şekil 4.12. *X. a. pv. manihotis*'in bakteri hassasiyet tespiti

4.9. Primerler ve Probun Seçiciliği

Kasava Bakteriyel Yanıklık etmeni patojeninin tanı ve tespiti için tasarlanan primerler ve probun seçiciliğini test etmek amacıyla, geliştirilen primerler ve probun kullanılarak *X. a. pv. manihotis* patojeni (Çizelge 3.1) ve diğer bitki patojeni bakteriler (Çizelge 3.6) ile Real-Time PCR işlemi gerçekleştirilmiştir. İşlem sonucunda *X. a. pv. manihotis* için tasarlanan primer prob setlerinin sadece *X. a. pv. manihotis* izolatlarına spesifik olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.13).

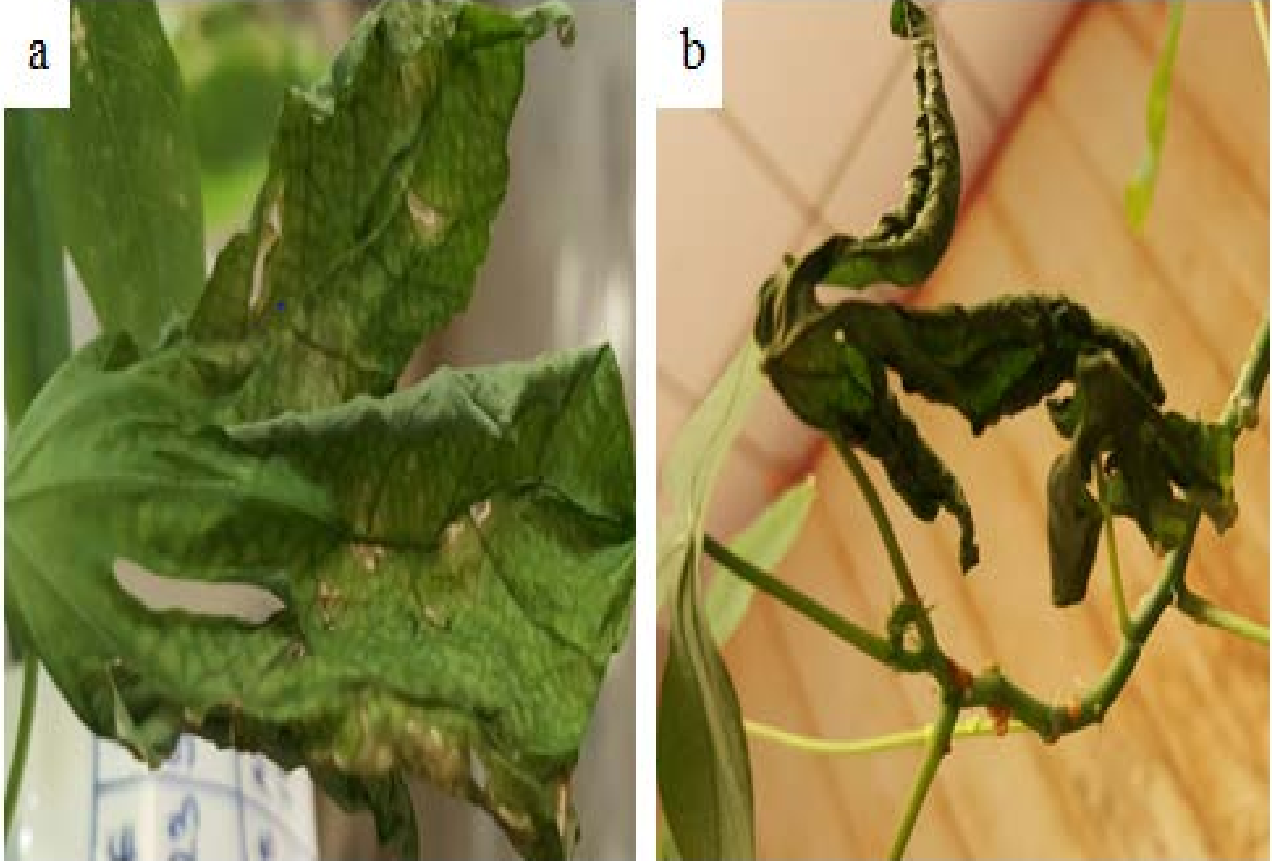


Site ID	Sample ID	FAM Ct	Protocol
A1	<i>X. a. pv. manihotis</i>	23.17	<i>X. manihotis</i>
A2	<i>X. a. pv. malvacearum</i>	00.00	<i>X. manihotis</i>
A3	<i>X. a. pv. vesicatoria</i>	00.00	<i>X. manihotis</i>
A5	<i>X. a. pv. vitians</i>	00.00	<i>X. manihotis</i>
A6	<i>X. a. pv. phaseoli</i>	00.00	<i>X. manihotis</i>
A7	<i>A. a. subsp. citrulli</i>	00.00	<i>X. manihotis</i>
A8	<i>C. m. subsp. michiganensis</i>	00.00	<i>X. manihotis</i>
A9	<i>D. chrysanthemi</i>	00.00	<i>X. manihotis</i>
A10	<i>E. amylovora</i>	00.00	<i>X. manihotis</i>
A11	<i>P. t. pv. tomato</i>	00.00	<i>X. manihotis</i>
A12	<i>R. vitis</i>	00.00	<i>X. manihotis</i>
A13	<i>X. fastidiosa</i>	00.00	<i>X. manihotis</i>
A15	Negatif kontrol	00.00	<i>X. manihotis</i>

Şekil 4.13. *X. a. pv. manihotis* izolatlarının tespiti için tasarlanan primer ve prob setinin diğer bitki patojeni bakteri türlerine karşı spesifikliğin belirlenmesi

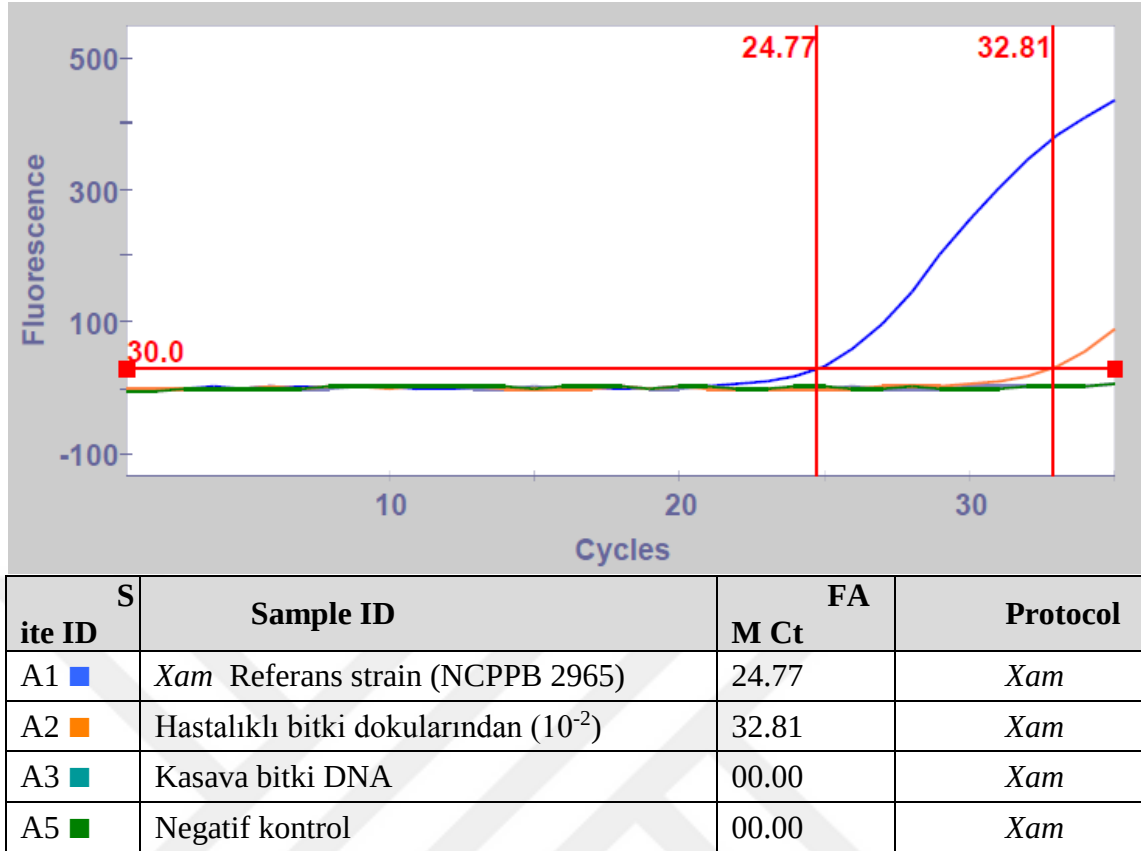
4.10. Real-Time PCR ile Hastalıklı Bitki Dokularından *X. a. pv. manihotis*'in Tespiti

Kasava Bakteriyel Yanıklık hastalığı etmeni *X. a. manihotis*'in kasava bitkilerine inokulasyonundan 6 hafta sonra meydana getirdiği belirtiler Şekil 4.14'te gösterilmiştir.



Şekil 4.14. Kasava Bakteriyel Yanıklık hastalığı etmeninin *X. a. pv. manihotis*'in kasava bitkilerine inokulasyonundan 6 hafta sonra yaprakta ve gövdede meydana getirdiği belirtiler (a) Yaprak solması (b) Gövdede bakteriyel eksudatlar

Kasava yetiştiriciliğinde ürün ve kalite kayıplarına sebep olan *X. a. pv. manihotis*'in hastalıklı bitki dokularından erken tanısı ve tespiti için Real-Time PCR işlemi gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. Tasarlanan primer ve prob seti ile *X. a. pv. manihotis* straininin enfekteli kasava bitki dokusundan tespiti

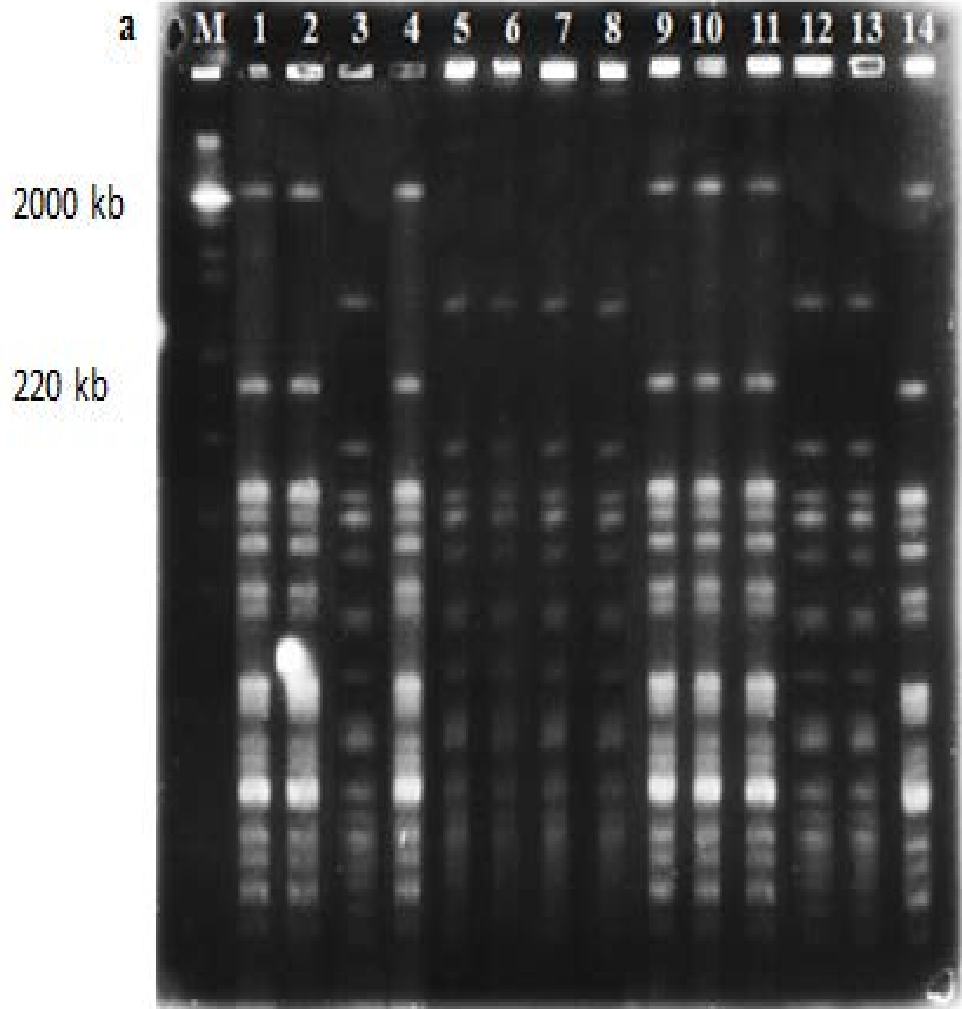
4.11. Pulsed-Field Gel Elektroforezis Analizi

Bu çalışmada *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*'in *SpeI* enzimi ile kesilmesi ve Pulsed-Field Gel Elektroforezi ile farklı haplotipleri (strain grubu) elde edilmiştir. *Xam* strainlerin kromosomal DNA'nın *SpeI* ile kesiminde 13-16 fragment elde edilmiştir. Gana'dan toplanan 32 izolat arasındaki genetik farklılıklar PFGE tarafından *SpeI* enzimi kullanılarak belirlenmiştir. PFGE sonuçlarına göre tüm izolatların iki farklı haplotip grubu (strain grubu) oluşturmuştur (Şekil 4.16 a, b).

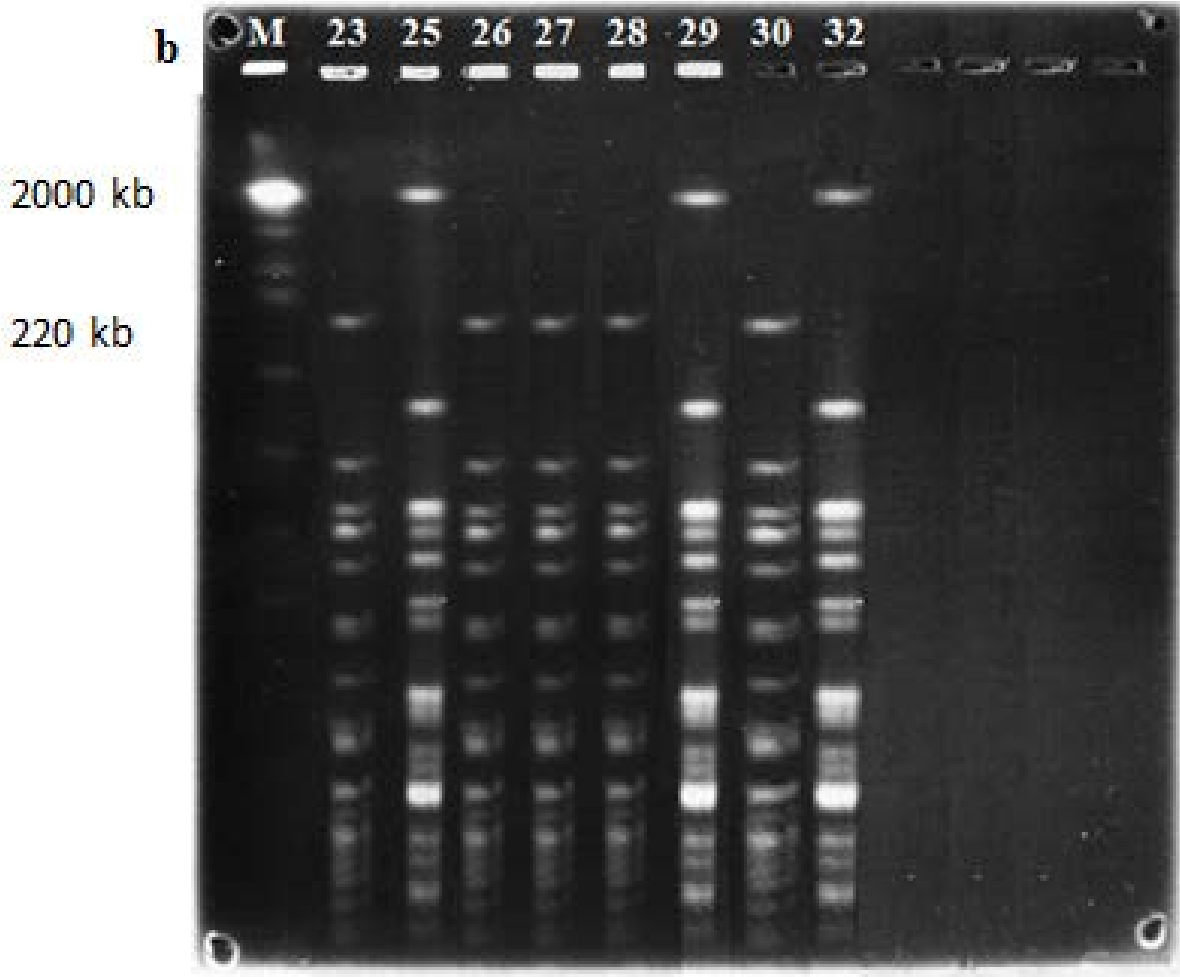
Referans strain dahil olmak üzere, Gana'nın 5 bölgesinden toplanan 32 izolatın 22 izolatı, 2 haplotip ayrılmıştır. A haplotipi, ortak ve aynı profili paylaşan, 3 farklı (Ashanti, Volta, Greater Accra) bölgeden 10 strainden oluşmuştur. Aynı profile sahip olan haplotip B ise 3 farklı bölge ile 12 strainden oluşmaktadır. Ashanti bölgesi izolatları en baskın haplotip grubunu oluşturmuş ve bunları Volta Bölgesi, Büyük Accra Bölgesi ve Doğu Bölgesi izolatlarını izlemiştir. (Şekil 4.16 a, b, Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. Pulsed- Field Gel Elektroforezi ve *SpeI* ile elde edilen *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*'in farklı haplotipleri (Strain grupları)

Haplotip A	Haplotip B
Ashanti Region 2/1	Greater Accra Region 24
Ashanti Region 3/1	Volta Region 8
Ashanti Region 5/2	Volta Region 13
Ashanti Region 11/1	Eastern Region 23
Ashanti Region 12/1	Volta Region 31
Ashanti Region 13/1	Ashanti Region 4/3
Ashanti Region 16/1	Ashanti Region 6/1
G. Accra Region 13	Ashanti Region 7/2
Volta Region 14	Ashanti Region 8/1
NCPPB2965	Ashanti Region 10/1
	Ashanti Region 14/1
	Ashanti Region 15/1



Şekil 4.16. a: Pulsed-Field Gel Elektroforezi ve *SpeI* ile elde edilen *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*'in farklı haplotiplerinin genomik profilleri. M: Chromosomal Yeast Marker (*Saccharomyces cerevisiae*), 1: Ashanti Region 2/1, 2: Ashanti Region 3/1, 3: Ashanti Region 4/3, 4: Ashanti Region 5/2, 5: Ashanti Region 6/1, 6: Ashanti Region 7/2, 7: Ashanti Region 8/1, 8: Ashanti Region 10/1, 9: Ashanti Region 11/1, 10: Ashanti Region 12/1, 11: Ashanti Region 13/1, 12: Ashanti Region 14/1, 13: Ashanti Region 15/1, 14: Ashanti Region 16/1.



Şekil 4. 16. b: Pulsed-Field Gel Elektroforezi ve *SpeI* ile elde edilen *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*'in farklı haplotiplerinin genomik profilleri. M: Chromosomal Yeast Marker (*Saccharomyces cerevisiae*) 23: Eastern Region 23, 25: Greater Accra Region 13, 26: Greater Accra Region 24, 27: Volta Region 8, 28: Volta Region 13, 29: Volta Region 14, 30: Volta Region 31, 32: Referans strain (NCPB2965).

5. TARTIŞMA

Kasava, Gana'da insanların tükettiği en önemli besindir. Bu çalışmada Gana'nın farklı ekolojik bölgelerinde yetiştirilen kasava alanlarından toplanan Kasava Bakteriyel Yanıklık hastalığına neden olan *X. a. pv. manihotis*'in , klasik ve Real-time PCR ile tanısı yapılmıştır.

Gana'da bulunan tarımsal ekolojik alanları arasında yarı yaprak dökten ormanlar, yoğun yağmurlu ormanlar, iklimsel geçiş bölgeleri, kıyı Gine, ve Sudan savanna yer almaktadır. Sürveylerde Gana'nın 10 bölgesinden 8 tanesi ziyaret edilmiş ve beş bölgede *X. a. pv. manihotis*'in varlığı tespit edilmiştir. Örneklem ağırlıklı olarak ticari çiftliklerde yapılmış ve küçük ticari çiftlikler üzerine ise daha az yoğunlaşmıştır. Örneklem sonucunda, analiz edilen simptomatolojik örneklerden Ashanti bölgesinin en yüksek Kasava Bakteriyel Yanıklık şiddetine sahip olduğu belirlenmiştir. En yüksek Kasava Bakteriyel Yanıklık yaygınlığı yine bu bölgede tespit edilmiştir. Bunun nedeni bölgedeki çoğu çiftçi tarafından en çok tercih edilen çeşidin Esam kasava çeşidi olması ve hastalığa karşı bu çeşidin daha duyarlı olmasıdır. Ayrıca, sıcaklık ve bu bölgede yer alan yoğun ormanlık alan tarafından sağlanan bitki örtüsü, enfeksiyon sürecinin hızlandırılmasında kısmen rol oynayabilir.

Çalışma sonuçları, Kasava Bakteriyel Yanıklık hastalığının yarı yaprak dökten orman bölgesinde, Gana'nın diğer bölgelerine göre daha yaygın olduğunu göstermiştir.

Wydra ve Msikita (1998); Wydra ve Verdier (2002), tarafından 4 Batı Afrika ülkesinin farklı tarımsal ekolojik bölgelerinde yapılan benzer araştırmalarda, Savana bölgelerinde, orman geçiş alanlarına kıyasla CBB daha fazla yaygınlık göstermiş ve bu ülkelerdeki orman bölgelerinde daha az oranda bulunmuştur. Takatsu vd (1978) ve Lozano (1986), Savana bölgelerindeki CBB'nin yüksek yaygınlık ve şiddetinin, gece ve gündüz sıcaklıkları arasındaki farklı iklimsel koşullara bağlı olabileceğini ve bunun enfeksiyon sürecinde önemli bir rol oynayabileceğini açıklamışlardır.

Gana'da orman bölgeleri yarı yaprak dökten ormanlar ve yağmur ormanlarından oluşmaktadır. Yağmur ormanı nemli, her daim yeşil ve yaş her daim yeşil iki farklı alandan oluşur. Bu çalışmada, yağmurormanları CBB şiddeti gözlenmemiştir. Bulgularımız Wydra ve Msikita (1998) bulguları ile benzerlik göstermektedir. Wydra ve Verdier (2002), 1993/1994 yıllarında yaptıkları çalışmada Gana, Kamerun ve Benin Yağmur Ormanlarında ve Gana'nın Sudan savannah bölgesinde CBB'nin görülmediğini bildirmişlerdir. Çalışmadan elde ettiğimiz bulgular aynı zamanda Agnassim vd (2007)'nin Afrika Orman bölgelerinde CBB'nin yaygınlığının yüksek olduğu bulguları ile de uyumludur. Elde edilen bulgular, orman savanasında, Geçiş ve Savana bölgelerinde *Xam* yaygınlığının Afrika Orman Bölgelerinden daha yüksek olduğunu bildiren Maraite ve Meyer (1975), Persley (1980) bulguları ile benzerlik göstermemektedir.

Xam'ın dağılımı pek çok faktöre bağlı olabilir ve bunların arasında enfekteli kasava alanlarından enfekteli simptomatik olmayan çelikler, ana inokulum kaynağı ve uzak mesafelerde yeni kurulan kasava plantasyonlarına *Xam*'in yayılmasının önemli sebebi olmaktadır. *Xam*, odunlaşmış kasava gövdelerinde bazen görünür simptomlar

üretmeyen bir vasküler patojendir ve ayrıca kasava dokusunu çok uzun sürede kolonize edebilme kabiliyetine sahiptir ve bu da patojenin yayılmasına yardımcı olmaktadır (Lozano ve Nolt 1989). *Xam* aynı zamanda kasava bitkisine epidermal yaralar veya stoma yoluyla girer ve parankima bitki dokularının hücre içi boşluklarında çoğalır, pektinazlar ve selülozlar gibi enzimlerin üretimi nedeniyle hücre duvarını parçalamaya başlar (Maraite ve Weyns 1979; Dianese 1985; Boher vd 1995). *Xam*'in bir yerden bir yere yayılması için diğer yollar, yağmur sıçraması (Persley 1979), kirli aletler, budama bıçağı, hayvanların ve insanların hareketi hastalığın yayılmasını sağlamaktadır. (Lozano 1986). *Xam*'in bazı alanlara yeni girişi ve enfekte olmamış yerlere hızla yayılmasında bildirilmiştir (Kwaje 1982; Joseph ve Elango 1991).

Orta ve Batı Afrika ülkelerinde, *Pseudotheraptus devastans*, *Anoplecnemis madagascariensis* gibi böceklerin CBB'ye nadiren vektörlük yaptığı ve *Zonocerus variegatus* CBB'nin ana vektörü olarak bu hastalığın yayılmasında önemli bir rol oynadığı belirlenmiştir (Bouriquet 1939; Maraite ve Meyer 1975). Araştırmamızın en ilgi çeken gözlemlerinden biri de, CBB oranlarının yüksek olduğu alanların çoğunda, CBB'nin vektörü olarak rol oynayan *Z. variegatus*'un orantılı olarak daha yüksek oranda olmasıdır (Bouriquet 1939; Maraite ve Meyer 1975). Gana'nın Kıyı Savannası'ndan Orta ve Greater Accra (Gana'nın başkenti) bölgelerinde CBB'nin yer yer yayılım gösterdiği kaydedilmiştir. Sörveyimiz sırasında Orta Bölge'de CBB şiddeti Greater Accra bölgesi dışında gözlenmezken, bu sonuç Gana'nın bu kıyı bölgesinde CBB'nin tamamen bulunmaması anlamına gelmemektedir. Gana'nın Kuzey Bölgesinde kalan Gine Savannah bölgesindeki, Tamale'da CBB şiddeti gözlemlenmemiştir.

Hem CTA hem de NA üzerindeki izolatlara morfolojik olarak *Xam*'in tipik özelliklerini göstermiştir. CTA yarı seçici besiyeri sadece bu ortamın bileşenlerini kullanma becerisine sahip olan *Xam* türlerine özgüdür. CTA ortamı, izolasyon sürecinde *Xam* olmayan izolatların taranmasında kullanılabilir. CTA'daki *Xam*'in gelişimi hızlı, saprofitik bakterilerden arı ve NA'ye göre daha büyük, dairesel beyaz gri-kremsi koloniler üretmiştir. NA'da farklı bakteri popülasyonlarının bir karışımını içeren bakterilerin gelişimi, varsayılan patojenin ön tanımlamasını çok zorlaştırmıştır.

Patojenisite testinde 32 izolatın hepsinin duyarlı Esam cassava çeşitleri üzerinde patojen olduğu doğrulanmıştır. Kullanılan püskürtme ve enjeksiyon yöntemleri farklı belirtiler üretirken, üretilen bakteri eksudatlarının miktarı, yanıklık ve solgunluğun şiddeti püskürtülen bitkilere kıyasla enjekte edilen bitkilerin yapraklarında daha yüksek bulunmuştur. Belirtiler şiddetinin yüksek olmasının muhtemel nedeni; bitki mezofilinin bakteri süspansiyonuna doğrudan maruz kalmasından kaynaklanabilir. Her iki yöntem arasında farklılıklar gözlemlenmesine rağmen, izolatlar arasındaki patojenik durum arasında bir farklılık gözlenmemiştir. Tüm izolatlar, çalışmada kullanılan 1-5 skalasına göre aynı derecede hastalık şiddeti göstermiştir. *Xam* inoküle edilen bitkilerden sürekli olarak tekrar izole edilmiş ve böylece Koch postulatları sağlanmıştır. Gana'da kasava bitkisinde CBB hastalığının etmeni olarak *Xam* belirlenmiştir.

Ayrıca, izolatlar *Xanthomonas* cinsine spesifik ve VNTR'nin lokus primerleri kullanılarak tanımlanmış, tespit ve karakterize edilmiştir. Her iki primer de patojenler arasındaki değişkenliği ayırmada çok etkili bulunmuş ve beklenen fragment büyüklüklerini vermiştir. *Xanthomonas* cinsine özgü primer kullanımı, farklı

bölgelerden toplanan çok sayıdaki örneğin taranmasında yararlı olmuş ve çalışmanın iş yükü azalmasını sağlamıştır. *Xanthomonas* cinsine spesifik primer çifti ile test edilen pozitif örnekler VNTR primerleri ile de fragment üretmiştir. VNTR primeri, kasava yaprak örneklerinden izole edilmiş *Xam*'in tür düzeyinde spesifik tespitini sağlamıştır.

Xam popülasyon çalışmaları için kullanılan ve geliştirilmiş birçok moleküler genetik markörler mevcuttur, bu teknikler arasında, hedef genomda, diğer moleküler genetik markörler tarafından tespit edilemeyen tandem tekrar dizisindeki polimorfizmleri saptamak ve ortaya çıkarmak için ayırt edici bir gücü olan VNTR lokusu markörleri yer almaktadır (Garcia-Yoldi vd 2007; Pourcel vd 2007; Van Belkum 2007; Stevenson vd 2009).

VNTR'ler son zamanlarda bitki patojenlerinin genetik varyasyon ve çeşitliliğini analiz etmek için kullanılmaktadır. Bu patojenler arasında *X. fastidiosa* (Coletta-Filho vd 2001); *Xanthomonas citri* pv. *citri* (Ngoc vd 2009); pirinç bakteriyel patojeni *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* (Zhao vd 2012); ve *Ralstonia solanacearum* (N'Guessan vd 2013) yer almaktadır. VNTR'lerin diğer DNA parmak izi tekniklerine kıyasla ek avantajları vardır. Bunlar, uygun maliyet ve daha düşük iş yüküdür (Van-Belkum 2007; Chiou 2010; Fillo vd 2011). VNTR metodunun avantajları, *Xam* popülasyon çalışmalarında onu en yararlı ve umut verici moleküler genetik markörlerden biri haline getirmektedir. *Xam*'in çeşitliliği, çevresel koşullarla doğrudan ilişkilidir, artan nem yüksek *Xam* çeşitliliğine neden olmaktadır (Restrepo vd 2000).

Önceki araştırmalarda, *Xam*'in genetik çeşitliliği, Verdier vd (1994) tarafından RFLP kullanılarak analiz edilmiş ve sonuçlar Afrika strainlerinin homojen olduğunu, Güney Amerika'da patojenin çok değişken olduğunu ortaya koymuştur. Bunun nedeni, *manihotis* cinsinin, kökeninin Güney ve Orta Amerika olmasıdır. Brezilya ve Meksika çeşitliliğin merkezidir (Rogers ve Fleming 1973). Dahası, patojenin Afrika'ya girişi nispeten yenidir ve plazmid probu (pthB) ile Afrika strainlerinin yeni RFLP analizi, farklı haplotipleri ayırt etse de değişkenliğe neden olacak kadar seleksiyon baskısına maruz kalmamıştır (Maraite vd 1981; Verdier vd 1993). (Assigbe'tse' vd 1996).

Bakteriyel patojenlerin kesin tanı ve tespiti için son yıllarda Real-Time PCR yönteminden faydalanılmaktadır. Klasik PCR yöntemi, PCR işleminden sonra çoğaltılan DNA fragmentlerinin agaroz jelde yürütülmesi ve ethidium bromide ile boyanıp ultraviole (UV) ışık altında görüntüleme gibi bir takım yan işlemlere ve uzun süreye gereksinim duymaktadır. Bu yöntemde, kesin sonuçlar elde edilmesine rağmen iş gücü ve zaman kayıpları fazla olmaktadır. Bu nedenle son yıllarda patojenlerin erken tanı ve tespitleri için klasik-PCR yönteminde yapılan agaroz jelde yürütme ve UV ışık altında DNA fragmetlerinin görüntülenmesi gibi ek işlemlere ihtiyaç duyulmadan daha kısa sürede, kesin sonuç elde edebileceğimiz Real-Time PCR yöntemi geliştirilmiştir (Schaad vd 1999; Weller vd 2000; Wong ve Medrano 2005).

Real-Time PCR metoduyla patojenlerin tanı ve tespitleri iki şekilde yapılmaktadır. Bunlardan ilki patojenlerin DNA'sına spesifik olmayan ve DNA zincirleri arasına bağlanarak ışıma veren SYBR Green 1 adı verilen boyalarla yapılmaktadır. İkinci yöntem ise DNA'ya spesifik olan proplarla (TaqMan, Moleküler Beacon, Scorpion vb) yapılmaktadır. Bu çalışmada patojenlerin tanı ve tespitleri için DNA'ya spesifik

TaqMan prob sistemi kullanılmıştır (Wong ve Medrano 2005; Licciardello vd 2011; Cottyn vd 2011).

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

Real-Time PCR yönteminin kolaylığı, tanı ve tespitlerin hızlı, güvenilir ve hassas şekilde gerçekleştirilebilmesi, direkt hastalıklı bitki dokularından tespit yapılabilmesi, bitki patojeni bakterilerin tanı ve tespitlerini gerçekleştirmek amacıyla son yıllarda yöntemin kullanımının yaygınlaşmasında önemli rol oynamaktadır. Real-Time PCR ile günümüze kadar farklı bitki patojeni bakterilerin tanı ve tespitleri yapılmıştır (Schaad vd 1999; Freeman vd 1999; Weller vd 2000; Van Beckhoven vd 2002; Salm ve Geider 2004; Basım ve Basım 2004; Cubero ve Graham 2005; Berg vd 2006; Basım ve Yılmaz 2005; Pujol vd 2006; Basım ve Basım 2007; Bellis vd 2007; Mavrodi vd 2007; Benlioğlu ve Özyılmaz 2007; Dreo vd 2007; Luo vd 2008; Basım ve Basım 2009; Basım ve Çaplık 2009; Gottsberger 2010; Basım ve Bozan 2011; Basım ve Öztürk 2011; Licciardello vd 2011; Cottyn vd 2011; Johnson ve Walcott 2012; Gallelli vd 2014).

Çalışmada kullanılan Real-Time PCR yönteminde yalnızca çift sarmallı DNA'ya bağlandıklarında floresan ışımaya veren bir boya olan SYBR Green tekniği kullanılmışlardır. Diğer metotlara göre çok daha ekonomik olması, çalışmanın kantitatif analizden çok bakterinin varlığına ve tanısına yönelik hedefler içermesi nedeniyle kullanılan SYBR Green tekniği, sadece çift sarmallı DNA'ya bağlanıp amplifikasyon olduğu sürece floresan yaymaktadır. Fakat bazı çalışmalarda kontaminasyon ya da istenmeyen bağlanmalardan kaynaklanan amplifikasyonlar ortaya çıkmaktadır. SYBR Green 1 bu bağlanmaları da amplifikasyon olarak verdiği için bazen yanlış sonuçlara neden olmakta bu da çalışmanın hassasiyetini düşürmektedir.

Çalışmada *X. a. pv. manihotis* strainlerinin tanısı Real-Time PCR ile kısa sürede yapılmıştır. Populasyonda zamana bağlı artış çiçeklerde düzenli olarak devam ederken, yapraklarda Real-Time PCR sonuçları ile kültürde geliştirilen bakteri sayısında farklılıklar ortaya çıkmıştır. Bu durumun yapraklarda var olan ama ölmüş bakteriyel hücreler ya da ortamda canlı bulunan kültürde geliştirilemeyen (viable but non-culturable (VBNC) evresinde olan) bakterilerden kaynaklı olduğuna bağlanabilir.

Strainin biyolojik olarak etkinliği ve varlığının kontrolü için hem kültür ortamında geliştirme hem de Real-Time PCR işleminin eş zamanlı olarak yapılması gerektiği bu çalışmayla ortaya konulmuştur.

Bu çalışma, Kasava Bakteriyel Yanıklığına neden olan *X. a. pv. manihotis*'in tanı ve tespitinde Gana'da ve Dünya'da LNA prob kullanılarak gerçekleştirilen ilk Real-Time PCR çalışmasıdır. Patojen, PCR'ın daha ileri versiyonu olan Real-time PCR kullanılarak belirlenmiş ve reaksiyon ilerledikçe ampikonun eş zamanlı izlenmesine olanak sağlamış ve konvansiyonel PCR ile kıyaslandığında PCR sonrasındaki jel hazırlıklarına ihtiyaç duymamaktadır (Nazarenko vd 1997). Referans strain ile birlikte Gana izolatları, izolatların tanımlanmasının doğruluğunu teyit eden farklı ortalama Ct değerlerine sahip farklı pikler üretmiştir. Çeşitli Ct düzeylerinde kaydedilen değerler, tepkimedeki başlangıç genomik hedefinin miktarı ile ters orantılıdır. Ct dengeli ve doğru bir yöntemdir, ancak bir reaksiyon eşitsiz verime sahipse saptamanın doğruluğu sınırlı olabilir, Ancak iyi optimizasyon testi, bu metodun doğrusal olmayan regresyon gibi diğer tahmin yöntemlerine kıyasla tanımlamada iyi bir standart olarak kalmasını sağlayabilir (Goll vd 2006; Karlen vd 2007).

Yapılan çalışmada, kasava bitkisinde verimde önemli kayıplara sebep olan *X. a. pv. manihotis*'in bakteriyel hücreden ve hastalıklı bitki dokularından LNA prob kullanılarak direkt tanı ve tespitleri Real-Time PCR yöntemi ile kısa sürede kesin bir şekilde gerçekleştirilebilmiştir.

Kasava Bakteriyel Yanıklığı patojenin Real-Time PCR yöntemiyle tanısı için *X. a. pv. manihotis*'in VNTRs loci bölgelerine ait dizilerden prob ve primerler tasarlanmıştır. Tasarlanan primer ve prob setleri test etmek amacıyla *X. a. pv. manihotis* (2965) referans straini tedarik edilip çalışmaya eklenmiştir. Geliştirilen yöntem ile tüm *Xam* izolatlarının tanı ve tespitleri başarıyla gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışmada geliştirilen Real-Time PCR yöntemlerinde LNA probu kullanıldığından diğer araştırmacılar tarafından gerçekleştirilen Real-Time PCR protokollerinden çok daha hassas ve kesin sonuçlar vermektedir. Daha önce klasik PCR yöntemi ile *X. a. pv. manihotis* izolaları tanı ve tespitinde 446 bp'lik DNA fragmentleri çoğaltılmıştır.

Real-Time PCR yönteminde ise *X. a. pv. manihotis* izolaları 77 bp uzunluğunda fragmentler çoğaltılmıştır. Çoğaltılması hedeflenen bölgelerin kısa olması, polimerizasyon reaksiyonu esnasında tespit için gerekli DNA amplifikasyonunun daha kısa sürede gerçekleşmesini sağlamakta ve belirlenen PCR protokollerinde döngülerin daha kısa sürelerde tamamlanmasına olanak sağlamaktadır.

X. a. pv. manihotis etmenin tanı ve tespitinde kullanılan 20-25 döngülük klasik PCR yöntemleri, 100-155 dakikada tamamlanırken 35-45 döngülük Real-Time PCR yöntemleri 33 dakikada tamamlanmaktadır. Ayrıca Real-Time PCR sistemi PCR prosesinin bir bilgisayar aracılığı ile gerçek zamanlı olarak kontrol edilebilmesine ve işlemin istenildiğinde sonlandırılmasına olanak verdiği için; sonuç döngülerin tamamlanmasından önce elde edilebilmektedir. Gerçekleştirilen çalışmalar neticesinde

Real-Time PCR ile *X. a. pv. manihotis* etmenin yaklaşık 32.56 dakikada tanılarının yapılabildiği saptanmıştır.

Klasik PCR yönteminde tespitin gerçekleştirilmesi için ortamda bulunması gereken bakteri yoğunluğu genellikle 5×10^2 ve 1×10^4 cfu/ml arasında değiştiği rapor edilmiştir (Cottyn vd 2011). Bu çalışmada geliştirilen yöntemin *X. a. pv. manihotis* bakteriyel hücre hassasiyet sınırı 1 hücre olarak tespit edilmiştir. Geliştirilen yöntemin DNA düzeyindeki hassasiyet sınırı ise 13 pg düzeyine kadar tespit edilmiştir. Bu çalışmada geliştirilen Real-Time PCR metodu ile kullanılan LNA probu genomdaki çoğalan kısmın seçicilik, hassaslık ve tekrarlanabilirliğini sağlamıştır. Bunun yanında, Real-Time PCR, *X. a. pv. manihotis*'nin direkt hastalıklı kasava bitkilerinden tespiti başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Direkt bitki dokusundan tanı ve tespit imkânı, Real-Time PCR işleminin sağlıklı sonuç vermesi için bakteriyel izolasyonun yapılması gerekliliğini ortadan kaldırmış, sistemin uygulanabilirliğini ve hızını büyük ölçüde arttırmıştır. Bitki patojeni bakterilerin tanı ve tespitlerini taşınabilir Real-Time PCR cihazları ile yapılabilme olanağı, hedef patojenlerin dışındaki bitki patojenlerinin laboratuvara taşınmasının ve kültüre alınmasının önüne geçebilecektir. Bu çalışma, Kasava Bakteriyel Yanıklık etmeni bakterilerin yerinde ve kısa sürede tespit ve tanılarının yapılabilmesine de olanak sağlamıştır.

VNTR analizi sonucunda dizilenen ampikonun BLAST analizi, GenBank nükleotit veritabanından elde edilen strainler ile %93 ila %100 arasında homoloji ortaya koyarken böylece bu patojenin belirlenmesini ortaya sağlamıştır. Genomik dizilere dayanan bakteriyel tanımlama, türlerin farklılaşmasında önemli bir rol oynayan ve DNA-DNA hibridizasyonunun yerine geçecek yeni bir standart yöntemdir (Deloger vd 2009; Richter ve Rosselló-Móra 2009), Özellikle Ortalama Nükleotid benzerlik (Average Nucleotide Identity) temelinde (Konstantinidis ve Tiedje 2005). Dendrogram ağacı, bu çalışmadaki *Xam* izolatları ile GenBank'dan elde edilen evrimsel ataları arasında tutarlı bir şekilde çelişen, çeşitli evrimsel benzerlikler göstermiştir. Cluster analizi için, Jukes-Cantor modeline göre maximum likelihood yöntemi (Jukes ve Cantor 1969) uygulanmıştır. Bu yöntemi, *Xam* izolatları arasındaki evrimsel bağlantının belirlenmesinde çok önemlidir. Dendrogram, farklı benzerlikler gösteren farklı kademelerden oluşmaktadır. Gana izolatları ve referans strainler, monofiletik bir grup oluşturmuş ve GenBank'dan toplanan diğer en yakın *Xam* izolatlarına benzerlik göstermiştir. 100 tekrarlı kullanılan bootstrap konsensüs ağacı, analiz edilen *Xam* taksonunun evrimsel bir bağlantısı olarak kabul edilmiştir (Felsenstein 1985).

Sonuçlar VNTR'lerin *Xam* türünün tanımlanmasında yararlı bir genetik markör olduğunu göstermiştir. Sekans benzerliği ve DNA-DNA hibridizasyonu arasındaki korelasyon, *Xanthomonas*'ta grup ve türlerin inşası için kurulmuştur (Young vd 2008), Fakat bugüne kadar, *X. a. pv. manihotis*'nin yakın akrabaları da dahil olmak üzere tüm genom sekansları grup devamlılığı için istismar edilmemiştir (Young vd 2008).

Çalışmada CBB etmeni *Xam* Gana'dan toplanan örnekler üzerinden hem klasik hem de Real-time PCR ve PFGE ile tespit edilerek tanımlanmıştır. Gana'nın büyük bölümünde CBB'nin oldukça yaygın olduğu belirlenmiştir. Bu patojenin yayılmasını ve zararını azaltmak için Dünya'nın farklı bölgelerinde mücadele yöntemleri uygulanmaktadır.

Gana'dan toplanan 32 izolat arasındaki genetik farklılıklar PFGE tarafından *SpeI* enzimi kullanılarak belirlenmiştir. Referans strain dahil olmak üzere, Gana'nın 5 bölgesinden toplanan 32 izolatın 22 izolatı, 2 haplotip ayrılmıştır. A haplotipi, ortak ve aynı profili paylaşan, 3 farklı (Ashanti, Volta, Greater Accra) bölgeden 10 strainden oluşmuştur. Aynı profile sahip olan haplotip B ise 3 farklı bölge ile 12 strainden oluşmaktadır. Ashanti bölgesi izolatları en baskın haplotip grubunu oluşturmuş ve bunları Volta Bölgesi, Büyük Accra Bölgesi ve Doğu Bölgesi izolatlarını izlemiştir. Ashanti (As 17/1) ve Volta (VR 33) Bölgelerinin herbirinden 1 izolat, Brong-Ahafo Bölgesi'nden 4 izolat (BA 14; BA 16; BA 29; BA 30) ve Doğu Bölgesi'nden 3 izolat (ER 15, ER 17, ER 19), olmak üzere toplam 10 izolat PFGE ile *SpeI* kullanılarak haplotiplere ayıramamıştır. Bu izolatlar jel üzerinde ayırt edilemeyen görüntü oluşturmuştur. Çünkü *SpeI* genomik DNA'larını farklı desenlerle kesememiştir. Gelecekte yapılacak çalışmalarla, bu farklılıkları tespit edilemeyen izolatlar housekeeping genleri kullanılarak haplotip gruplarına ayrıştırılabilecektir. PFGE az sıklıkla kesim yapan (Rare-Cutting) enzimleri kullanarak tür teşhisinde ve aynı tür içerisinde strain sınıflandırılmasına izin vermektedir. Ayrıca bu yöntem, genom büyüklüğünün tahmininde ve genom haritalaması için kullanışlı data sağlamaktadır (Smith ve Condemine 1990). Her ne kadar PFGE metodu bakteriyel genom büyüklüğünü belirlemede ve bütün kromozom değişimlerini tespit etmekte kullanılsa da (Lucier ve Brubaker 1992; Romalde vd 1991), bu yöntem *X. a. pv. manihotis*'in strainlerinin genetik ilişkisini ve çeşitliliğini belirlemede kullanılmamıştır. Bu yöntem aynı zamanda tür içi genetik varyasyonun kantitatif değerlendirilmesi ve verilen türün bireysel izolatlarının restriksiyon enzimi ile elde edilen büyük fragmentlerinin karşılaştırılması ile belirlenmesine imkan sağlamaktadır (Arbeit vd 1990).

Zararlar, IPM perspektifiyle alınan tedbirlerin birleşimiyle büyük ölçüde önlenebilmektedir (Lozano 1986). Kasava Bakteriyel Yanıklığının henüz görülmediği alanlarda, bitkisel kaynaklara büyük özen gösterilmelidir. Vejetatif üretim materyali, *in vitro* meristem kültürü ile elde edilmeli ve hastalıksız olduğu belirlenmelidir. Bitkisel tohumun orijini-hastalık gelişimine uygun olmayan alanlar olmalı, sıcağa maruz bırakılmalı ve karantina altında yetiştirilmelidir. Kasava gen kaynaklarının güvenli taşınımı için detaylar FAO/IBPGR teknik kılavuzunda yer almaktadır (Frison ve Feliu 1991).

Kasava Bakteriyel Yanıklığı'nın yaygın olduğu alanlarda hastalık görülme sıklığı temiz ekim materyalinin kullanılması yoluyla azaltılabilir. Aşı kalemleri sadece yağmurlu sezon sonunda yapılan kontroller sonucunda hastalık bulunmayan plantasyonlardan alınmalıdır. Hastalığın ara sıra görüldüğü durumlarda, aşı kalemlerinin sadece sağlıklı bitkilerden ve vasküler kahverengileşmenin olmadığı yerden 1 m'ye kadar sapın en odunlaşmış bölümünden toplanmasına büyük özen gösterilmelidir. Kullanılan alet ve ekipmanlar bakterisit kullanılarak düzenli bir şekilde dezenfekte edilmelidir. Enfekte klonlar, *in vitro* meristem kültürü yoluyla azaltılmalıdır. Yeni ürün enfekte olmamış aşı kalemleriyle ekildiğinde ürün rotasyonu ve nadasın oldukça başarılı olduğu kanıtlanmıştır. Epifit yaşamının oluşabileceği tüm enfekte olmuş bitki artıkları ve yabancıotlar ortadan kaldırılmalı, yakılmalı ya da toprağın içine gömülmelidir. Nöbetleşme veya nadas en az bir yağmurlu sezon boyunca sürülmelidir. Bazı alanlarda, yağmurlu sezonun başlangıcı yerine sonlarına doğru ekim yapılması büyüme döneminde epideminin gelişimini geciktirerek verim kaybını azaltacaktır. Kasavanın

darı ya da kavun ile birlikte ekiminin Kasava Bakteriyel Yanıklığını önemli ölçüde azalttığı bildirilmiştir (Ene 1977). Potasyum noksanlığı bulunan topraklarda, gübreleme yoluyla yaprakların potasyum miktarlarının artırılması hastalık şiddetinin azalmasına neden olmaktadır (Odurukwe ve Arene 1980).

Bakteri ile bulaşık olan bitki tohumunun 20 dakika boyunca 60 °C'de sıcak suya batırılması ardından gece boyunca 30 °C'de ya da 4 saat boyunca 50 °C'de ısı katmanlarda kurutulması bakteri sayısını, çimlenmeyi gözle görülür derecede azaltmaksızın minimum saptanabilir seviyeden daha aza indirmiştir (Persley 1979).

Kasava gen kaynaklarının güvenli bir şekilde taşınması için FAO/IBPGR teknik talimatları, tohumların görsel olarak incelenmesini, yoğunluk seçimini, ardından tohumların suya batırılıp mikrodalga fırında su sıcaklığı 73 °C'ye ulaşana kadar tam güçte ısıtılması ve sonra aniden suyun dökülmesi uygulamasını önermektedir. Eğer mikrodalga fırın yoksa, 2 hafta boyunca 60 °C'de kuru sıcaklık uygulaması işlemi tavsiye edilmektedir (Frison ve Feliu 1991). Ardından yapılan Thiram fungusit uygulaması tohumun yeniden enfeksiyonunu azaltmaktadır. Lozano ve Nolt (1989) mikrodalga uygulaması yapmışlar ve sıcaklığın 73 °C yerine 77 °C olmasının enfeksiyonu azalttığını ifade etmişlerdir.

Konukçu bitki direncinde, özellikle sap enfeksiyonu ve solma ile ilgili belirli farklılıklar meydana gelmektedir. Burada dirençli genotiplerin kullanımı ana kontrol stratejisidir. Kasava Bakteriyel Yanıklığına karşı direnç, çoğunlukla kalıtsal etkileriyle, aynı zamanda belli bir ölçüde kalıtsal olmayan etkilerle birlikte çeşitli genlere bağlı gibi görünmektedir; dayanıklılık, hassasiyete karşı resisif görünmektedir (Hahn 1979; Umemura ve Kawano 1983). Çeşitli ülkelerden *X. a. pv. manihotis* izolatları arasında ve ayrıca tek bir ülkeden alınanlar arasında da agresiflikte bir varyasyon gözlemlenmiştir ancak belirgin patojenik özelleşme gözlemlenmemiştir (Maraite vd 1981; Alves ve Takatsu 1984). Güçlü bir genotip çevre etkileşimi çoğu kez gözlemlenmektedir. Konukçu bitki direnci uygun gübreleme yoluyla devam ettirilmektedir.

Sonuçlar, kasava üretim materyalinde, *X. a. pv. manihotis*'e karşı dayanıklılığın geniş ölçüde yayıldığını ve AFLP analizinin kasava örnekleri arasındaki genetik benzerliklere dair nicel tahminlerin sağlanmasında etkili ve yeterli bir araç olduğunu göstermektedir (Sanchez vd 1999).

Pseudomonas fluorescens ve *P. putida*'nın yaprak uygulamasının *X. a. pv. manihotis*'in yol açtığı yaprak enfeksiyonunu önemli ölçüde azalttığı belirtilmiştir (Lozano 1986). Ancak, henüz biyolojik kontrolün uygulanabilirliği pratikte kabul görmemiştir.

6. SONUÇ

Gana'nın bütün bölgelerinde kasava yetiştirilmektedir, ancak üretimi Gana'nın Ashanti, Brong Ahafo, Orta, Doğu ve Volta bölgelerinde daha yüksektir. Bu nedenle, Yukarı Batı ve Doğu Bölgeleri araştırmaya dahil edilmemiştir. Hastalık yayılımı, etkilenen simptomatolojik yaprakların oranına göre belirlenmiştir. Ashanti ve Volta bölgelerinin (Gana'nın yarı yaprak döken ormanı) sırasıyla %70 ve %60 olmak üzere en yüksek CBB şiddetine sahip olduğu görülmüştür. Brong Ahafo bölgesi (derin denizle sığ deniz arasındaki bölge), Doğu bölgesi (Yarı yaprak döken ormanın bir bölümü) ve Büyük Accra bölgesi (kıyı savanası) sırasıyla %40 ve %20 hastalık şiddeti göstermişlerdir.

Real-Time PCR yöntemin kolaylığı, tanı ve tespitlerin hızlı, güvenilir ve hassas şekilde gerçekleştirilebilmesi, direkt hastalıklı bitki dokularından tespit yapılabilmesi, bitki patojeni bakterilerin tanı ve tespitlerini gerçekleştirmek amacıyla son yıllarda yöntemin kullanımının yaygınlaşmasında önemli rol oynamaktadır.

X. a. pv. manihotis'in Gana'daki dağılımı, *Xanthomonas* spesifik primer ve *Xam* VNTR loci primer kullanılarak konvansiyonel PCR ile belirlenmiş ve her ikisi de beklenen amplifikasyon fragmentlerini üretmiştir. *Xam* izolatları, Real-Time PCR'de hem prob hemde SYBR Green 1 boyası kullanarak ortalama Ct değerleriyle birlikte floresan sinyaller üretmiştir. Günümüzde kullanılan en gelişmiş en ileri prob sistemlerinden biri LNA (Locked Nucleic Acid) adı verilen sistemdir. Bu sistemde prob üzerinde yer alan DNA analoğu monomerlerde bulunan şeker halkaları metilen bir köprü ile bağlanmıştır. Bu sayede monomerlerin her biri spesifik bağlanma için en uygun konformasyon olan N konformasyonunda sabit kalabilmektedirler. Bu durum spesifik olmayan bağlanmalara izin vermemekte, problemlerin spesifik bölgelere olan bağlanma eğilimini arttırmakta ve gerçekleşen spesifik bağlanmaların daha stabil olmasını sağlamaktadır. Bu tip problemlere ait diziler, diğer çalışmalarda kullanılan Real-Time PCR problemlerin dizilerinden uzunluk olarak daha kısadır. Bu sayede, prob dizisinin kendi içinde bağlanması olasılığını ortadan kaldırmakta ve amplifikasyon işleminin daha kısa sürede gerçekleşmesine imkan sağlamaktadır. LNA (Locked Nucleic Acid) probun kimyasal yapısı Real-Time PCR yönteminin daha spesifik olarak çalışılmasını ve alınan sonuçların daha hızlı ve güvenilir olmasını sağlamaktadır (Anonim 2014-b).

Ek olarak, Gana'da izolatların BLAST analizi, GenBank nükleotid veritabanından alınan strainler ile yüksek genetik homoloji (%93-100) göstermiş ve böylece izolatların gerçek kimliği teyit edilmiştir.

Gana'dan toplanan 32 izolat arasındaki genetik farklılıklar PFGE tarafından *SpeI* enzimi kullanılarak belirlenmiştir. PFGE sonuçlarına göre tüm izolatların iki farklı haplotip oluşturduğu bulunmuştur. PFGE, moleküler markırlar tarafından tespit edilememiş çeşitliliğin ortaya çıkarılmasına imkân sağlamaktadır.

Xam izolatları arasındaki evrimsel bağlantının belirlenmesi çok önemlidir. Filogenetik analizde, farklı benzerlikler gösteren farklı kademelerden oluşmaktadır. Gana izolatları ve referans strain, monofiletik bir grup oluşturmuş ve GenBank'dan toplanan diğer en yakın *Xam* izolatlarına çeşitli benzerlik dereceleri göstermişlerdir.

Xam'ın Gana'daki dağılımının etkili bir şekilde belirlenebilmesi için, yalnızca ticari çiftliklere değil, aynı zamanda ülkedeki küçük yerel çiftliklere de dikkatle odaklanılmasını öneriyoruz.

Bu çalışmada gözlemlenen en büyük sorun, hastalığın çiftliklerde bulunması üzerine çiftçilerin kasava bitkilerini yok etme isteksizliği idi. Bu çiftçiler, diğer çiftçilere kasava ekim çelikleri sağlayarak hastalığın yayılma zincirini de genişletmekte ve CBB kontrolünü zorlaştırmaktadırlar.

Çalışma bulgularının, Gana'daki çiftçilere, çiftliklerini kurmak için kasava dikim materyallerini bulaşık olmayan kaynaktan almasını sağlayacak, üretimlerini artırıp kırsal yoksulluğu en aza indirecek ve Gana'daki gıda güvenliği boşluklarını kapatmaya yardımcı olacağını düşünmekteyiz.



KAYNAKÇA

- ADAMS, C.D. 1957. Activities of Danish Botanists in Guinea 1738-1850. *Transactions of the Historical Society of Ghana*, III. Part 1.
- AGNASSIM, B., VALERIE, V., KOSSI, E.K. and KERSTIN, W. 2007. Assessment of major cassava diseases in Togo in relation to agronomic and environmental characteristics in a systems approach. *African Journal of Agricultural Research*, 2: 418-428.
- ALTSCHUL, S. F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E.W., & LIPMAN, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215: 403-410.
- ALVES MLB, TAKATSU A. 1984. Variability in *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*. *Fitopatologia Brasileira*, 9(3): 485-494.
- ANGELES-RAMOS, R., VIDAVER, A.K. and FLYNN, P. 1991. Characterization of epiphytic *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and pectolytic *xanthomonads* recovered from symptomless weeds in the Dominican Republic. *Phytopathology*, 81: 677-81.
- ANONİM, 2013. Website by Integrated Cassava Project (ICP) based at IITA. (Son erişim tarihi: 05.01.2013).
- ANONİM, 2014-a <http://www.exiqon.com> (Son erişim tarihi: 12.09.2014).
- ANONİM, 2014-b <http://tr.wikipedia.org> (Son erişim tarihi: 14.10.2014).
- ANONİM, 2015. Ghana looks to cassava to transform economy, International Commodity Exhibition On Cassava and Marketing, <http://www.theafricareport.com/West-Africa/ghana-looks-to-cassava-to-transform-economy.html> (Son erişim tarihi: 31.03.2017).
- ANONİM, 2016. WORLDATLAS, 2016. Top Cassava Producing Countries In The World, <http://www.worldatlas.com/articles/top-cassava-producing-countries-in-the-world.html> (Son erişim tarihi: 01-04-2017).
- ARBEIT, R. D., ARTHUR, M., DUNN, R., KIM, C., SELANDER, R. K. and GOLDSTEIN, R. 1990. Resolution of recent evolutionary divergence among *Escherichia coli* from related lineages :the application of pulsed field electrophoresis to molecular epidemiology. *J. of Infect. Dis.* 161: 230-235.
- ARRIETA-ORTIZ, M.L., RODRIGUEZ-R. L.M., PÉREZ, A.L., POULIN, L., DÍAZ, A.C., ARIAS ROJAS, N., TRUJILLO, C., RESTREPO-BENAVIDES, M., BART, R., BOCH, J., BOUREAU, T., DARRASSE, A., DAVID, P., BERNONVILLE, T.D., FONTANILLA, P., GAGNEVIN, L., GUÉRIN, F., JACQUES, M.A., LAUBER, E., LEFEUVRE P, MEDINA, C., MEDINA, E., MONTENEGRO, N., MUÑOZ-BODNAR, A., NOËL, L., ORTIZ-QUÍÑONES,

- J.F., OSORIO, D., PARDO, C., PATIL, P.B., POUSSIER, S., 2013. Genomic survey of pathogenicity determinants and VNTR markers in the cassava bacterial pathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* strain CIO151. *PLoS One* 8(11):e79704.
- ASSIGBETSE, K., VERDIER, V., WYDRA, K., RUDOLPH, K. and GEIGER, J.P. 1996. Genetic variation of the cassava bacterial blight pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* originating from different ecoregions in Africa. In R. Balasubramanian, D. Lalithakumari, and A. Mahadevan (ed.), *9th International Congress of Plant Pathogenic Bacteria*, (pp. 37). University of Madras, Madras, India.
- ATALLAH, Z.K. and STEVENSON, W.R. 2006. A Methodology to detect and quantify five pathogens causing potato tuber decay using Real-Time quantitative polymerase chain reaction. *The American Phytopathological Society*, 96 (9): 1037-1045.
- BAILEY, H. 1976. Hortus Third. A concise dictionary of plants cultivated in the United States and Canada. McMillan, New York.
- BANCROFT, I., WOLK, C.P. and OREN, E.V. 1989. Physical and genetic maps of the genome of heterocyst-forming *Cyanobacterium Anabaena* sp.strain PCC 7120. *J. Bacteriol.*, 171: 5940-5948.
- BASIM, E. 1998. Pulsed-Field Jel Elektroforez yöntemi ile domates ve biberde yaprak lekesi etmeni (*Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*)'nın genom büyüklüğünün saptanması ve fiziksel haritasının oluşturulması. Doktora Tezi, Akdeniz Üniversitesi, Antalya, 83s.
- BASIM, E. and BASIM, H. 2004. Multiplex-Bio PCR ile domates bakteriyel patojenlerinin moleküler tanısı. *Türkiye I Bitki Koruma Kongresi Bildirileri*, ss. 144, 8-10 Eylül, Samsun.
- BASIM, H. and YILMAZ, S. 2005. Identification and detection of *Pseudomonas corrugata* and *Pseudomonas mediterranea* by Multiplex-PCR and Real-Time PCR. *Phytopathology*, 96: 128.
- BASIM, H. and BASIM, E. 2007. "TaqMan Real-Time PCR ile *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*'nun tanısı ve tespiti", *II. Bitki Koruma Kongresi*, ss. 104, 27-29 Ağustos, Isparta.
- BASIM, E. ve BASIM, H. 2009. Batı Akdeniz Bölgesi'ndeki bağ alanlarında Pierce Hastalığı etmeni *Xylella fastidiosa*'nın tanısı, tespiti ve moleküler karakterizasyonu. *Türkiye III. Bitki Koruma Kongresi*, ss. 156, 15-18 Temmuz, Van.
- BASIM, H. and ÇAPLIK, D. 2009. Domates Bakteriyel Kanseri etmeni *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* ve Domates Bakteriyel Yaprak Lekesi

etmeni *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*'nın LNA probe'a dayalı Real-Time PCR ile tanısı ve saptanması. *Türkiye III. Fitopatoloji Kongresi*, ss. 138: 15-18 Temmuz, Van.

BASIM, H and ÖZTÜRK, N. 2011. Fasulye Bakteriyel Yaprak Yanıklık (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*) ve Bakteriyel Hale Lekesi (*Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*) etmenlerinin LNA probu kullanılarak Real-Time PCR ile tespiti ve tanılanması. *Türkiye IV. Bitki Koruma Kongresi*, ss. 59, 28-30 Haziran, Kahramanmaraş.

BASIM, H. and BOZAN, G. 2011. Ateş yanıklığı hastalık etmeni *Erwinia amylovora*'nın LNA probe kullanılarak kantitatif Real-Time PCR ile tanısı ve tespiti. Yüksek Lisans Tezi, Akdeniz Üniversitesi, Antalya, 92 s.

BASIM H. and BAKİ D. 2014. Domates (*Solanum lycopersicum* L.) bakteriyel öz nekrozu hastalık etmenleri *Dickeya chrysanthemi*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pseudomonas cichorii*, *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mediterranea* ve *Pseudomonas viridiflava*'nın LNA probe kullanılarak Real-Time PCR ile tanısı ve hastalıklı bitki dokularından tespiti. Yüksek Lisans Tezi, Akdeniz Üniversitesi, Antalya, 155s.

BELLIS, P.D., SCHENA, L. and CARIDDI, C. 2007. Real-time Scorpion-PCR detection and quantification of *Erwinia amylovora* on pear leaves and flowers. *Eur. J. Plant. Pathol.*, 118: 11-22.

BENLİOĞLU, K. and ÖZYILMAZ, Ü. 2007. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in Moleküler Beacon Probe ve Fluoresan PCR Testi ile saptanması, *Türkiye II. Bitki Koruma Kongresi*, ss. 103, 27-29 Ağustos, Isparta.

BERG, T., TESORIERO, L. and HAILSTONES, L.D. 2006. A multiplex Real-Time PCR assay for detection of *Xanthomonas campestris* from brassicas. *Appl. Microbiol.*, 42: 624-630.

BERTHET, A. and BONDAR, G. 1915. Molestia bacteriana da mandioca. *Boletim de Agricultura, Sao Paulo*, 16: 513-524.

BOHER, B., KPEMOUA, K., NICOLE, M., LUISETTI, J. and GEIGER, J. P. 1995. Ultrastructure of interactions between cassava and *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*: cytochemistry of cellulose and pectin degradation in a susceptible cultivar. *Phytopathology*, 85(7): 777-788.

BONDAR, G. 1912. Una nova molestia bacteriana das hastas da mandioca. *Chacaras e Quintaes, Sao Paulo*, 5:15-18.

BOURIQUET, G. 1939. Mosaïque et maladie bactérienne du manioc. In: Recherches systématiques, biologiques et cytologiques sur les maladies des plantes cultivées à Madagascar. (pp. 83-113). Paris, France: Chevalier.

- BRADBURY, J.F. 1970. Isolation and preliminary study of bacteria from plants. *Rev. Pl. Pathol.*, 49: 213-218.
- BRADBURY, J.F. 1986. Guide to Plant Pathogenic Bacteria. Wallingford, UK: CAB International.
- BURKHOLDER, W.H., McFADDEN, L.A. and DIMOCK, A.W. 2005. A bacterial blight of chrysanthemum. *Phytopathology*, 43: 522-526.
- CANTOR, C.R., GAAL, A. and SMITH, C.L. 1988. High resolution separation and accurate size determination in pulsed field gel electrophoresis. III. Effect of electrical field shape. *Biochemistry*. 27: 9216-9221.
- CHANG, N. and TAYLOR, D.E. 1990. Use of pulsed-field agarose gel electrophoresis to size genomes of *Campylobacter* species and to construct a *Sal* I map of *Campylobacter jejuni* UA580. *J. Bacteriol.*, 172: 5211-5217.
- CHEN, X. and WIDGER, W.R. 1993. Physical genome map of the unicellular Cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7002. *J. Bacteriol.*, 175: 5106-5116.
- CHIOU, C. S. 2010. Multilocus variable-number tandem repeat analysis as a molecular tool for subtyping and phylogenetic analysis of bacterial pathogens. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 10(1): 5-7.
- CHU, G., VOLRATH, D. and DAVIS, R. W. 1986. Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric fields. *Science*. 234:1582-1685.
- CIAT, 1996. Global cassava trends. Reassessing the crop's future. In: Henry, G. and Gottret, V. (eds) Working document no. 157. CIAT, Cali, Colombia.
- COLETTA-FILHO, H.D., TAKITA, M.A., DE SOUZA, A.A., AGUILAR-VILDOSO, C.I. and MACHADO, M.A. 2001. Differentiation of strains of *Xylella fastidiosa* by a variable number of tandem repeat analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(9): 4091-4095.
- COTTYN, B., BAEYEN, S., PAUWELYN, E., VERBAENDERT, I., VOS, P.D.E., BLEYAERT, M., HOFTE, P. and MAES, M. 2011. Development of a Real-Time PCR assay for *Pseudomonas cichorii*, the causal agent of midrib rot in greenhousegrown lettuce, and its detection in irrigating water. *Plant Pathol.*, 60: 453-461.
- CUBERO, J. and GRAHAM, H.J. 2005. Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction for bacterial enumeration and allelic discrimination to differentiate *Xanthomonas* strains on citrus. *Phytopathology*, 95 (11): 1333-1340.

- DANIEL, J.F., BOHER, B., 1985. Epiphytic phase of *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* on aerial parts of cassava. *Agronomie*, 5(2): 111-115.
- DANIEL, J.F., BOHER, B., KOHLER, F., 1981. Les maladies bactériennes du manioc (*Manihot esculenta* Crantz) en République Populaire du Congo et en République Centrafricaine. *Agronomie*, 1:751-757.
- DEDAL, O.I, PALOMAR, M.K, NAPIERE, C.M, 1980. Host range of *Xanthomonas manihotis* Starr. *Annals of Tropical Research*, 2(3):149-155.
- DELOGER, M., EL KAROUI, M. and PETIT, M.A. 2009. A genomic distance based on MUM indicates discontinuity between most bacterial species and genera. *Journal of Bacteriology*, 191: 91-99.
- DIANESE, J.C. 1985. Atividade pectolitica das patovares de *Xanthomonas campestris* que afetam a mandioca. *Revista de Microbiologica*, 16: 195-202.
- DICE, L. R. 1945. Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology*, 26: 297-302.
- DREO, T., GRUDEN, K., MANCEAU, C., JANSE, J.D. and RAVNIKAR, M. 2007. Development of a Real-Time PCR-based method for detection of *Xylophilus ampelinus*. *Plant Pathol.*, 56: 9-16.
- DYE, D.W. 1978. Genus *Xanthomonas* dowson 1939. In: Young JM, Dye DW, Bradbury JF, Pangopoulos CG, Robbs CF, eds. 1978. A proposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 21:153-168.
- EGLI, T. and SCHMIDT, D. 1982. Pathogenic variation among the causal agent of bacterial wilt of forage grasses. *Phytopathologische Zeitschrift*, 104: 138-50.
- ELANGO, F. and LOZANO, J.C. 1980. Transmission of *Xanthomonas manihotis* in seed of cassava (*Manihot esculenta*). *Plant Disease*, 64(8): 784-786.
- EL-SHARKAWY, M.A. 1993 Drought-tolerant cassava for Africa, Asia and Latin America. *BioScience*, 43: 441-451.
- ENE LSO, 1977. Control of cassava bacterial blight (CBB). *Tropical Root and Tuber Crops Newsletter*, 10:30-31.
- EWBANK, E., 1992. Etude du catabolisme d'acides aminés conduisant à la formation de phytotoxines par *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* (agent pathogène de la bactériose du manioc). PhD thesis, Université Catholique de Louvain, Louvain-la Neuve, Belgium.

- EWBANK, E., MARAITE, H., 1990. Conversion of methionine to phytotoxic 3-methylthiopropionic acid by *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*. *Journal of General Microbiology*, 136(7):1185-1189.
- EZELIO, W.N.O., 1977. Control of cassava bacterial blight in Nigeria. Nigeria, 1976. In: Persley G, Terry RE, MacIntyre R, eds. *Report Workshop on Cassava Bacterial Blight*. Ottawa, Canada: International Development Research Centre, 15-17.
- FAO, 2001. FAO Production yearbook for 2000, Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of United Nations, Rome, Italy.
- FAO, 2011. Food Outlook, Global Market Analysis. *Cassava*, 39-44.
- FELSENSTEIN, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, 39:783-791.
- FESSEHAIE, A., WYDRA, K., RUDOLPH, K., 1999. Development of a new semiselective medium for isolating *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* from plant material and soil. *Phytopathology*, 89(7): 591-597.
- FILLO, S., GIORDANI, F., ANNIBALLI, F., GORGE, O., RAMISSE, V., VERGNAUD, G., RIEHM, J. M., SCHOLZ, H. C., SPLETTSTOESSER, W. D., KIEBOOM, J., OLSEN, J. S., FENICIA, L. and LISTA, F. 2011. *Clostridium botulinum* group I strain genotyping by 15-locus multilocus variable-number tandem-repeat analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(12): 4252-4263.
- FLÁVIA, M. D.S.C., LÁZARA, P.C.C. and RUI, P. L. J. 2005. Genetic diversity of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* based on plasmid profile and pulsed-field gel electrophoresis. *Genetics and Molecular Biology*, 28(3): 446-451.
- FREEMAN, W.M., WALKER, S.J. and VRANA, K.E. 1999. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *Biotechniques*, 26: 112-122.
- FRISON, E.A., FELIU, E. 1991. FAO/IBPGR Technical Guidelines for the safe Movement of Cassava Germplasm. Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations/International Board for Plant Genetic Resources.
- GALLELLI, A., TALOCCI, S., PILOTTI, M. and LORETI, S. 2014. Real-Time and qualitative PCR for detecting *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* isolates causing recent outbreaks of kiwifruit bacterial canker. *Plant Pathol.*, 63: 264-276.
- GARCIA-YOLDI, D., LE FLECHE, P., DE MIGUEL, M. J., MUNOZ, P. M., BLASCO, J. M., CVETNIC, Z., MARIN, C. M., VERGNAUD, G. and LOPEZ-GONI, I. 2007. Comparison of multiple-locus variable-number tandem-repeat

- analysis with other PCR-based methods for typing *Brucella suis* isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(12): 4070-4072.
- GITAITIS, R.D., SASSER, M.J., BEAVER, R.W., MCINNES, T.B. and STALL, R.E. 1987. Pectolytic *xanthomonads* in mixed infections with *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *P. syringae* pv. *tomato*, and *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in tomato and pepper transplants. *Phytopathology*, 77: 611-15.
- GOLL, R., OLSEN, T., CUI, G., & FLORHOLMEN, J. 2006. Evaluation of absolute quantitation by non-linear regression in probe-based Real-Time PCR. *BMC Bioinformatics*. 7, 107.
- GOTO, M. 1992. Fundamentals of Bacterial Plant Pathology. Academic Press, Inc., USA, pp 342.
- GOTTSBERGER, R.A. 2010. Development and evaluation of a Real-Time PCR assay targeting chromosomal DNA of *Erwinia amylovora*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 51 (3): 285-292.
- GROTHUES, D. and TUMMLER, B. 1991. New approaches in genome analysis by pulsed-field gel electrophoresis: application to the analysis of *Pseudomonas* species. *Mol. Microbiol.*, 5: 2763-2776.
- HAHN, S.K. 1979. Breeding of assava for resistance to Cassava Mosaic Disease (CMD) and Cassava Bacterial Blight (CBB) in Africa. In: Maraite H, Meyer JA, (Eds.) *Diseases of Tropical Food Crops*, Proceedings of an International Symposium, UCL, Louvain-la-Neuve, Belgium: Université Catholique de Louvain, 211-219.
- HAYWARD, A.C. 1993. The host of *Xanthomonas*. In: J. G. Swings and E. L. Civerolo (Editors), *Xanthomonas*, Champman & Hall, London, United Kingdom. pp: 1-119.
- HOLLOWAY, B.W., ROMLING, U. and TUMMLER, B. 1994. Genomic mapping of *Pseudomonas aeruginosa* PAO. *Microbiology*, 140: 2907-2929.
- HREN, M., BOBENA, J., ROTTER, A., KRALJ, P., GRUDENA, K. and RAVNIKAR, M. 2007. Real-Time PCR detection systems for *Flavescence dorée* and *Bois noir* phytoplasmas in grapevine: comparison with conventional PCR detection and application in diagnostics. *Plant Pathol.*, 56: 785-796.
- IKOTUN, T, 1981. Studies on the host range of *Xanthomonas manihotis*. *Fitopatologia Brasileira*, 6(1):15-21.
- IKOTUN, T., 1984. The nature and function of the extracellular polysaccharide produced by *Xanthomonas campestris* pathovar *manihotis*. *Fitopatologia Brasileira*, 9(3): 467-473.

- JOHNSON, K.L. and WALCOTT, R.R. 2012. Progress towards a Real-time PCR assay for the simultaneous detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* and Pepino mosaic virus in tomato seed. *J. Phytopathol.*, 160 (7-8): 353-363.
- JONES, W.O. 1959. Manioc in Africa. Stanford University Press.
- JOSEPH, J. and ELANGO, F. 1991. The status of cassava bacterial blight caused by *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* in Trinidad. *Journal of Phytopathology*, 133(4): 320-326.
- JUKES, T.H. and CANTOR, C.R. 1969. Evolution of protein molecules. In Munro HN, editor, *Mammalian Protein Metabolism*, (pp. 21-132). Academic Press, New York.
- KARLEN, Y., MCNAIR, A., PERSEGUERS, S., MAZZA, C. and MERMOD, N. 2007. Statistical significance of quantitative PCR. *BMC Bioinformatics*, 8, 131.
- KELMAN, A. 1954. The relationship of pathogenicity of *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance in tetrazolium medium. *Phytopathology*, 44: 693-695.
- KOHARA, Y., AKIYAMA, K. and ISONO, K. 1987. The physical map of the whole *E. coli* chromosome: Application of new strategy for rapid analysis and storing of a large genome library. *Cell*, 50: 495-508.
- KONSTANTINIDIS, K.T. and TIEDJE, J. M. 2005. Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 102: 2567-2572.
- KORANGAMOAKOH, S., CUDJOE, R.A. and ADAMS, E. 1987. Biological control of cassava pests in Ghana. Prospects for the integration of other strategies.
- KWAJE, S. L. 1982. Bacterial blight on cassava. *FAO Plant Protection Bulletin*, 30(2): 82-83.
- LAM, H. 2012. Cassava value chains and markets in Ghana and Nigeria: Literature review and value chain study. Report produced for gratitude project.
- LATHRAP, D.W. 1973. The antiquity and importance of long-distance trade relationships in the moist tropics of Pre-Columbian South America. *World Archaeology* 5: 170-186.
- LE BOURGEOIS, P., LAUTIER, M., VANDEN-BERGHE, L., GASSON, M.J. and RITZENTHALER, P. 1995. Physical and genetic map of the *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363 chromosome: comparison with that of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IL 1403 reveals a large genome inversion. *J. Bacteriol.*, 177: 2840-2850.

- LEYNS, F., DE-CIEENE, M., SWINGS, J. and DE-LEY, J. 1984. The host range of the genus *Xanthomonas*. *The Botanical Review*, 50: 308-355.
- LICCIARDELLO, G., BELLA, P. and CATARA, V. 2011. Quantitative detection of *Pseudomonas corrugata* and *Pseudomonas mediterranea* in tomato plants by duplex Real-Time PCR. *J.Plant Pathol.*, 93 (3): 595-602.
- LOOMIS, R. and GERAkis, P. 1975. Productivity of agricultural ecosystems. In: Cooper, J. (ed.) *Photosynthesis and Productivity in Different Environments*. Cambridge University Press, New York, pp. 145-172.
- LOURIDO, L.C., 1974. Una metodologia para estimar los beneficios y los costos esperados en un programa de investigacion agricola aplicada : el anublo bacterial en la yuca. Thesis Econ., Universidad de los Andes, Bogota, Colombia.
- LOZANO, J. C., 1986. Cassava bacterial blight: a manageable disease. *Plant Disease*, 70 (12): 1089-1093.
- LOZANO, J.C. and NOLT, B.L. 1989. Pest and pathogens of cassava. Plant protection and quarantine. Volume II. Selected pests and pathogens of quarantine significance [edited by Kahn, R.P.] Boca Raton, Florida, USA; CRC Press, Inc., 169-182.
- LUCIER, T.S. and BRUBAKER, R.R. 1992. Determination of genome size, macrorestriction pattern polymorphism, and nonpigmentation-specific deletion in *Yersinia pestis* by pulsed-field gel electrophoresis. *J. Bacteriol.* 174: 2078-2086.
- LUO, L.X., WALTERS, C., BOLKAN, H., LIU, X.L., and LI, J.Q. 2008. Quantification of viable cells of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* using a DNA binding dye and a Real-Time PCR assay. *Plant Pathol.*, 57: 332-337.
- MAAS, J.L., FINNEY, M.M., CIVEROLO, E.L. and SASSER, M. 1985. Association of an unusual strain of *Xanthomonas campestris* with apple. *Phytopathology*, 75: 438-445.
- MACDOUGALL, J. and GIRON, I.S. 1995. Physical map of the *Treponema denticola* circular chromosome. *J. Bacteriol.*, 177: 1805-1811.
- MAMBA-MBAYI, G., TSHILENGE-DJIM, P., NKONGOLO, K.K. and KALONJIMBUYI, A. 2014. Characterization of congolese strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* associated with cassava bacterial blight. *American Journal of Plant Sciences*, 5: 1191-1201.
- MARAITE, H. 1993. *Xanthomonas campestris* pathovars on cassava: cause of bacterial blight and bacterial necrosis. In: Swings, J.G. and Civerolo, E.L. (eds) *Xanthomonas*. (pp. 18-25). Chapman and Hall, London.

- MARAITE, H. and MEYER, J.A. 1975. *Xanthomonas manihotis* (Arthaud Berthet) Starr, causal agent of bacterial wilt, blight and leaf spots of cassava in Zaire. *PANS*, 21(1): 27-37.
- MARAITE, H. and PERREAUX, D. 1979. Comparative symptom development in cassava after infection by *Xanthomonas manihotis* or *X. cassavae* under controlled conditions. In: Terry, E.R., Persley, G.J. and Cook, S.C.A. (eds) *Cassava Bacterial Blight in Africa; Past, Present and Future. Report of an Interdisciplinary Workshop*, IITA, Ibadan, Nigeria, 1978. (pp. 17-24). Centre for Overseas Pest Research, London.
- MARAITE, H. and WEYNS, J. 1979. Distinctive physiological, biochemical and pathogenic characteristics of *Xanthomonas manihotis* and *X. cassavae*. In: Maraite H, Meyer JA, eds. *Diseases of tropical food crops. Proceedings of an International Symposium*, U.C.L., 1978. Louvainla Neuve, (pp. 103-117). Belgium: Université Catholique de Louvain.
- MARAITE, H., WEYNS, J., YIMKWAN, O., LIPEMBRA, P. and PERREAUX, D. 1981. Physiological and pathogenic variations in *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*, p. 358-368. In J. C. Lozano and P. Gwin (ed.), *Plant Pathogenic Bacteria. Proceedings of the 5th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria*. CIAT, Cali, Colombia.
- MARCANO, M., TRUJILL, O. G., 1984. Role of weeds in relation to survival of bacterial blight of cassava. *Revista de la Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela*, 13(1/4): 167-181.
- MARCANO, M., TRUJILL, O. G., 1982. Bacteriosis de la yuca; identificados algunos aspectos epidemiológicos del pathogeno que pueden utilizarse para disminuir los danos ocasionados por la enfermedad. *Fonaiap Divulga* (Venezuela), 1:12-13.
- MAVRODI, O.V., MAVRODI, D.V., THOMASHOW, L.S. and WELLER, D.M. 2007. Quantification of 2,4-Diacetylphloroglucinol-Producing *Pseudomonas fluorescens* strains in the plant rhizosphere by Real-Time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73 (17): 5531-5538.
- MOFA, 2012. Ministry of Food and Agriculture. *Agriculture in Ghana 2006*. Accra, Ghana: Statistics Research and Information Directorate.
- MOOTER, M.V.D., MARAITE, H., MEIRESONNE, L., SWINGS, J., GILLIS, M., KERSTERS, K., LEY, J.D.E., 1987. Comparison between *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* (ISPP list 1980) and *X. campestris* pv. *cassava* (ISPP list 1980) by means of phenotypic, protein electrophoretic, DNA hybridization and phytopathological techniques. *Journal of General Microbiology*, 133(1): 57-71.
- MURPHY, M., CORCORAN, D., BUCKLEY, J.F., O'MAHONY, M., WHYTE, P. and FANNING, S. 2007. Development and application of multiple-locus variable

- number of tandem repeat analysis (MLVA) to subtype a collection of *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol.*, 115:187-194.
- N'GUESSAN, C. A., BRISSE, S., LE ROUX-NIO, A. C., POUSSIER, S., KONE, D. and WICKER, E. 2013. Development of variable number of tandem repeats typing schemes for *Ralstonia solanacearum*, the agent of bacterial wilt, banana Moko disease and potato brown rot. *Journal of Microbiological Methods*, 92(3): 366-374.
- NAZARENKO, I., BHATNAGAR, S. K. and HOHMAN, R. J. 1997. A closed tube format for amplification and detection of DNA based on energy transfer. *Nucleic Acids Research*, 25: 2516-2521.
- NGOC, L.B., VERNIERE, C., VITAL, K., GUERIN, F., GAGNEVIN, L., BRISSE, S., AH-YOU, N. and PRUVOST, O. 2009. Development of 14 minisatellite markers for the citrus canker bacterium, *Xanthomonas citri* pv. *citri*. *Molecular Ecology Resources*, 9(1): 125-127.
- ODURUKWE, S.O. and ARENE, O.B. 1980. Effect of N, P, K fertilizers on cassava bacterial blight and root yield of cassava. *Tropical Pest Management*, 26(4): 391-395.
- OJEDA, S., VERDIER, V., 2000. Detecting *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in cassava true seeds by nested polymerase chain reaction assay. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 22(3): 241- 247.
- OTIMNAPE, GW, 1980. Cassava bacterial blight in Uganda. *Tropical Pest Management*, 26(3): 274-277.
- OTIMNAPE, G.W., 1983. The effects of bacterial blight on germination, tuber yield and quality of cassava. In: *Proceedings of the 10th International Congress of Plant Protection*, Brighton, UK: British Crop Protection Council, 1205.
- PARKINSON, N., ARITUA, V., HEENEY, J., COWIE, C., BEW, J. & STEAD, D. 2007. Phylogenetic analysis of *Xanthomonas* species by comparison of partial *gyrase B* gene sequences. *Int J. Syst Evol Microbiol.*, 57: 2881-2887.
- PERREAUX, D., MARAITE, H., MEYER, J.A., 1986. Detection of 3(methylthio) propionic acid in cassava leaves infected by *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 28(3): 323-328.
- PERSLEY, G. J. 1979. Studies on the survival and transmission of *Xanthomonas manihotis* on cassava seed. *Annals of Applied Biology*, 93(2): 159-166.
- PERSLEY, G. J. 1980. Studies on bacterial blight of cassava in Africa PhD thesis, School of Molecular and Microbial Sciences, *University of Queensland*, Australia. doi:10.14264/uql.2014.512.

- POURCEL, C., VISCA, P., AFSHAR, B., D'AREZZO, S., VERGNAUD, G. and FRY, N. K. 2007. Identification of variable-number tandem-repeat (VNTR) sequences in *Legionella pneumophila* and development of an optimized multiple-locus VNTR analysis typing scheme. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(4): 1190-1199.
- PUJOL, M., BADOSA, E., MANCEAU, C. and MONTESINOS, E. 2006. Assessment of the environmental fate of the biological control agent of Fire Blight, *Pseudomonas fluorescens* EPS62e, on apple by culture and Real-Time PCR methods. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72 (4): 2421-2427.
- RAEYMAEKERS, L. 2000. Basic principles of quantitative PCR. *Mol. Biotechnol.*, 15: 115-122.
- REICHEL-DOLMATOFF, G. 1965. Colombia. In: *Ancient Peoples and Places*. Thames and Hudson, London, pp. 62-75.
- RESTREPO, S., DUQUE, M.C., TOHME, J. and VERDIER, V. 1999. AFLP fingerprinting: an efficient technique for detecting genetic variation of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. *Microbiology*, 145: 107-114.
- RESTREPO, S., VELEZ, C.M. and VERDIER, V. 2000. Measuring the genetic diversity of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* within different fields in Colombia. *Phytopathology*, 90: 683-690.
- RESTREPO, S., VERDIER, V. 1997. Geographical differentiation of the population of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in Colombia. *Appl Environ Microb.*, 63(11): 4427-4434.
- RICHTER, M. and ROSSELLÓ-MÓRA, R. 2009. Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 106: 19126-19131.
- ROGERS, D.J. and FLEMING, H.S. 1973. A monograph of *Manihot esculenta* with an explanation of the taximetrics methods used. *Economic Botany*, 27: 1-113.
- ROMALDE, J.L., ITEMAN, I. and CARNIEL, E. 1991. Use of pulsed field gel electrophoresis to size the chromosome of the bacterial fish pathogen *Yersinia ruckeri*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 68: 217-225.
- SALM, H. and GEIDER, K. 2004. Real-time PCR for detection and quantification of *Erwinia amylovora*, the causal agent of fireblight. *Plant Pathol.*, 53(5): 602-610.
- SANCHEZ, G., RESTREPO, S., DUQUE, M.C., FREGENE, M., BONIERBALE, M. and VERDIER, V., 1999. AFLP assessment of genetic variability in cassava accessions (*Manihot esculenta*) resistant and susceptible to the Cassava Bacterial Blight (CBB). *Genome*, 42(2):163-172.

- SCHAAD, N. W., JONES, B. J. and CHUN, W. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria, 3rd Edition. *American Phytopathological Society*, (pp. 17-35). St. Paul, MN.
- SCHAAD, N.W., BERTHIER-SCHAAD, Y., SECHLER, A. and KNORR, D. 1999. Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in potato tubers by BIO-PCR and automated Real-Time fluorescence detection system. *Plant Dis.*, 83 (12): 1095-1100.
- SCHWARTZ, D.C., SAFFRAN, W., WELSH, J., HAAS, R., GOLDENBERG, M. and CANTOR, C.R. 1982. New techniques for purifying large DNAs and studying their properties and packaging, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 47: 189-195.
- SMITH, C.L. and CONDEMIN, G. 1990. New approaches for physical mapping of small genomes. *J. Bacteriol.*, 172:1167-1172.
- SNEATH, P. H. A., and SOKAL, R. R. 1973. Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification. W. H. Freeman, San Francisco, pp. 573.
- STARR, M. P., JENKINS, C.L, BUSSEY, L.B and ANDREWES, A.G. 1946. Chemotaxonomic significance of the xanthomonadins, novel brominated aryl-polyene pigments produced by bacteria of the genus *Xanthomonas*. *Arch. Microbiol.*, 113: 1-9.
- STEAD, D. 1989. Grouping of *Xanthomonas campestris* pathovars of cereals and grasses by fatty acid profiling. *Bulletin OEPPEPPO Bulletin*, 19: 57-68.
- STEVENSON, K., ALVAREZ, J., BAKKER, D., BIET, F., DE JUAN, L., DENHAM, S., DIMARELI, Z., DOHMANN, K., GERLACH, G. F., HERON, I., KOPECNA, M., MAY, L., PAVLIK, I., SHARP, J. M., THIBAUT, V. C., WILLEMSSEN, P., ZADOKS, R. N. and GREIG, A. 2009. Occurrence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* across host species and European countries with evidence for transmission between wildlife and domestic ruminants. *BMC Microbiology*, 9, 212.
- SWINGS; J., DEVOS, P., Vanden-Mooter, M. and DE-LEY, J. 1983. Transfer of *Pseudomonas maltophilia* Hugh 1981 to the genus *Xanthomonas* as *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1981) comb. nov. III. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 33: 409-413.
- TAKATSU, A., FUKUDA, S. and PERRIN, S. 1978. Epidemiological aspects of bacterial blight of cassava in Brazil. In: Maraite H, Meyer JA (eds) *Proceedings of an International Symposium on Diseases of Tropical Food Crops*, (pp. 141-150). Louvain-La-Neuve, Belgium.
- THAVEECHAI, N., LEKSOMBOON, C., KOSITRATANA, W., PARADORNWAT, A., ROJANARIDPICHED, C. 1993. Survival of *Xanthomonas campestris* pv.

- manihotis* under natural field conditions. *Kasetsart Journal, Natural Sciences*, 27(1): 25-32.
- UMEMURA, Y. and KAWANO, K. 1983. Field assessment and inheritance of resistance to cassava bacterial blight. *Crop Science*, 23(6):1127-1132.
- VAN BECKHOVEN, J.R.C.M., STEAD, D.E. and VAN DER WOLF, J.M. 2002. Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* by AmpliDet RNA, a new technology based on Real-Time monitoring of NASBA amplicons with a molecular beacon. *J. Appl. Microbiol.*, 93 (5): 840-849.
- VAN BELKUM, A. 2007. Tracing isolates of bacterial species by multilocus variable number of tandem repeat analysis (MLVA). *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 49(1): 22-27.
- VAUTERIN, L., SWINGS, J., KERSTERS, K., GILLIS, M., MEW, T. W., SCHROTH, M. N., PALLERONI, N. J., HILDEBRAND, D. C., STEAD, D. E., CIVEROLO, E. L., HAYWARD, A. C., MARAITE, H., STALL, R. E., VIDAVER, ANNE, M., and BRADBURY, J. F. 1990. Towards an improved taxonomy of *Xanthomonas*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 40: 312-316.
- VAUTERIN, L., HOSTE, B., KERSTERS, K. and SWINGS, J. 1995. Reclassification of *Xanthomonas*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45: 472-489.
- VERDIER, V., DONGO, P. and BOHER, B. 1993. Assessment of genetic diversity among strains of *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*. *Journal of General Microbiology*, 139: 2591-2601.
- VERDIER, V., BOHER, B., MARAITE, H. and GEIGER, J. P. 1994. Pathological and molecular characterization of *Xanthomonas campestris* strains causing diseases of cassava (*Manihot esculenta*). *Applied and Environmental Microbiology*, 60: 4478-4486.
- VERDIER, V., MOSQUERA, G. and ASSIGBETSE, K. 1998. Detection of the cassava bacterial blight pathogen, *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*, by polymerase chain reaction. *Plant Dis.*, 82: 79-83.
- VERDIER, V., and MOSQUERA, G. 1999. Specific detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* with a DNA hybridization probe. *Journal of Phytopathology*, 147(7/8): 417-423.
- WANG, X., DODDAPANENI, H., CHEN, J. and YOKOMI, R.K. 2014. Improved Real-Time PCR diagnosis of citrus stubborn disease by targeting prophage genes of *Spiroplasma citri*. *Plant Dis.*, <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-06-14-0572-RE> (Son erişim tarihi:20.04.2016).

- WELLER, S.A., ELPHINSTONE, J.G., SMITH, N.C., BOONHAM, N. and STEAD, D.E. 2000. Detection of *Ralstonia solanacearum* strains with a quantitative, multiplex, Real-Time, fluorogenic PCR (TaqMan) assay. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66 (7): 2853-2858.
- WONG, M.L. and MEDRANO, J.F. 2005. Real-Time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*, 39 (1): 75-85.
- WYDRA, K., FESSEHAIE, A., ASSIGBÉTSÉ, K., VERDIER, V., JANSE, J., FANOU, A. and RUDOLPH, K. 1995. Physiological, genetic and pathological characterization of strains of *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*, incitant of cassava bacterial blight, from West and Central Africa. In: *Proceedings of the 13th International Plant Protection Congress on European Journal of Plant Pathology*, Hague, The Netherlands, p. 463.
- WYDRA, K. and MSIKITA, W. 1998. Overview of present situation of cassava diseases in West Africa. In: Akoroda MO, Ekanayake I (eds) *Proceedings of 6th Triennial Symposium of International Society of Tropical Root Crops - Africa Branch (ISTRC-AB)*, (pp. 198-206). Lilongwe, Malawi.
- WYDRA, K. and VERDIER, V. 2002. Occurrence of cassava diseases in relation to environmental, agronomic and plant characteristics. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 93: 211-226.
- YONGXIANG, Z. and KLAUS G. 1997. Differentiation of *Erwinia amylovora* Strains by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *Applied and Env. Microbiol.*, 63 (11): 4421-4426.
- YOUNG, J. M., SADDLER, G. S., TAKIKAWA, Y., BOER, S.H.D.E., VAUTERIN, L., GARDAN, L., GVOZDYAK, R.I. and STEAD, D.E. 1996. Names of plant pathogenic bacteria. *Review of Plant Pathology*, 75 (9):721-763.
- YOUNG, J. M., PARK, D. S., SHEARMAN, H. M. and FARGIER, E. 2008. A multilocus sequence analysis of the genus *Xanthomonas*. *Systematic and Applied Microbiology*, 31: 366-377.
- ŽARKO, I., SLAVIŠA, S., SVETLANA, Ž., VELJKO, G., MILAN, K. and DJORDJE, F. 2012. Molecular characterization of *Pseudomonas syringae* isolates from fruit trees and raspberry in Serbia. *Eur J Plant Pathol.*, 134:191-203.
- ZHAO, S., POULIN, L., RODRIGUEZ, R. L, SERNA, N. F., LIU, S. Y., WONNI, I., SZUREK, B., VERDIER, V., LEACH, J. E., HE, Y. Q., FENG, J. X. and KOEBNIK, R. 2012. Development of a variable number of tandem repeats typing scheme for the bacterial rice pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*. *Phytopathology*, 102(10): 948-956.

ÖZGEÇMİŞ



Muntala Abdulai 1980 yılında Gana'nın Salaga ilinde doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Salaga'da tamamladı. Gana "University for development studies" Üniversitesi Ziraat Fakültesi Agronomy Bölümünden "Assessment of Yield Loss Due to Insect Pest on Soybean in Northern Ghana" bitirme çalışmasını hazırlayarak 2008 yılında mezun oldu. 2009 yılında kazandığı "Bill Gates bursu" ile Nijerya-Ibadan Bitki Koruma Bölümü fitapatoloji Ana Bilim Dalında yüksek lisansa başladı. "Molecular Characterization and Pathogenicity of *Meloidogyne* species in Oyo state, Nigeria" isimli tez çalışmasını hazırlayarak 2011 yılında yüksek lisans eğitimini üstün başarı derecesi ile tamamlamış ve 2012 yılında doktora eğitimine Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Bölümü Fitapatoloji Anabilim dalında başlayarak 2017 yılında doktora eğitimini başarıyla tamamlamıştır.